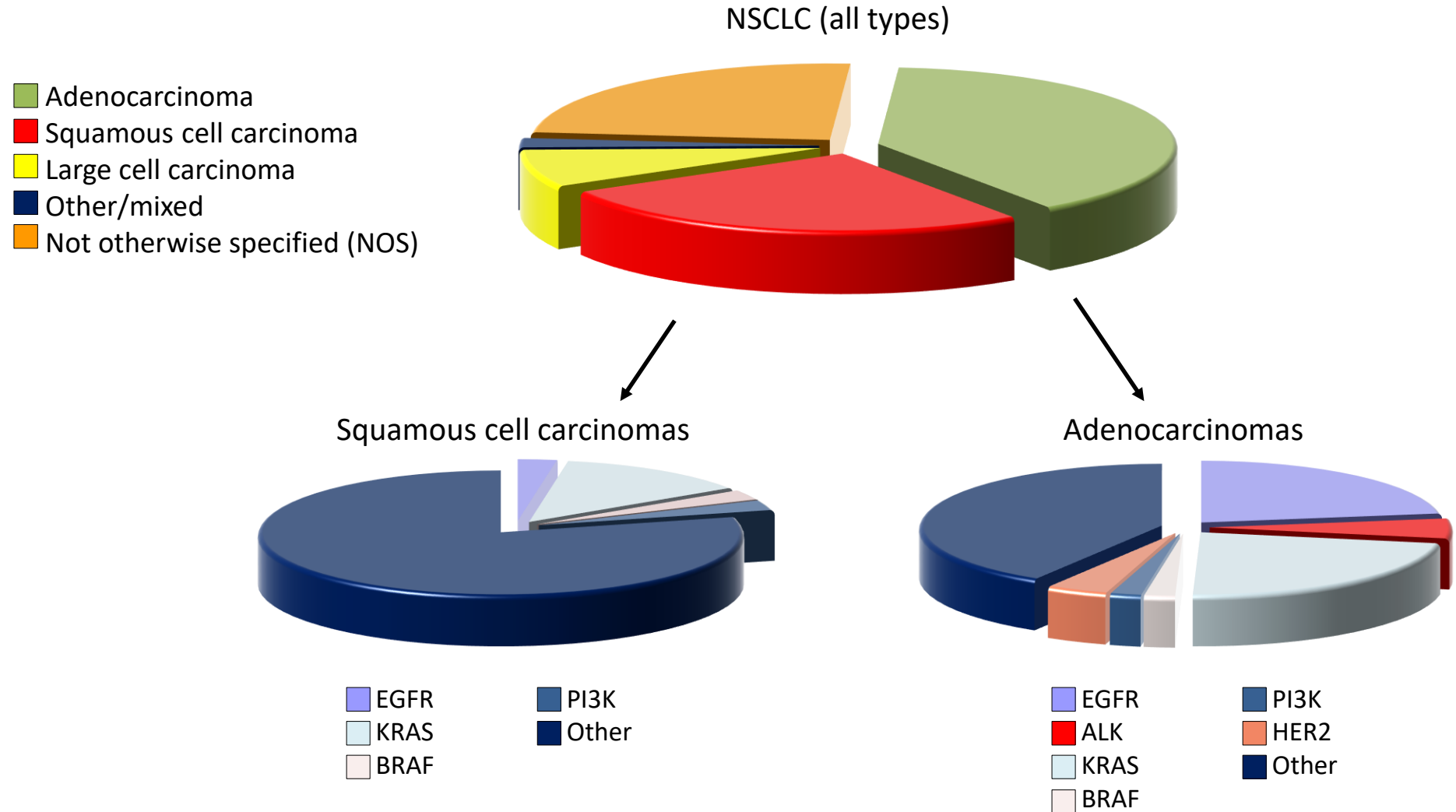


Nouveautés diagnostiques en oncologie thoracique

Dr Adeline Rosoux
Pneumologue

Journée scientifique en oncologie





- Le carcinome bronchique :
 - Première cause de décès par cancer dans le monde
 - Mauvais pronostic
- Avec l'arrivée des nouveaux traitements (TKI, immunothérapie) :
 - Importance d'une caractérisation précise de la tumeur
 - Intérêt du génotypage
 - Proposition un traitement personnalisé
 - Pour connaître pronostic
- Hétérogénéité tumorale
- Lors de la progression : possible changement du profil génétique de la tumeur (ex : mutation T790M)

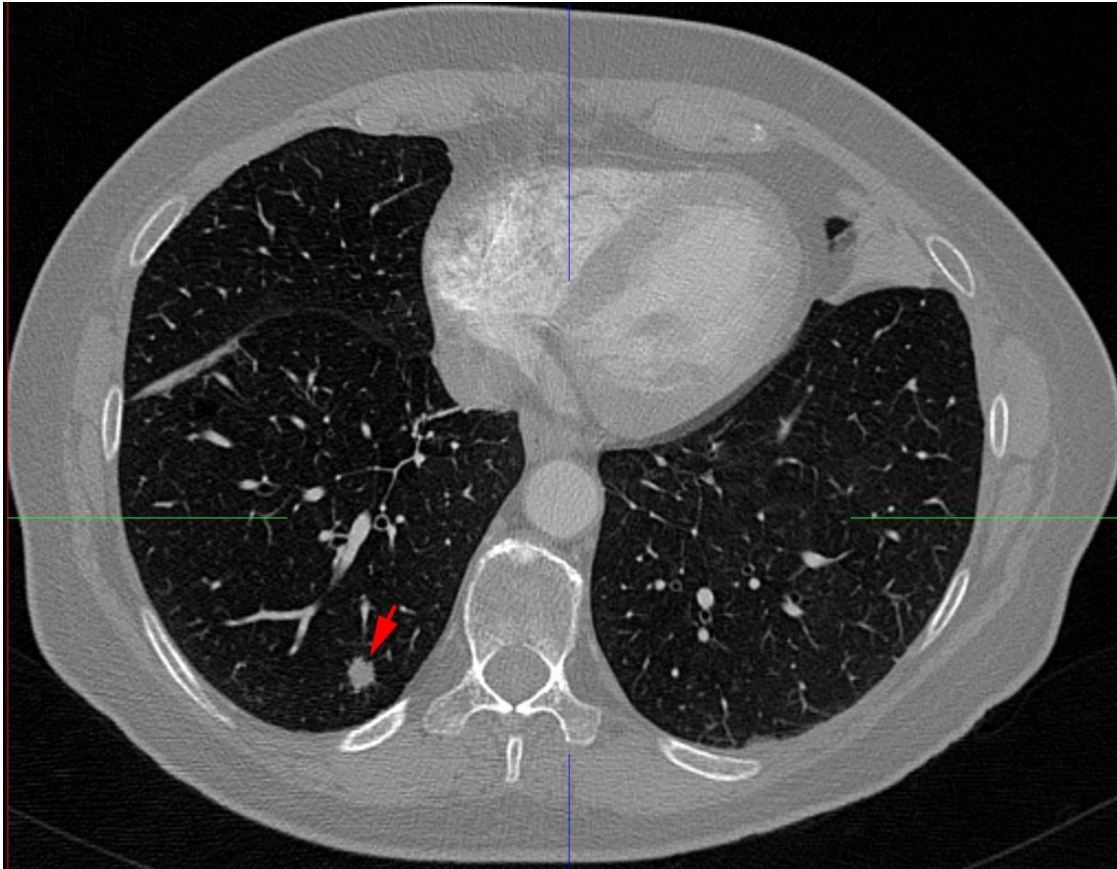
- Pour une caractérisation précise de la tumeur, il faut :
 - Type histologique : NSCLC vs SCLC
 - Immunomarquage : adénoC vs épi vs ...
 - Immunohistochimie : EGFR, PDL1, ...
 - Biologie moléculaire (FISH) : ALK, ROS1, ...
 - Nouvelles techniques de séquençage : NGS (séquençage massif en parallèle d'un panel de gènes déterminés)

