

Caractéristiques génotypiques et phénotypiques du tissu tumoral

Des tumorothèques aux tests pronostiques/ prédictifs/ théranostiques

Pr P Bertheau, Dr P de Cremoux Hôpital Saint Louis, Université Paris-Diderot

L'anatomopathologie est au centre du diagnostic de tumeur maligne



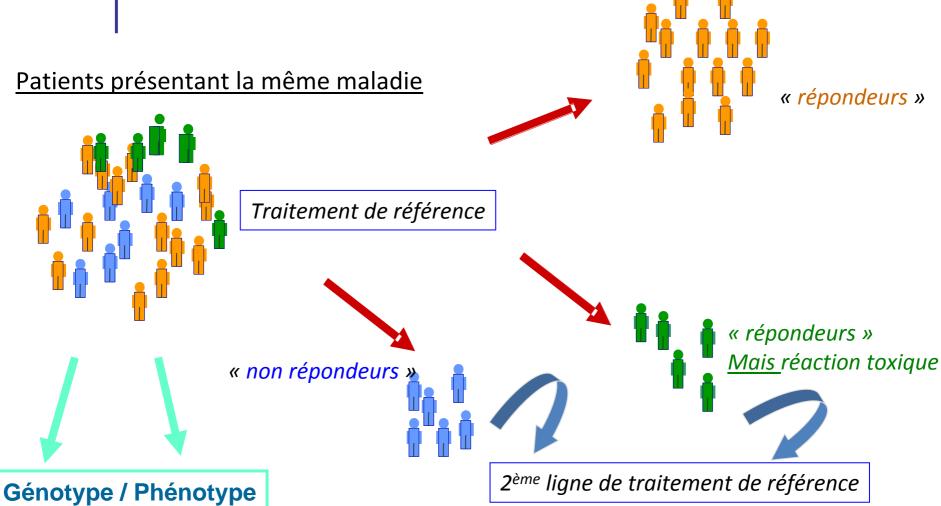




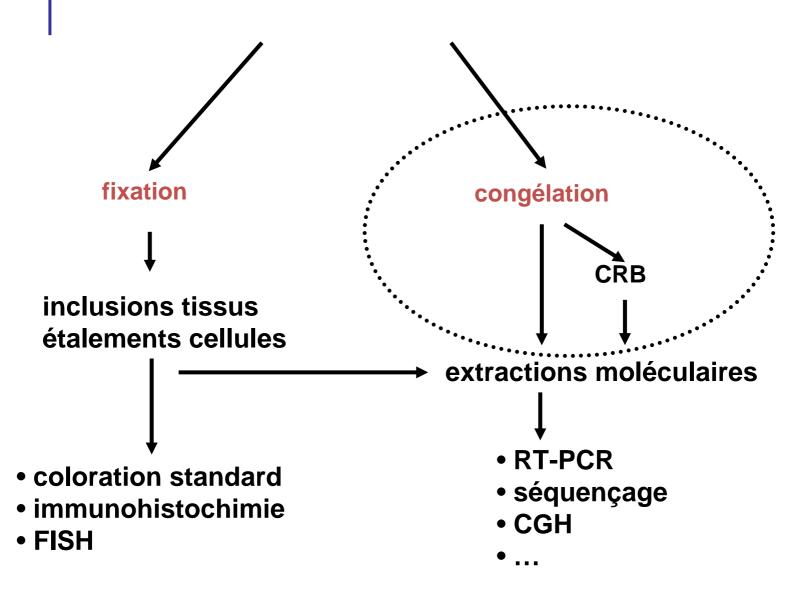








Prélèvements tissulaires /cellulaires

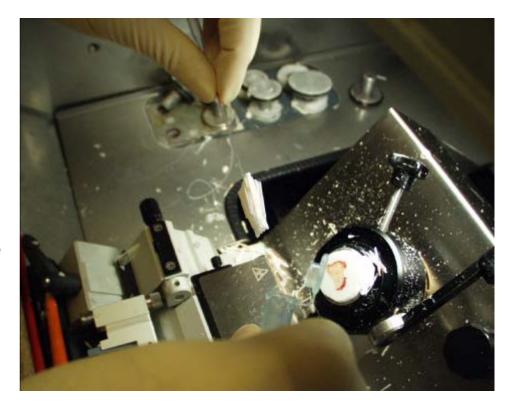


• • • Analyses moléculaires immédiates

Annotations des prélèvements tumoraux: coupes congelées (au cryostat) pour :

1/ contrôle histologique de la qualité de l'échantillon congelé

2/ analyses moléculaires ADN, ARN, ou protéines





Conservation pour utilisation différée

Où?

- Tumorothèque, tissuthèque
- Centre de Ressources Biologiques (CRB)
- Plateforme de Ressources Biologiques (PRB)

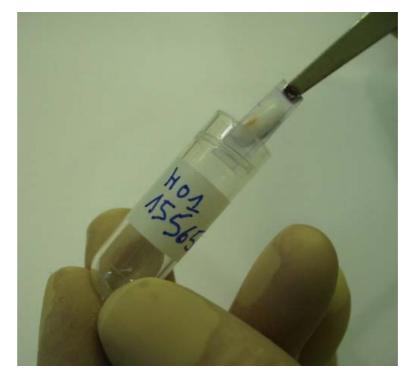


• • Les cryotubes

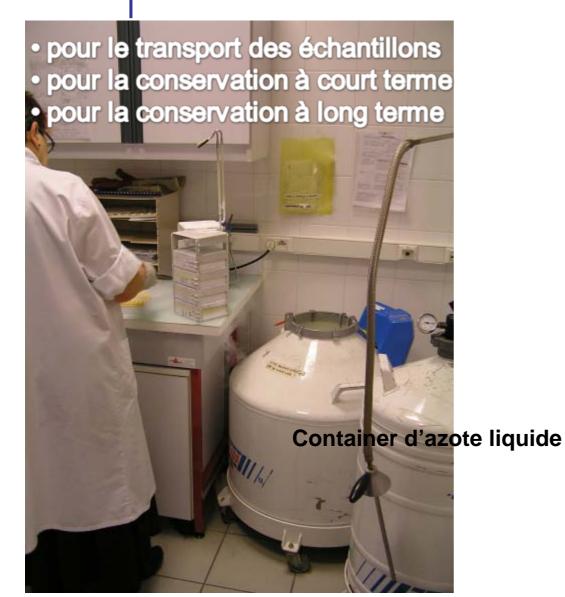
- · fragment tissulaire déposé sur une languette plastique stérile
- insertion dans le cryotube
- immersion dans I 'azote



