

Application clinique du séquençage à haut débit dans les cancers avancés

P. Hutter, S. Myit, J. P. Rey, S. Arcioni, C. Girardet, Institut Central (ICHV), Hôpital du Valais, Sion

Les découvertes de mutations génétiques, intervenant dans les voies de signalisation cellulaires impliquées dans la prolifération tumorale et la métastatisation, ont permis l'élaboration de nouvelles cibles thérapeutiques, notamment pour les tumeurs solides. Les thérapies ciblées comprennent essentiellement les inhibiteurs de tyrosine kinase ou des anticorps monoclonaux dirigés contre des récepteurs de facteurs de croissance. Ces nouvelles thérapies ne concernent que les cancers avancés, qui n'ont, en général, pas d'indication chirurgicale, et leur réponse thérapeutique dépend du profil génétique de la tumeur. Ainsi, la stratification des patients présentant un cancer avancé et leur éligibilité à une thérapie ciblée se fait après séquençage de l'ADN tumoral.

Durant ces 40 dernières années, l'analyse par séquençage des mutations se faisait selon la technique de Sanger. Une révolution est intervenue ces dernières années avec l'introduction du séquençage à haut débit (en anglais NGS pour Next Generation Sequencing ou MPS pour Massive Parallel Sequencing)[1]. Parmi ses nombreux avantages, le NGS permet une plus grande sensibilité, praticable sur biopsies voire même sur prélèvements cytologiques. Il permet également l'analyse de plusieurs gènes simultanément dans plusieurs échantillons tumoraux. Bien qu'actuellement utilisé pour l'analyse de mutations ponctuelles ou de courtes délétions, il peut révéler de nombreuses autres altérations chromosomiques (translocation, amplification, etc.). Cependant, cette technique génère un grand nombre d'informations génétiques qui ne peut être traité que par bioinformatique. Ainsi, des logiciels spécialisés ont été créés par les bioinformaticiens pour trier les données et sélectionner les mutations pertinentes au sein de la tumeur.

Principales tumeurs ciblées

- 1) Pour les carcinomes pulmonaires non à petites cellules, au stade avancé, les sociétés d'oncologie recommandent l'évaluation des gènes *EGFR* et *ALK*. Les tumeurs avec mutations activatrices de l'*EGFR* ou avec une translocation du gène *ALK* sont plus sensibles à un traitement d'inhibiteurs de tyrosine kinase (erlotinib, gefitinib pour l'*EGFR*, et crizotinib pour l'*ALK*) [2] [3].
- 2) Pour les adénocarcinomes coliques métastatiques, l'analyse des gènes *KRAS*, *BRAF* et *NRAS* est reconnue. A la différence des cancers pulmonaires, la présence d'une mutation « driver » dans l'un de ces gènes est une contre-indication à une thérapie ciblée anti-EGFR (par ex. cetuximab) puisque la tumeur est résistante. Seules les tumeurs sans mutations sont sensibles à une thérapie anti-EGFR combinée à la chimiothérapie [4].
- 3) Pour les mélanomes métastatiques, la présence de mutation du gène *BRAF*, peut être une indication à un traitement par vemurafenib [5].

Déroulement de l'analyse

- Sélection avec le pathologue du bloc de paraffine contenant la tumeur.
- Dissection du tissu tumoral et extraction de l'ADN. (Fig. 1)

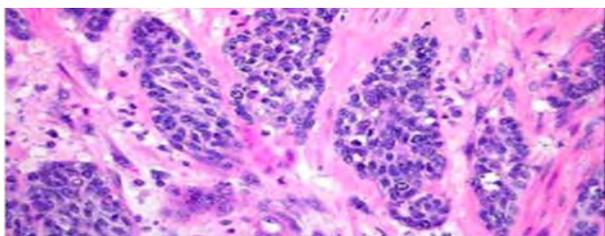


Fig. 1 : Coupe histologique d'un carcinome colique

- Préparation d'une librairie ADN par enrichissement des cibles à analyser et fixation sur les fragments obtenus des codes-barres spécifiques à chaque patient.
- Fixation des fragments sur des sphères puis amplification par PCR en émulsion.
- Séquençage multiparallélisé sur la plateforme PGM (Ion Torrent™, Life Technologies). (Fig. 2)
- Transfert sécurisé et anonymisé des données brutes à la compagnie suisse de bioinformatique *Sophia Genetics* SA (EPFL).
- Analyse bioinformatique permettant la sélection des mutations pertinentes.
- Rédaction du rapport de pathologie moléculaire.



Fig. 2 : Puce, appareil de séquençage et résumé des étapes

Panels à disposition

Panel 1: gènes *NRAS*, *KRAS* et *BRAF*: Analyse de toute la séquence codante pour les gènes *KRAS* et *NRAS* (exons 2 à 5). Pour le gène *BRAF*, seul l'exon 15 est analysé. Dans ces gènes, on retrouve essentiellement des mutations ponctuelles, le plus souvent mutuellement exclusives.

Panel 2: gène *EGFR*: Les principales mutations observées sont les délétions dans l'exon 19 et des mutations ponctuelles dans les exons 18, 20 et 21.

Panel 3: gènes *KIT* et *PDGFRA*: mutations ponctuelles du gène *KIT* (exons 9, 11, 13 à 17) pour les tumeurs stromales gastrointestinales (GIST) et les mélanomes. Mutations ponctuelles du gène *PDGFRA* (exons 8, 10, 12, 14 et 18) pour les GIST. Ce test sera disponible au premier semestre 2015.

Ces analyses sont réalisées dans le cadre d'une collaboration entre le Service de Pathologie et le Service de Génétique médicale de l'ICHV, répondant à la norme d'accréditation ISO15189. L'analyse bioinformatique des données est confiée à la société *Sophia Genetics* (EPFL) et répond aux normes ISO 13485:2003 et EN ISO 13485:2012.

Conclusion

Aujourd'hui, la prise en charge oncologique des tumeurs avancées ou métastatiques requiert en plus du diagnostic histologique, le statut mutationnel, reconnu comme facteur prédictif des nouvelles thérapies ciblées. Le NGS est devenu un outil incontournable dans cette approche thérapeutique. Actuellement limité aux cancers avancés, il est certain qu'il sera appelé à élargir son application en oncologie.

Références

- [1] Frampton GM et al. Nat. Biotechnol. 2013 Nov; 31(11): 1023-31.
- [2] Mok TS et al. N. Engl. J. Med. 2009 Sep 3; 361(10):947-57.
- [3] Shaw AT et al. N. Engl. J. Med. 2013 Jun 20; 368(25):2385-94.
- [4] Douillard JY et al. N. Engl. J. Med. 2013 Nov 28;369(22):2159-60.
- [5] Chapman PB et al. N. Engl. J. Med. 2011 Jun 30; 364(26):2507-18.

Personnes de contact

Dr Pierre Hutter
Dr Samir Myit
Dr Jean-Philippe Rey
Séverine Arcioni

pierre.hutter@hopitalvs.ch
samir.myit@hopitalvs.ch
jphilippe.rey@hopitalvs.ch
severine.arcioni@hopitalvs.ch