→ Nécessité de plus en plus de matériel tumoral lors du diagnostic

- 1960 : introduction de la bronchoscopie flexible comme technique de référence
- Ces dernières décennies, développement de multiples avancées techniques pour augmenter la rentabilité de la bronchoscopie
- Rentabilité de la bronchoscopie dépend :
 - Taille de la lésion
 - Localisation
 - Visibilité endoscopique
 - Nombre de biopsies réalisées (minimum 3)

nodule périphérique (~34%)

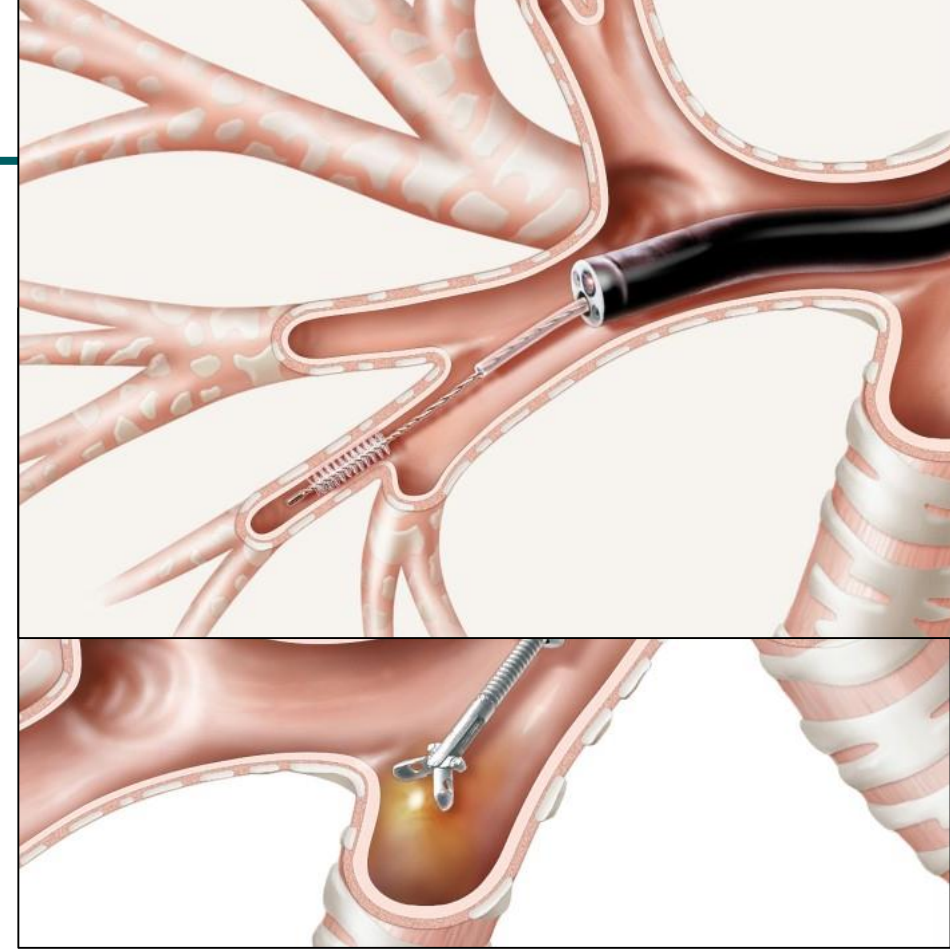
vs masse centrale (~70%)



Bronchoscopie classique

- Différentes techniques :

- Lavage bronchique 48%
- Brosse bronchique 50%
- Biopsies bronchiques (Forceps) 70%
 - Taille prélèvement ~ 0,2 cm
 - Compression mécanique du prélèvement
 - Pince doit être perpendiculaire



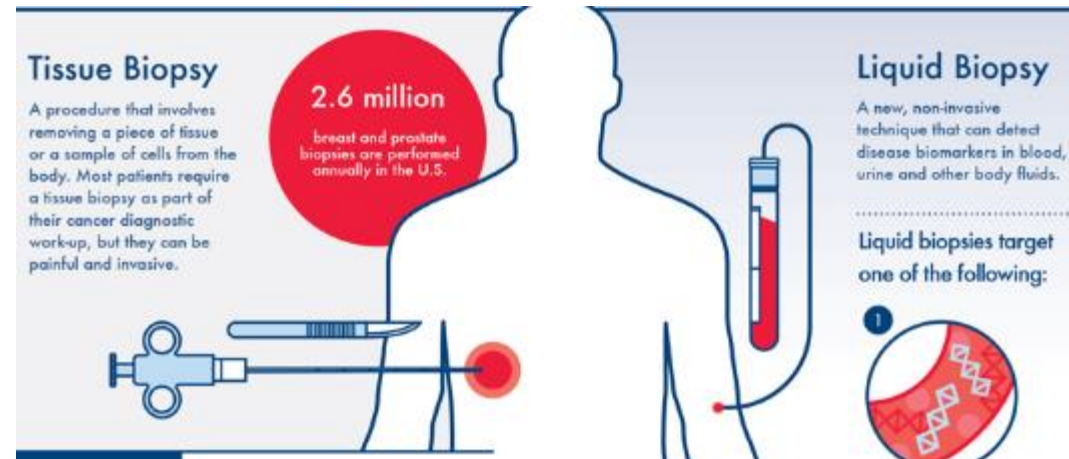
- En combinant les différentes techniques, on augmente la sensibilité
- Complications :
 - Saignement
 - Non-diagnostic → réitérer l'examen ou autre cible → post-posé le R/

Comment améliorer notre rentabilité diagnostique ?