- Conditions RNAses free
- Le plus vite possible (qq min)



• Conservation





Congélateurs -80°C





Conserver des tissus humains avant tout traitement reste indispensable:

- Complément au diagnostic
- Recherche clinique et pré-clinique (culture cellulaire & modèles animaux)
- Avancées scientifiques et technologiques

Tumorothèques et aspects juridiques

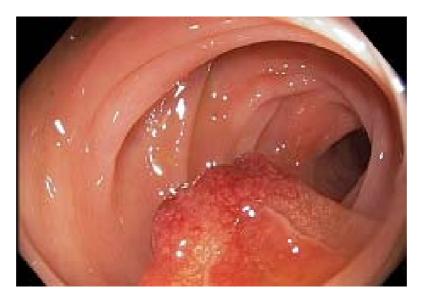
- Considérations médico-légales
 - Règlementation stricte
 - Déclaration des collections
- Considérations éthiques
 - Respect du patient et des prélèvements.....
 - Information éclairée
 - Consentement ou non opposition

• • Des Exemples

- Cancers du sein
- Cancers bronchiques
- Cancers colorectaux
- GISTs
- Lymphomes
- Mélanomes
- Autres.....



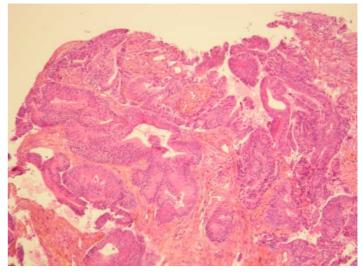
Cancers colo-rectaux



endoscopie



macroscopie



microscopie



KRAS Mutation Status Is Predictive of Response to Cetuximab Therapy in Colorectal Cancer

Astrid Lièvre, ^{1,3} Jean-Baptiste Bachet, ³ Delphine Le Corre, ¹ Valérie Boige, ⁴ Bruno Landi, ² Jean-François Emile, ³ Jean-François Côté, ^{1,2} Gorana Tomasic, ⁴ Christophe Penna, ³ Michel Ducreux, ⁴ Philippe Rougier, ⁵ Frédérique Penault-Llorca, ⁵ and Pierre Laurent-Puig^{1,2}

'Université Paris-Descartes, Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale UMR-775; 'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France; 'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Ambroise Paré, Boulogne Billancourt, France, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Versailles, France; 'Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; and 'Centre Jean Perrin, Clermont-Fernand, France, Université Auvergne, Clermont-Fernand, France

Cancer Res 2006; 66: (8). April 15, 2006

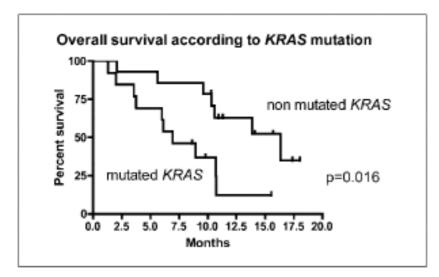


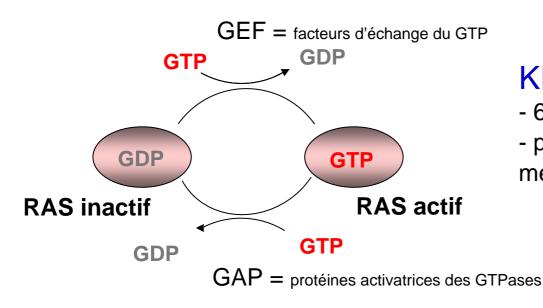
Figure 2. Overall survival curves of patients with a KRAS-mutated and normutated turnor.

- 30 patients (MCC) traités par cetuximab
- 43% mutations de KRAS
- Aucune réponse au cétuximab dans le groupe KRAS muté



Ciblage de la voie de l'EGF

Bos, Cancer Res 1989

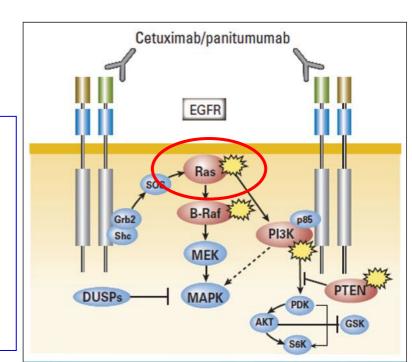


KRAS:

- 6 exons, 21kDa, chr
- petite protéine G (GTPase), second messager dans la voie de l'EGF