- Cryobiopsie par bronchoscopie



- Biopsie liquide



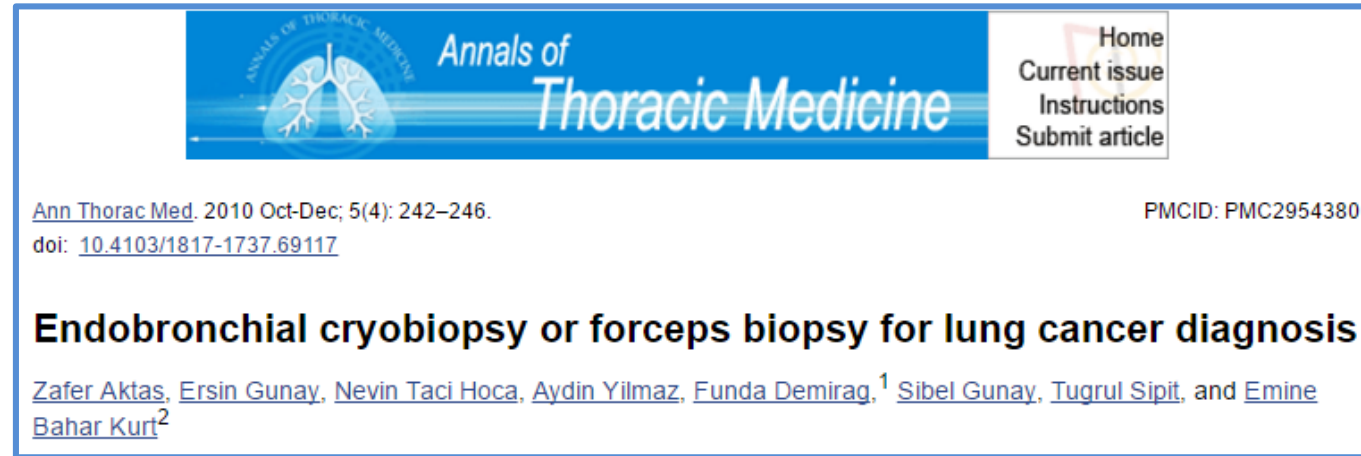
- Vidéo ERBE : <https://www.youtube.com/watch?v=ETOZIk1GaAc>

- **Points forts :**

- Surtout lorsque la tumeur est endobronchique
- Taille du prélèvement ~0,8cm (0,3-4cm) en fonction du temps de cryo
- Altère moins le tissu → meilleure caractérisation de l'architecture tumorale
- Dans le NSCLC, grand partie nécrotique → problème réduit par la taille
- Sonde concentrique → meilleur accès à la tumeur

- **Points faibles :**

- Saignement : taux plus important selon les études mais se traite par geste local (eau froide ou adrénaline)



- 1 des premières études de faisabilité de la cryobiopsie dans le diagnostic oncologique
- 41 patients
- Diamètre moyen tumeur ≥ 3 cm sur le CT
- Localisation : Trachée ou tronc souche dans 34%
- Chaque sujet bénéficiait de 3 biopsies par forceps et 1 cryobiopsie

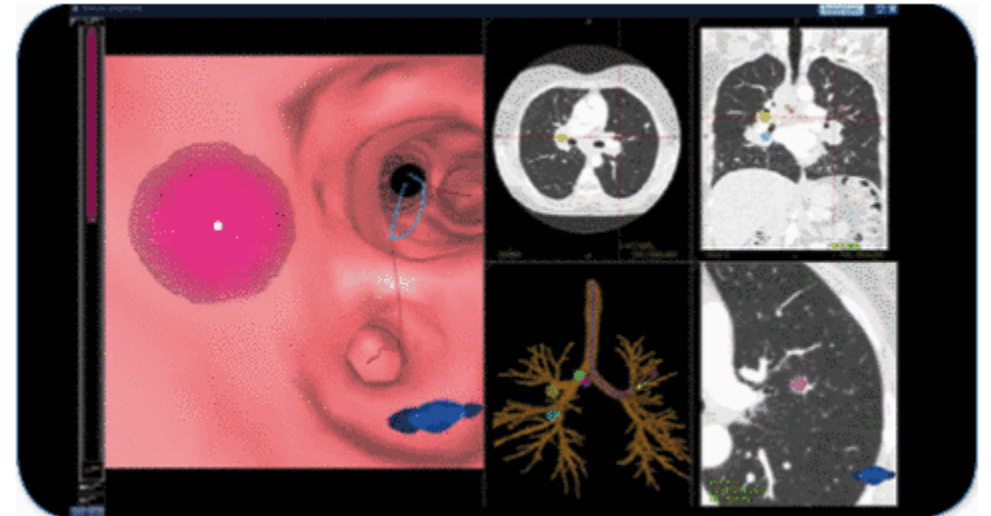
- 32 patients ont été diagnostiqués par biopsies et 38 patients par cryobiopsie

→ **Rentabilité diagnostique : 78% vs 92,7%**

Table 3			
Diagnostic rates for forceps and cryoprobe biopsies (N=41)			
Forceps biopsy	Cryoprobe biopsy		Total, N (%)
	Diagnostic, N (%)	Nondiagnostic, N (%)	
Diagnostic	32 (78)	0	32 (78)
Non-diagnostic	6 (14.6)	3 (7.3)	9 (22)
Total	38 (92.7)	3 (7.3)	41 (100)

- Taille prélèvement : 0,2 (0,1-1cm) vs 0,8 (0,3-4cm)
- Complication : saignement : 34,1% vs 36,6% : non significatif

- **Bronchoscopie sous scopie ou sous CT**
 - Rentabilité ~ 70 %
 - Points négatifs :
 - Irradiation du malade et du médecin
 - Time-consuming
- **Réperage par échographie radiaire (EBUS) lors de la bronchoscopie**
- **Bronchoscopie virtuelle** : logiciel de navigation qui corrèle les images du scanner et la bronchoscopie → sorte de GPS
 - Points négatifs :
 - validation en cours
 - Software puissant
 - Coût et temps
- **Navigation électromagnétique**



→ Plus on combine les techniques, plus on augmente la sensibilité

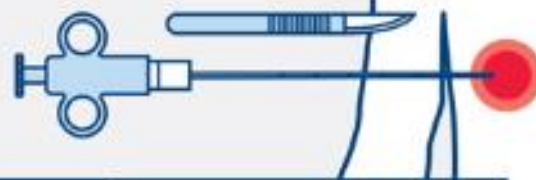
Biopsie liquide

Tissue Biopsy

A procedure that involves removing a piece of tissue or a sample of cells from the body. Most patients require a tissue biopsy as part of their cancer diagnostic work-up, but they can be painful and invasive.

2.6 million

breast and prostate
biopsies are performed
annually in the U.S.