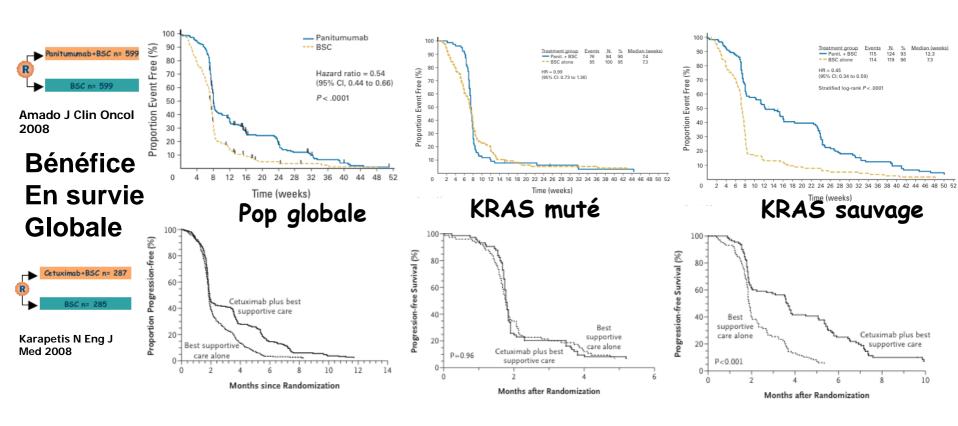
-KRAS muté

- = oncogène / KRAS ACTIF
 - = altération fréquente (40%) et précoce dans la carcinogenèse colique
- = marqueur de résistance au traitement / ATC bloquant EGFR





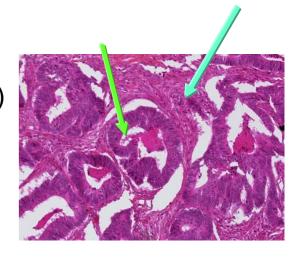
Effet des anticorps anti EGF-R (cetuximab, panitumumab)

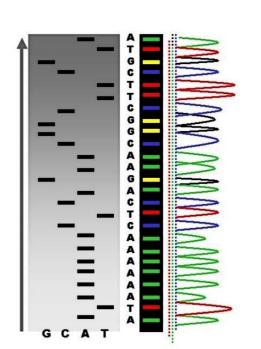


Prescription possible en combinaison en 1^{ère} et 2 ^{ème} ligne de chimiothérapie ou en monothérapie en 3 ^{ème} ligne de chimiothérapie

Organisation

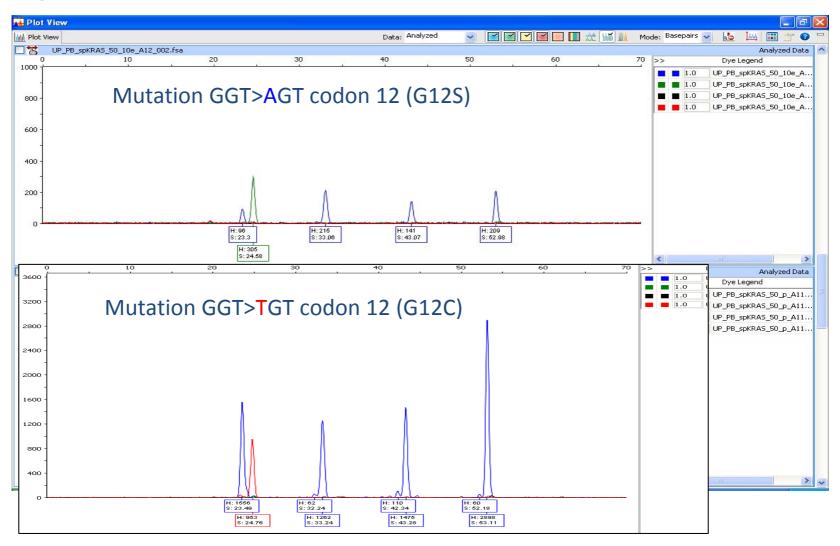
- Coupes matériel fixé (4 à 6 coupes 10-15µm)
 Expertise pathologique (sélection du bloc, % cell tumorales)
- 2. Extraction ADN, quantification
- 3. Amplification spécifique / Purification
- 4. Identification de l'altération génique (Réaction de séquençage ou discrimination allélique ou analyse de fragments.....)
- 5. Séquençage capillaire (détection des pics de fluorescence des ddNTP)







KRAS, exemple: analyse SNaPShot



Mutations de KRAS G12V (GGT>GTT)





Principales mutations / cancers colo-rectaux

codon 1/ wt

12

GGT

34 35

Gly G

13

GGC

37 38

Gly G

2/ Muté

G12S c.34G>A, p.Gly12Ser [AGT]

G12R c.34G>C, p.Gly12Arg [CGT]

G12C c.34G>T, p.Gly12Cys [TGT]

G12A c.35G>C, p.Gly12Ala **[GCT]**

G12D c.35G>A, p.Gly12Asp [GAT]

G12V c.35G>T, p.Gly12Val [GTT]

G13C c.37G>T, p.Gly13Cys [TGC]

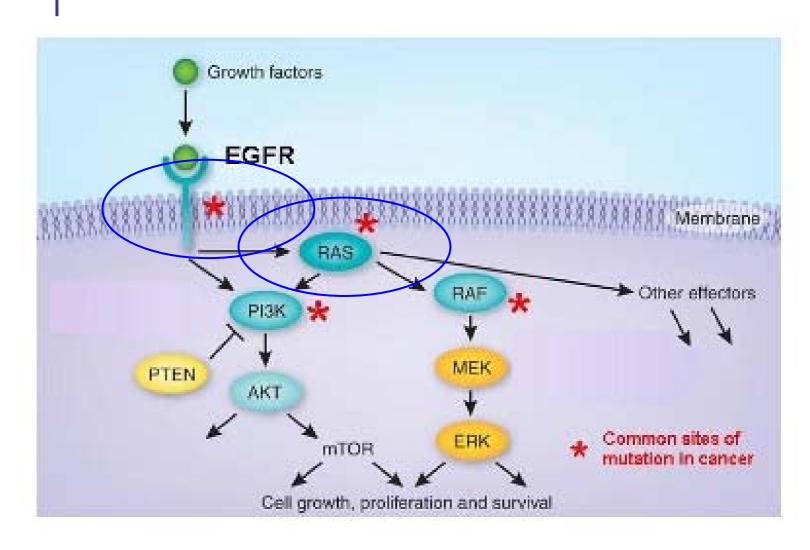
G13R c.37G>C, p.Gly13Asg [CGC]