Liquid Biopsy

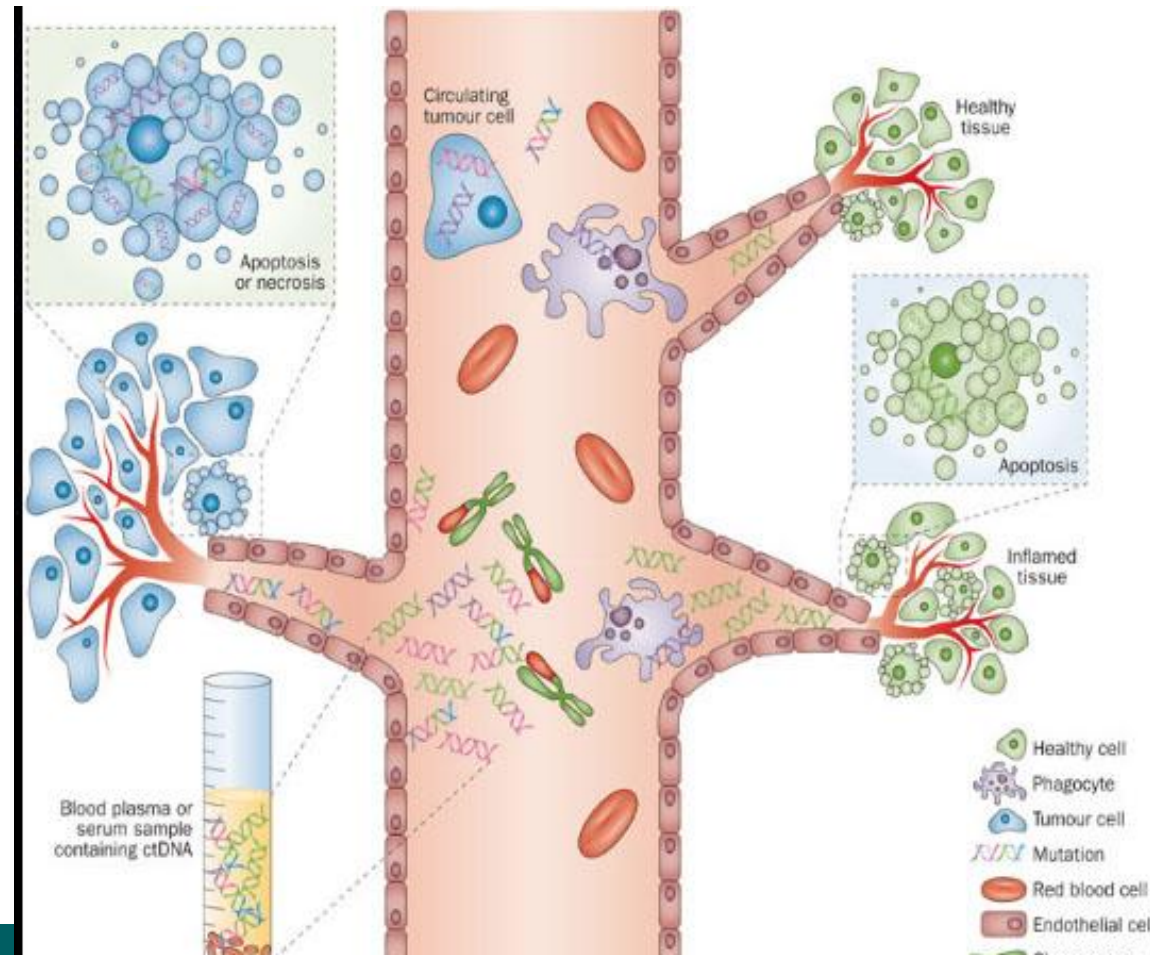
A new, non-invasive technique that can detect disease biomarkers in blood, urine and other body fluids.

Liquid biopsies target one of the following:



Biopsie liquide : Principe

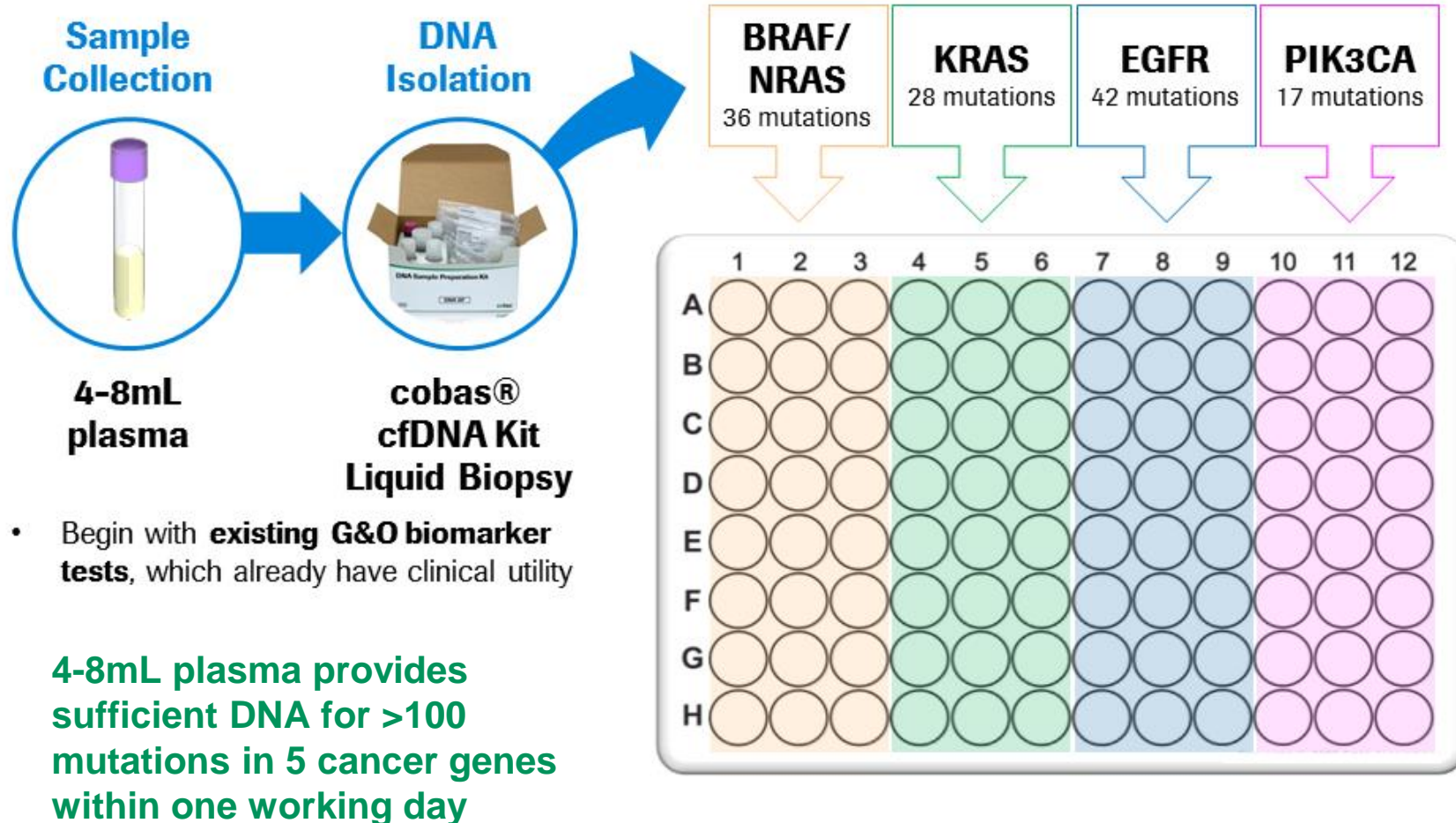
- Rechercher et analyser, dans une simple prise de sang, l'ADN provenant de cellules cancéreuses, que celles-ci soient elles-mêmes circulantes ou encore intégrées dans la tumeur.
- Plusieurs matériels disponibles : ctDNA, CTC, ctRNA, exosomes, ...