G13D c.38G>A, p.Gly13Asp [GAC]

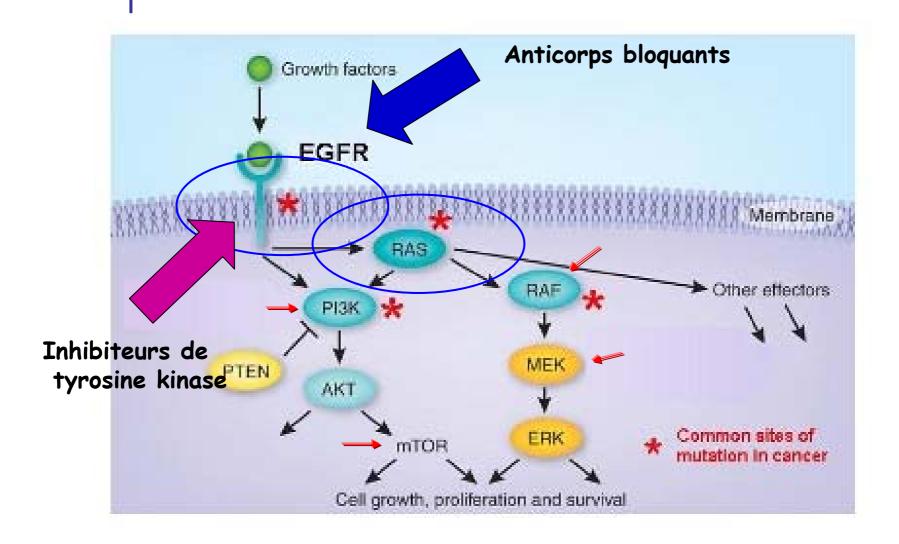
Principales mutations du gène KRAS trouvées en clinique et validées (INCa)

- Mutations conférant une résistance au panitinumab et au cétuximab (doivent être recherchées)
 - Codon 12: p.G12D, p.G12A, p.G12V, p.G12S, p.G12C
 - Codon 13: p.G13D
- ➤ Pas d'indication actuelle pour les recherches de mutations des codons 61 & 146

Voies de signalisations de l'EGFR



Voies de signalisations de l'EGFR



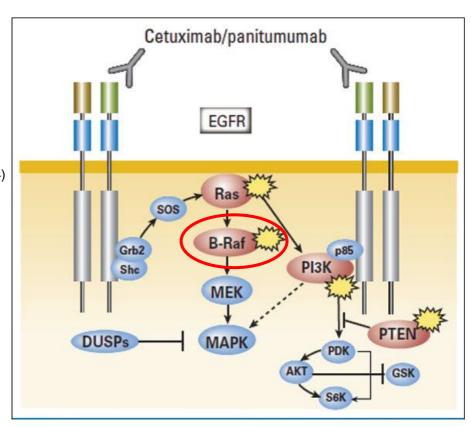


BRAF:

- -sérine/thréonine kinase, activée par KRAS, activant la voie MAPK
- mutation activatrice **V600E** (Bamford, BrJ Cancer 2004)
- 5-10% des patients atteints de cancer colorectal , mutuellement exclusif avec les mutation de KRAS (Rajagopalan, Nature 2002)

→ marqueur pronostique

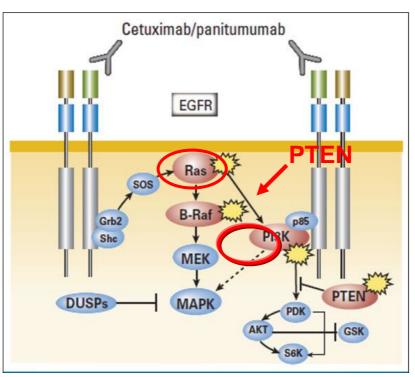
tumeurs V600E sont de plus mauvais pronostic (Tol, 2010)



••• PI3K, PTEN

PIK3CA, classe IA

- Kinase: mutations de la sous unité catalytique p110α: 10-20%
- -3 positions préférentiellement mutées : *542 et 545* dans domaine d'interaction avec p85 (exon 9), *1047* dans le domaine kinase (exon, 20)



PTEN

- Phosphatase
- 30%: altérations multiples conduisant à la perte ou l'inactivation de la protéine (mutation, perte du gène, hyperméthylation)

Intérêt dans la prédiction de la réponse aux anticorps anti-EGFR ? en évaluation

••• Conclusions & Perspectives (2)

 Statut KRAS muté dans les cancers colo-rectaux: prédictif de <u>non réponse</u> à un traitement par anticorps bloquant EGFR

Mais :

- L'absence de mutations de KRAS ne prédit pas la réponse
- Autres marqueurs de réponse ou de non réponse?
 - Mutations de BRAF : non validé
 - Amplification EGFR : non validé
 - Mutations des voies d'aval, PI3K, en cours d'analyse....

GISTs

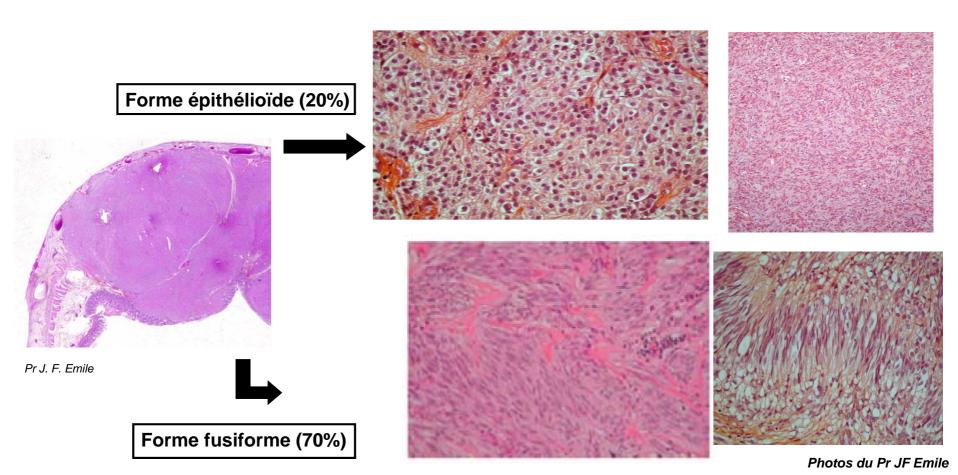
(Gastro-intestinal stromal tumors)



Tumeurs d'origine mésenchymateuse du tractus digestif Tumeurs rares (<1 % de l'ensemble des tumeurs digestives 50-70% estomac,20-30% intestin grêle) Altérations somatiques : mutations de cKit et PDGFRA

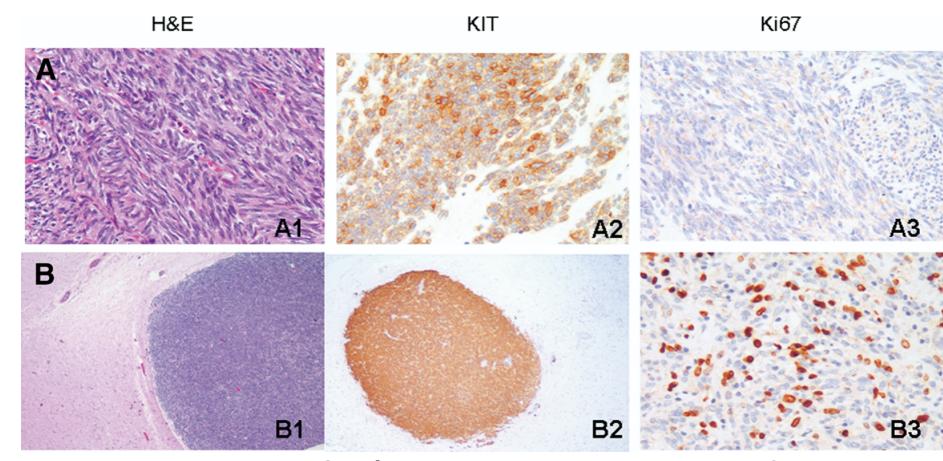
Diagnostic histologique des GIST (1)

- Aspect histologique variable



Diagnostic histologique des GIST(2)

Immuno-histochimie nécessaire au diagnostic Positivité de KIT (CD117) dans 95% des GIST



Antonescu et al, 2008

Les GIST dérivent des cellules interstitielles de Cajal qui jouent un rôle dans le péristaltisme intestinal et exprime KIT à l'état normal



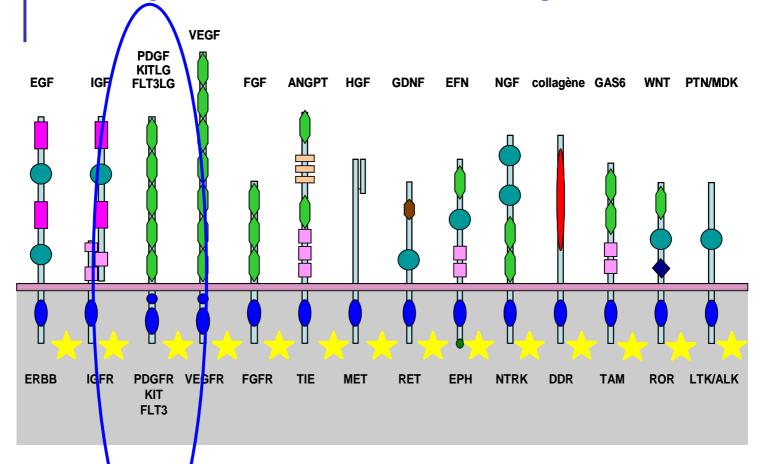
Mutation c-kit Tumeurs stromales gastriques (GIST)

- Tumeurs rares: 150 à 300 cas par an (55 ans)
- Formes malignes: 30%
- Survie moyenne 18 mois (Chimiorésistance 90%)
- Mutation du gène c Kit: 80% * (4g12) activation du récepteur
- La protéine c Kit (CD117): RTK : rôle crucial dans la prolifération et survie cellulaire (Ras/raf/MAP kinases; PI3K/Akt/mTor; src; Janus/stat)
- Glivec® (Imatinib) est un inhibiteur sélectif de la TK récepteur

Mutations de KIT et PDGFRA dans les GIST

- ➤ Kit et PDGFRA sont des récepteurs membranaires de la famille des tyrosines kinases (id HER2 , EGFR...)
- Détection des mutations possible sur du tissu tumoral fixé et inclus en paraffine