- Petits fragments d'ADN tumoral simple ou double-brin
- ctDNA = entre 0,1 et 10% de l'ADN circulant
 - nécessité de méthodes d'amplification (PCR, NGS, ...)
 - Quantité varie en fonction de :
 - Stade tumoral
 - Charge tumorale
 - Vascularisation tumorale
 - Potentiel métastatique
 - Taux d'apoptose
- Dans les stades localisés, ~ 55% ont du ctDNA détectable,
- La proportion augmente en fonction du stade
- Si le cancer est métastatique, ~ 82% ctDNA retrouvé dans les cancers solides

cobas® Oncology Panel

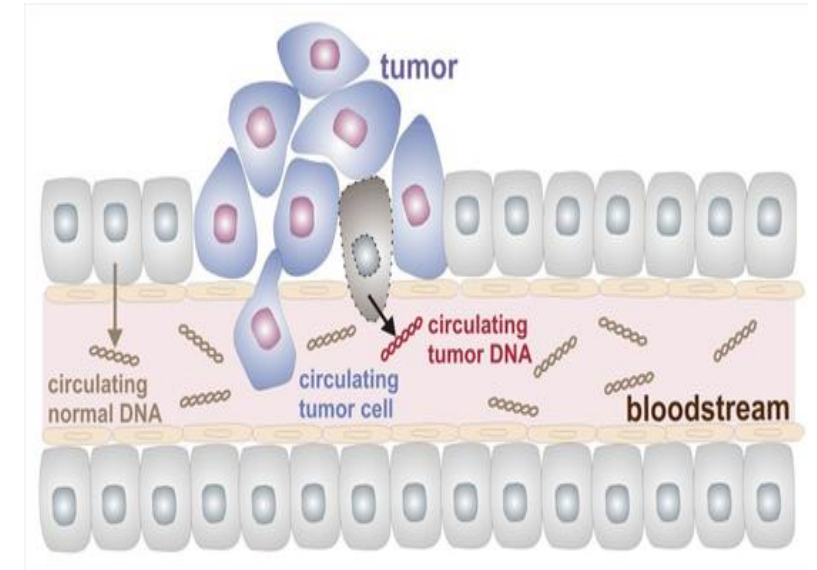
EGFR testing is the first in our strategy



- Permet d'identifier des mutations somatiques telles que :
 - Mutation EGFR
 - Mutation KRAS
 - Challenge technique : pauvre sensibilité (risque de faux négatifs)
 - amplification par PCR ou NGS : sensibilité entre 43 et 90%
 - Spécificité proche de 100%
- Si ctDNA négatif, possible faux négatif**
- si ctDNA positif = résultat positif**

Biopsie liquide : Challenge technique

- **Petits fragments** (160-180bp) < tumeur via apoptose ou nécrose
- **Courte demi-vie** : ~2h
- **Concentration très basse** : très variable < 1% de l'ADN circulant.
- **Si le traitement est efficace**, le nombre diminue.
- **Contamination par de l'ADN normal**



→ **Nécessité d'un équipement spécifique pour la logistique du prélèvement et l'analyse**

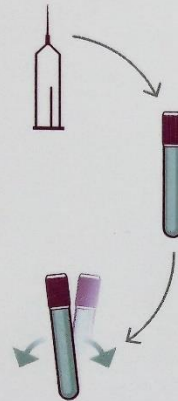


Instructions pour la prise de sang en vue de rechercher l'ADN tumoral circulant (ctDNA)

L'analyse de l'ADN tumoral circulant peut être compromise par la lyse des globules blancs et la libération de leur ADN nucléaire.

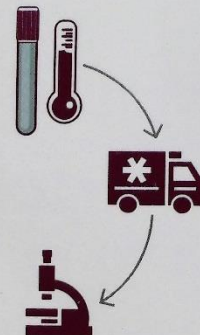
Les points suivants visent à garantir la qualité de l'analyse.

PRISE DE SANG



- Utiliser des tubes spéciaux permettant la stabilisation du sang tels que Streck®, Roche BCT® ou PAXgene®
- Empêcher le reflux
(Il y a des additifs chimiques dans le tube)!
- Remplir le tube en suivant les instructions fournies par le laboratoire d'analyse
- Mélanger immédiatement et **doucement** en suivant les instructions fournies par le laboratoire d'analyse