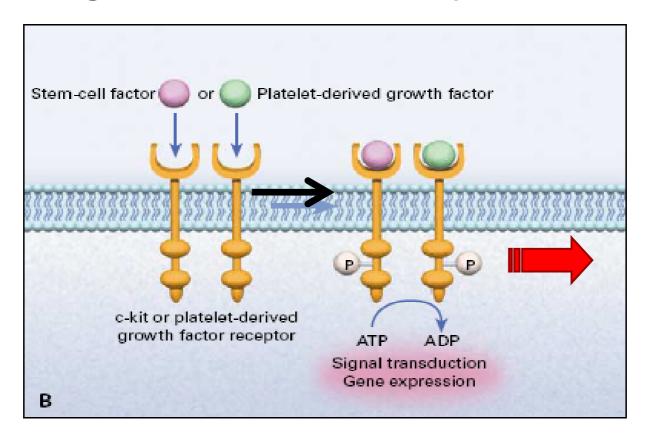
Récepteurs à activité tyrosine kinase



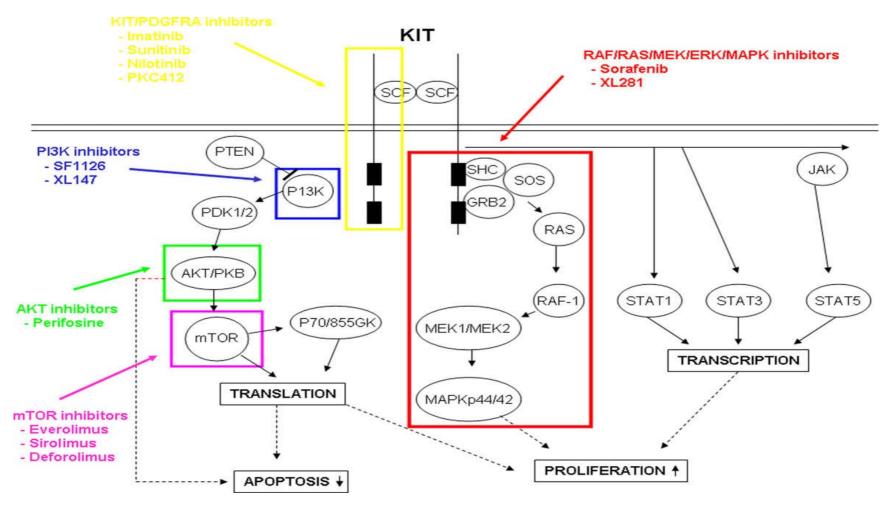
EGFR, ERBB2, ERBB3 KIT, FLT3, PDGFRA et B, VEGFR1 et 2, TIE2, IGF1R, MET, RET, DDR, FGFR, ALK, etc.

c KIT

Son ligand naturel est le SCF (stem cell factor)

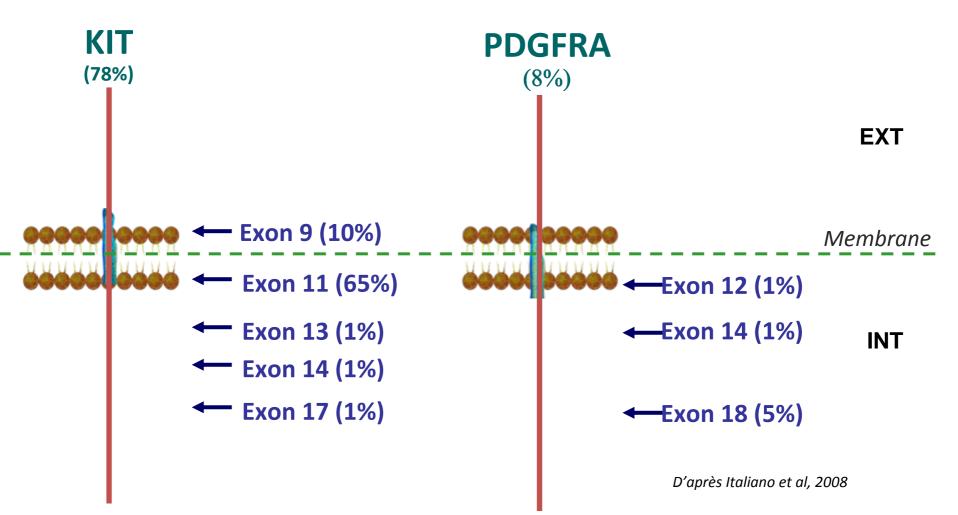


Voies de signalisation c Kit



Mutations de KIT et PDGFRA dans les GIST Italiano et al, 2008

Fréquence mutations 85%

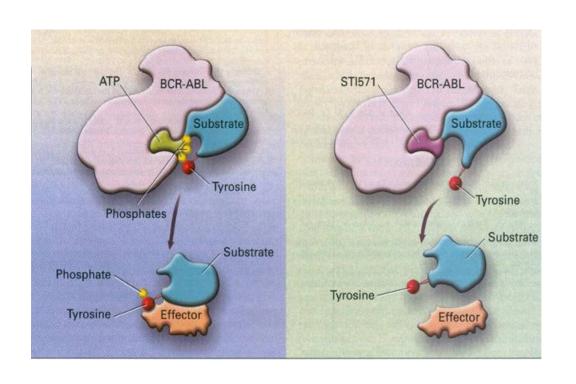


Classification moléculaire des GISTs

Exon	Fréquence	Exemple mutations	Conséquences
Mutations de KIT (80%)*			
9	10	Dupl/ins	Dimérisation / int Grêle (T agressives)
11	65	<u>Del</u> ou ins ou NS	Dimérisation (T agressives)
13	1	V654 <i>A</i>	Domaine kinase
14	1	T670I	Domaine kinase
17	1	D816V	Boucle activatrice
Mutations de PDGFa (8%)*			
12	1	V561D	Domaine juxta mb
14	1	N659K	Domaine kinase
18	5	D842V	Boucle activatrice
Pas de mutations (5-10%)			

••• Glivec® (imatinib)

2 phenylamino pyrimidine, ATP binding site



Cibles
abl, bcr-abl

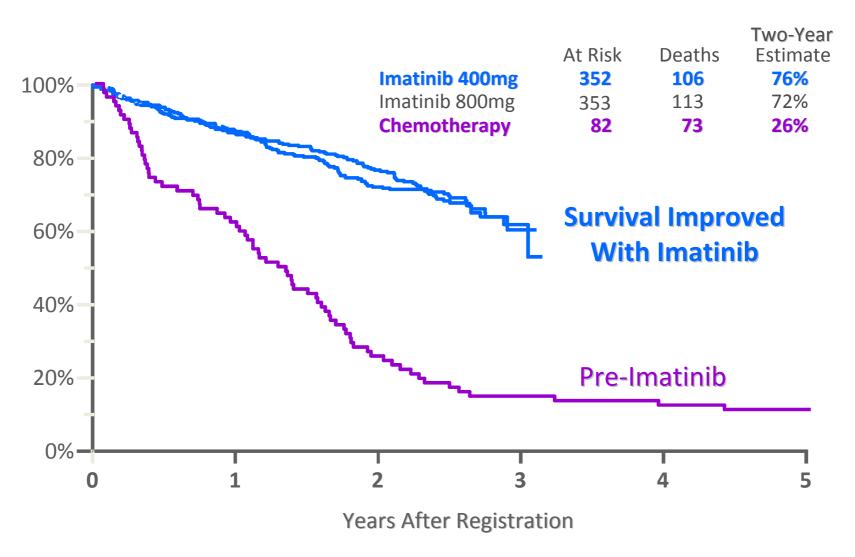
c-kit

✓ PDGF-R

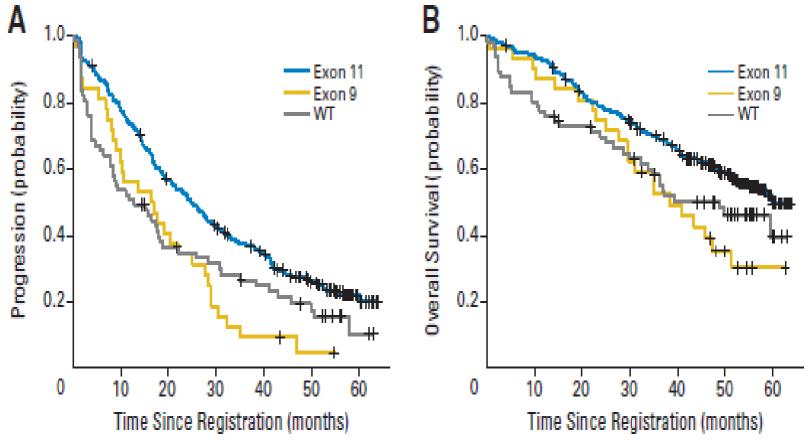
✓ c-Arg/Abl2

✓ M-CSFR

Imatinib & Overall Survival in metastatic GIST







La mutation de l'exon 9 ou l'absence de mutation de KIT sont des facteurs prédictifs de mauvaise réponse à l'imatinib



Bénéfice clinique de l'imatinib

Lié au type de mutation : exon 11>sans mutation = PDGFRA > exon 9

Résistance :

> Primaire :

> 10-15% des patients (mutation exon 9 kit ou mutation exon 18 PDGFRA ou absence de mutation) diminution affinité de l'imatinib?

> Secondaire :

après 6 mois de réponse au traitement : mutations secondaires KIT ou PDGFRA, amplification (rare), activation des voies de transduction (Akt), autres?

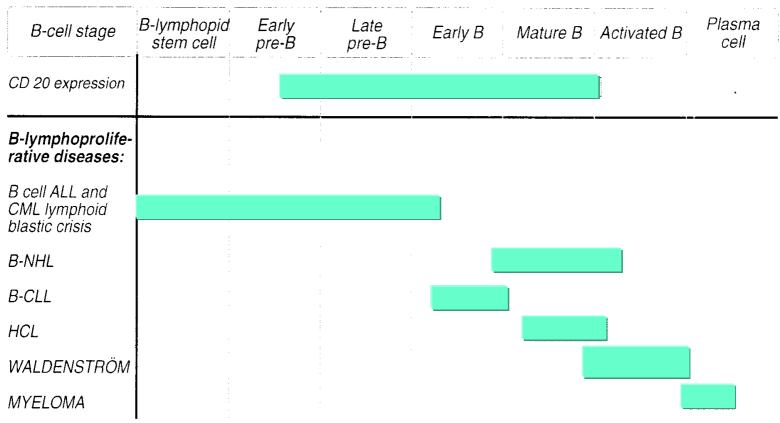
Autres thérapeutiques ?

Place du sunitinib (AMM après échec imatinib en situation métastatique)



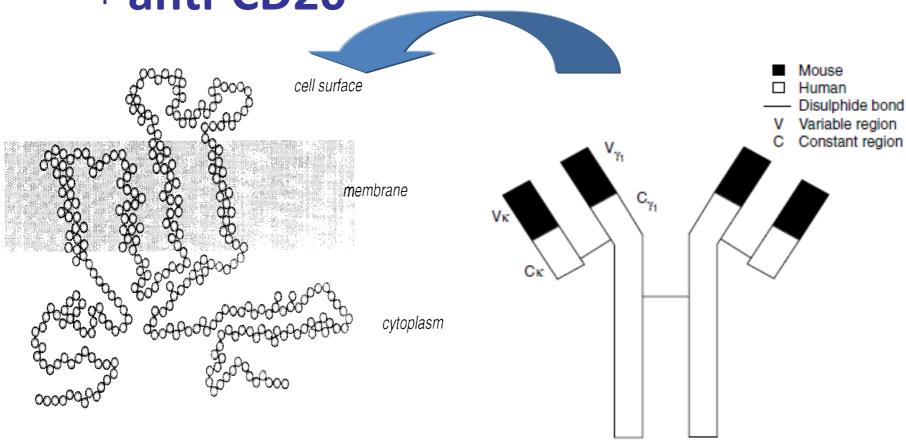
Lymphomes





CD20 antigen expression on human normal and neoplastic B-cells.