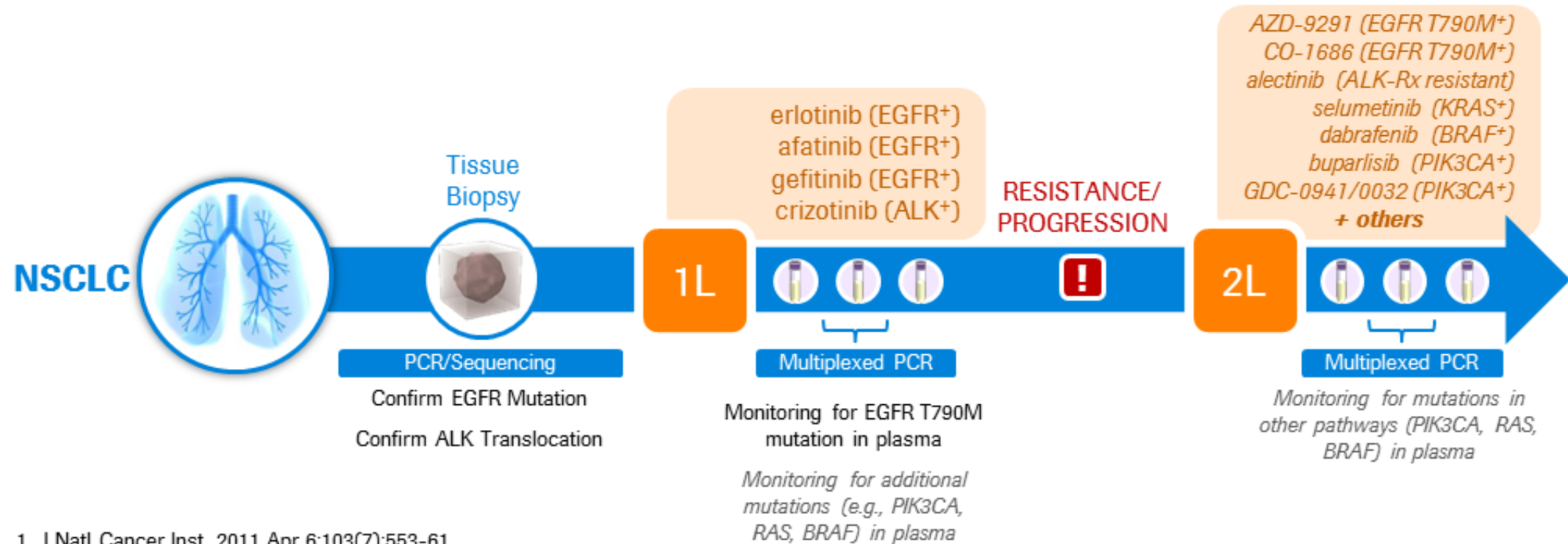
STOCKAGE ET TRANSPORT



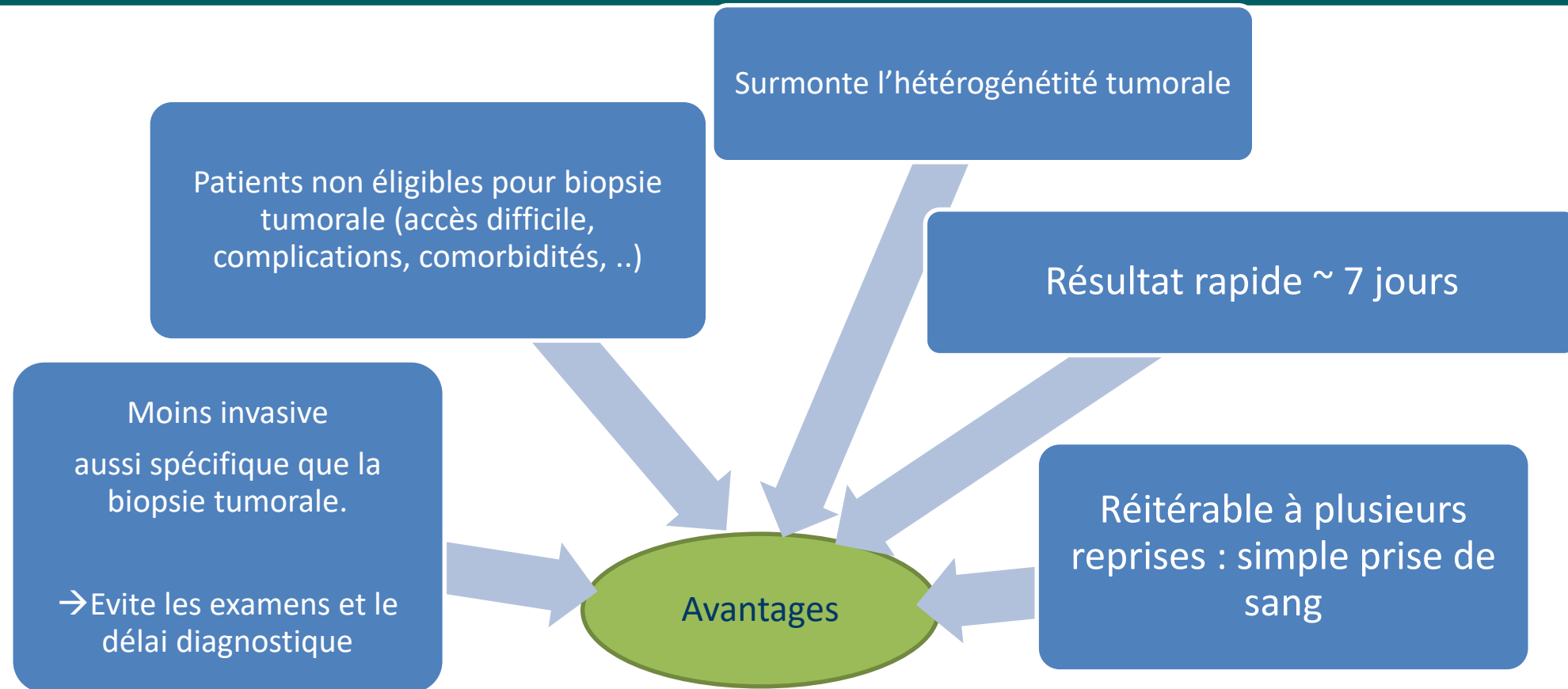
- Stocker le tube de sang à température ambiante
- Envoyer le tube immédiatement (le même jour) au laboratoire d'analyse ou selon les instructions du laboratoire d'analyse
- Certaines marques fournissent des tubes en verre, il est nécessaire de les protéger de manière adéquate pour le transport

- **CTC : cellule tumorale circulante :**
 - Relativement rare : dans NSCLC : 1 cellule pour 10x6 cellules circulantes
 - NSCLC : ~30% cas ont > ou = 2 CTC avant chimio
 - Leur présence serait un reflet de mauvais pronostic (plus petite PFS et moins bonne survie)
 - Meilleur pour utilisation de FISH (→ ALK, ROS1)
- **Ct RNA : circulating tumoral RNA :**
 - Utile pour détection de réarrangement tel que ALK, ROS1, fusion RET, ...
 - Pas encore accessible car techniquement encore plus difficile (dégradation très rapide de l'ARN)
- **Tumor-educated platelets :**
 - Les plaquettes séquestrent l'ARN tumoral
 - Très difficile de les isoler
 - Permet de détecter des réarrangements/ des fusions de gènes tels que réarrangement ALK
- **Exosomes :** petites vésicules relarguées par les cellules
 - Comprend des lipides, protéines, RNA, ADN, ...
 - Le plus difficile à isoler

Biopsie liquide : Intérêts

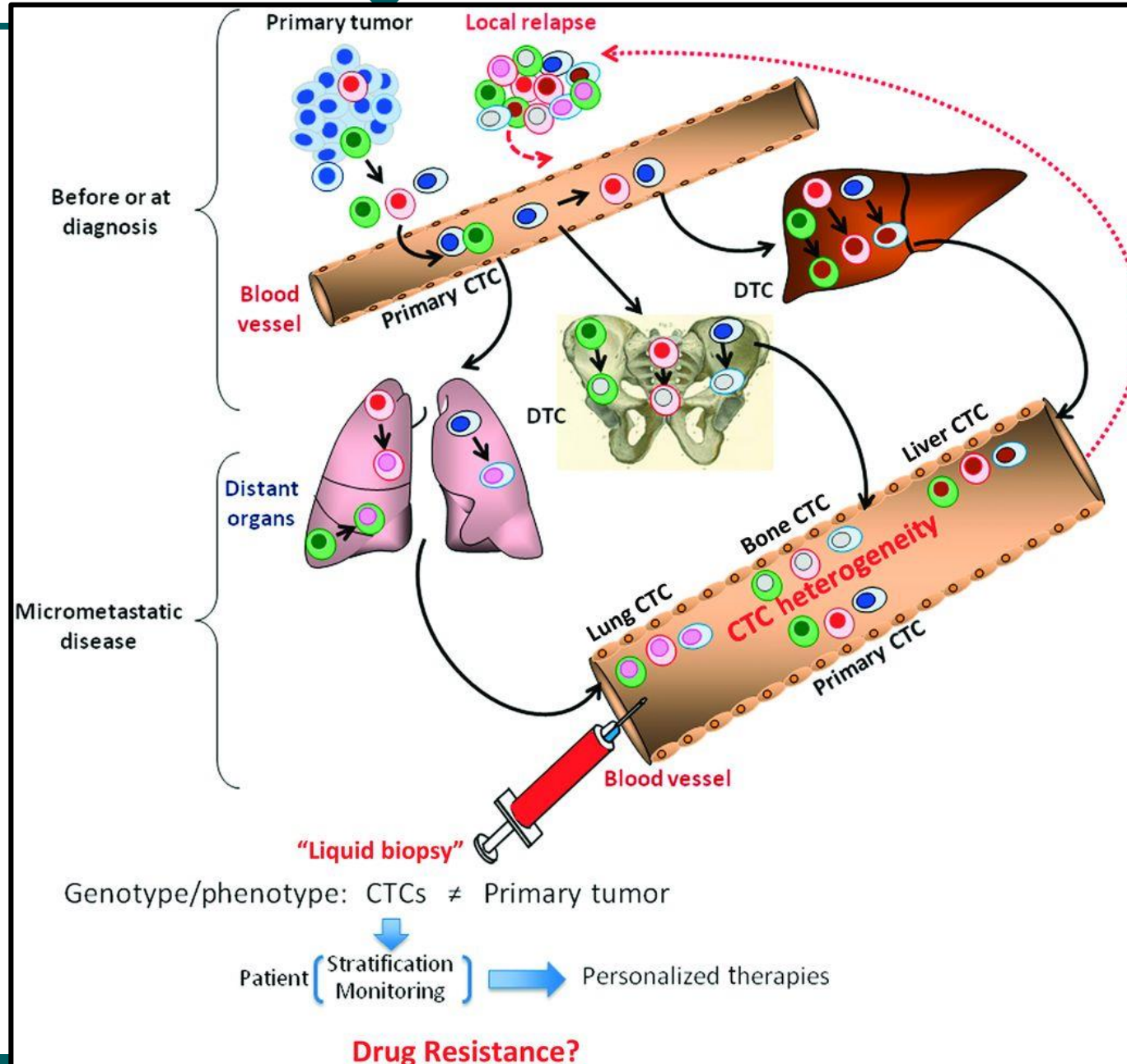


1 J Natl Cancer Inst. 2011 Apr 6;103(7):553-61.



Considérer biopsie tumorale si ctDNA est négatif (haut taux de faux négatif)

ctDNA représente l'hétérogénéité tumorale



Material	Applications
Circulating tumor DNA (ctDNA)	Somatic mutations ^a DNA methylation changes Copy number alterations
ctRNA	Gene fusion Splicing variants
Tumor-educated platelets	Gene fusions Splicing variants Cancer diagnosis RNA profiling
Exosomes	Gene fusions Splicing variants miRNA analyses RNA and protein-based molecular profiling
Circulating-tumor cells (CTCs)	Monitoring (total CTC counts) ^b Culture of CTCs DNA, RNA, and protein-based molecular profiling Somatic mutations Gene fusions

EGFR

Exemple

TYPE AANGEVRAAGD ONDERZOEK			
Recent volledig aanbod van alle onderzoeken: http://www.uza.be/pathologische-anatomie : labogids, onderzoeken, index			
MOLECULAIRE PATHOLOGIE			
Longcarcinoom		Colorectaal carcinoom	
<input type="checkbox"/> Next-generation-sequencing: ALK, BRAF, CDKN2A, DDR2, EGFR, ERBB2, KRAS, MET, PIK3CA, RET en ROS1	<input type="checkbox"/> ALK (2p23) translocatie	<input type="checkbox"/> Next-generation-sequencing: BRAF, CTNNB1, HRAS, KRAS, NRAS en PIK3CA	<input type="checkbox"/> BRAF mutatieanalyse mbv Idylla
<input type="checkbox"/> ALK IHC: <input type="checkbox"/> negatief <input type="checkbox"/> positief <input type="checkbox"/> nog niet uitgevoerd	<input type="checkbox"/> ROS1 (6q22) translocatie	<input type="checkbox"/> MSI fragmentanalyse	<input type="checkbox"/> MSI IHC: <input type="checkbox"/> verlies van expressie
<input type="checkbox"/> c-MET (7q31) genamplificatie	<input type="checkbox"/> EGFR mutatieanalyse mbv ddPCR (enkel plasma)	<input type="checkbox"/> behoud van expressie	<input type="checkbox"/> nog niet uitgevoerd
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Initieel/ Diagnose <input type="checkbox"/> Monitoring/follow-up	<input type="checkbox"/> RET (10q11) translocatie	Melanoom	
Hersentumoren	<input type="checkbox"/> 1p/19q deletie	<input type="checkbox"/> Next-generation-sequencing: BRAF, KIT, NRAS	<input type="checkbox"/> BRAF mutatieanalyse (mbv Idylla)
<input type="checkbox"/> IDH1/2 mutatieanalyse	<input type="checkbox"/> BRAF V600 mutatieanalyse (mbv Idylla)	<input type="checkbox"/> ALK IHC	Gastro-Intestinale Stromale Tumor (GIST)
<input type="checkbox"/> c-MYC (8q24) genamplificatie	<input type="checkbox"/> MGMT hypermethylatie	<input type="checkbox"/> Next-generation-sequencing: BRAF, KIT, PDGFRA	Sarcoom
<input type="checkbox"/> EGFR genamplificatie*	<input type="checkbox"/> CTNNB1 (beta-catenine) mutatieanalyse	<input type="checkbox"/> c-MYC (8q24) genamplificatie	<input type="checkbox"/> CHOP / DDIT3 (12q13) translocatie
Lymfoom	<input type="checkbox"/> ALK (2p23) translocatie	<input type="checkbox"/> SYT / SS18 (18q11.2) translocatie	<input type="checkbox"/> PDGFRB (22q13) translocatie
<input type="checkbox"/> BCL2/IGH t(14;18) translocatie	<input type="checkbox"/> c-MYC (8q24) translocatie	<input type="checkbox"/> CDK4 (12q13) genamplificatie	<input type="checkbox"/> FUS (16p11) translocatie
<input type="checkbox"/> CCND1 / CyclineD1 (11q13) translocatie	HPV detectie (PCR)	<input type="checkbox"/> EWSR (22q12) translocatie	<input type="checkbox"/> MDM2 (12q15) genamplificatie
<input type="checkbox"/> High-risk (cervixcytologie)	Aanvraag in kader van:	Mamma/ ovariumcarcinoom	
<input type="checkbox"/> screening	<input type="checkbox"/> follow-up	<input type="checkbox"/> HER2/ neu genamplificatie	HER2 IHC score: <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1+ <input type="checkbox"/> 2+ <input type="checkbox"/> 3+ <input type="checkbox"/> onbekend
<input type="checkbox"/> op vraag van arts/patiënt*	<input type="checkbox"/> High en low-risk (FFPE of wisser) *	<input type="checkbox"/> Next generation sequencing: BRCA1 en BRCA2	Maag/ oesofaguscarcinoom
<input type="checkbox"/> High en low-risk (FFPE of wisser) *	Diverse tumoren	<input type="checkbox"/> HER2/ neu genamplificatie	HER2 IHC score: <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1+ <input type="checkbox"/> 2+ <input type="checkbox"/> 3+ <input type="checkbox"/> onbekend
<input type="checkbox"/> Next-generation-sequencing ClearSeq Cancer panel: ABL1, AKT1, ALK, AR, ATM, BRAF, CDKN2A, CSF1R, EGFR, ERBB2, ERBB4, FANCA, FANCC, FANCF, FANCG, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, JAK3, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K4, MET, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PIK3R1, PTEN, RET, RUNX1, SMAD4, SMO, SRC, STK11, TP53, VHL, WT1*	<input type="checkbox"/> CTNNB1 (beta-catenine) mutatieanalyse	Next generation sequencing: BRCA1 en BRCA2	
<input type="checkbox"/> Next generation sequencing: BRCA1 en BRCA2	(In het kader van erfelijkheidsadvies is het aangewezen zijn om de analyse eveneens op bloed te laten uitvoeren. Voeg hiervoor 2x5ml EDTA tubes bij de aanvraag. Analyse wordt uitgevoerd door Centrum Medische Genetica UZA).		
<input type="checkbox"/> Andere:			
DIAGNOSTIEK ALGEMEEN			
<input type="checkbox"/> Consult (histopathologisch onderzoek)	Immuunhistochemisch (IHC) onderzoek		
<input type="checkbox"/> Immuunfluorescentie (IF) onderzoek	<input type="checkbox"/> ATRX	<input type="checkbox"/> MSI (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6), gevolgd door MSI PCR indien IHC twijfelachtig	
<input type="checkbox"/> Elektronenmicroscopisch onderzoek	<input type="checkbox"/> CD117	<input type="checkbox"/> p57	
<input type="checkbox"/> Andere:	<input type="checkbox"/> DOG1	<input type="checkbox"/> PD1	
	<input type="checkbox"/> EGFR	<input type="checkbox"/> PDL1	
	<input type="checkbox"/> HER2/neu	<input type="checkbox"/> PDL1	
	<input type="checkbox"/> Andere:		