CD 20 et anticorps thérapeutiques anti-CD20



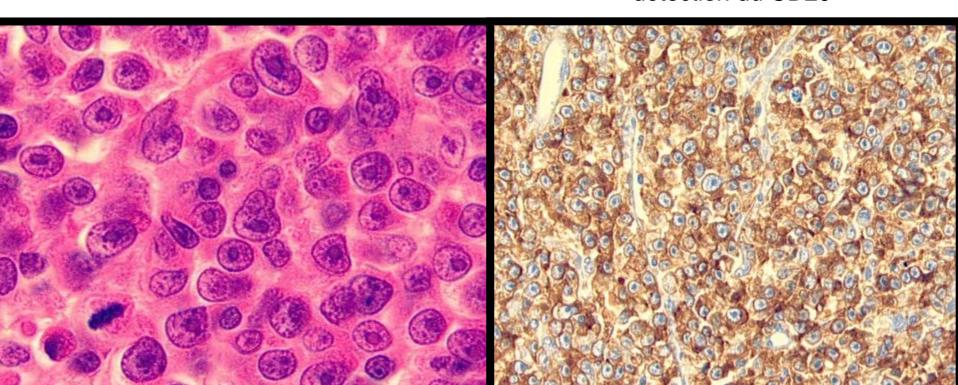
CD 20 protein : a hydrophobic transmembrane protein

Représentation schématique de l'un des anticorps antiCD20 thérapeutique

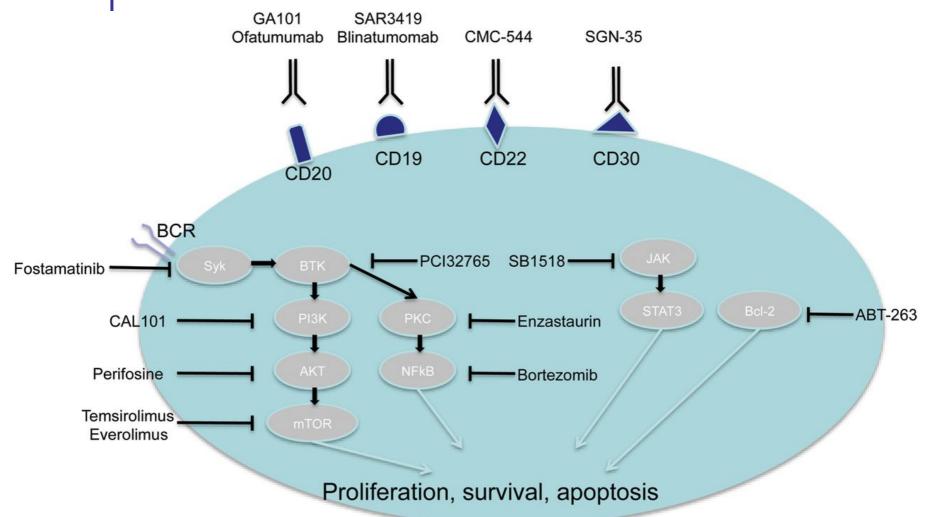
••• Exemple des lymphomes B

Lymphome à grandes cellules B, expression de CD 20, cible du traitement par rituximab (antiCD20)...

détection du CD20



Exemple: anti-CD20; d'autres molécules et cibles en développement



• • Conclusions

Les thérapeutiques ciblées 📥 médecine personnalisée

- Avancées <u>majeures</u> dans les traitements de certaines tumeurs rares avec pauci-altérations géniques, fréquentes (GIST et tumeurs hématologiques)
- Avancées <u>importantes</u> parmi les tumeurs solides les plus fréquentes (sein, poumon, colon), fréquence variable
- Pas de transposition directe d'un modèle tissulaire à l'autre
- Mais <u>résistance secondaires</u> possibles

http://oncomolpath.aphp.fr/



Information sur le site ONCOMOLPATH

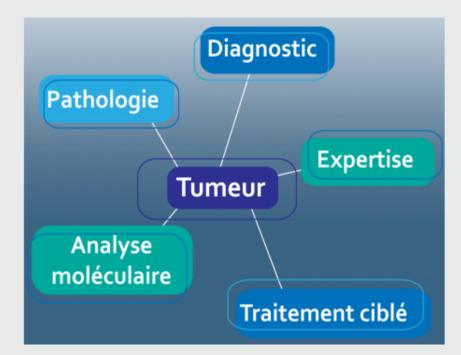
Publié le 18 octobre 2011

Ce site est dédié aux analyses moléculaires qui peuvent être effectuées sur les tumeurs par la plateforme AP-HP d'oncologie et de pathologie moléculaire des cancers. Il est construit autour de la base de données ONCOMOLPATH qui permet d'accéder à des informations médicales et pratiques ainsi qu'à des bons de demande d'analyses téléchargeables concernant l'ensemble des tests effectués par la plateforme. Cette plateforme regroupe les équipes de cancérologie, d'hématologie, de pathologie et de biologie des groupes hospitaliers de l'AP-HP.

Cette base de données est coordonnée par un Comité Editorial et actualisée en temps réel.

ACCES BASE ONCOMOLPATH

Liste des tests moléculaires effectués par la plateforme selon les recommandations de l'INCa



Liens utiles



Institut National du Cancer



Cancéropôle IDF

http://oncomolpath.aphp.fr/

La base de données ONCOMOLPATH permet une recherche rapide des analyses moléculaires réalisées à partir de tissus tumoraux ou non tumoraux par la plateforme de l'AP-HP.

Elle permet d'améliorer le circuit des prescriptions en précisant, pour chaque test, le niveau d'indication (nécessaire, recommandé, exploratoire) grâce à des fiches médicales communes à toute l'AP-HP et téléchargeables. Sont d'ores et déjà disponibles : KRAS dans le cancer du colon, EGFR dans le cancer du poumon, HER2 dans le cancer du sein, MSI dans le cancer du colon, clonalité IgH/TCR dans le lymphome, HER2 dans le cancer de estomac, KIT et PDGFRA dans les GIST (Tumeurs Stromales Gastro-Intestinales), IDH1/IDH2 dans les gliomes, BRAF et c-KIT dans le mélanome.

Un bon de demande d'analyse moléculaire téléchargeable précise, pour chaque site d'analyse, les informations pratiques demandées par les laboratoires.

Enfin, cette base intègre les informations scientifiques mises à jour régulièrement par le comité éditorial de la plateforme.