Kliniek

Rechter long, adenocarcinoom.

Type aangevraagd onderzoek: ddEGFR-plasma.

Macroscopie

We ontvingen één streck tube met referentienummer 8479123.

Microscopie

DNA extractie werd uitgevoerd op 2-4 ml plasma. Extractie uit het plasma leverde DNA met acceptabele kwaliteit voor mutatieanalyse.

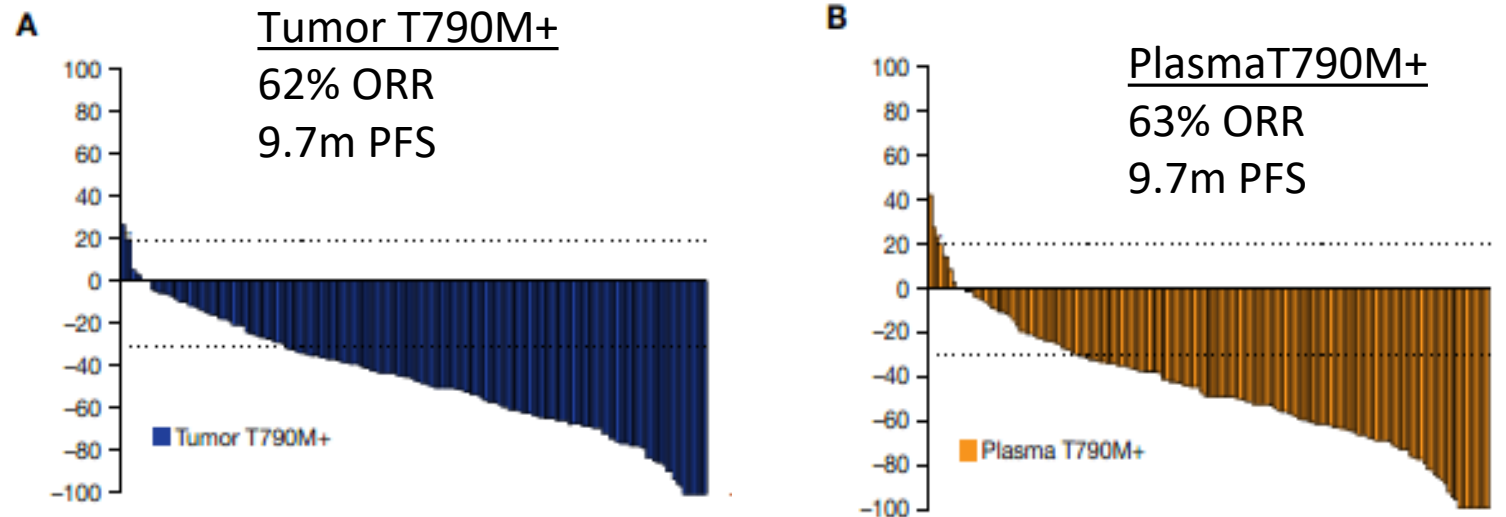
EGFR mutatieanalyse werd uitgevoerd d.m.v. digitale droplet PCR technologie gebruikmakend van Taqmanprobes die mutaties en/deleties herkennen t.h.v. exon 18 (c.2155G>A/T/C), exon 19 (≈c.2235_2249del), exon 20 (c.2369C>T), exon 21 (c.2573T>G en c.2582T>A) met een detectiegrens van ongeveer 0.03%. Mutaties in deze codons zijn verantwoordelijk voor > 95% van de EGFR gemuteerde NSCLC.

Volgende bevindingen werden geobserveerd:

test	resultaat	opmerking
EGFR p.(Gly719X)	geen mutatie gedetecteerd	-
EGFR ≈ p.(Glu746_Ala750del)	geen mutatie gedetecteerd	-
EGFR p.(Thr790Met)	geen mutatie gedetecteerd	-
EGFR p.(Leu858Arg)	geen mutatie gedetecteerd	-
EGFR p.(Leu861Gln)	geen mutatie gedetecteerd	-

Diagnose

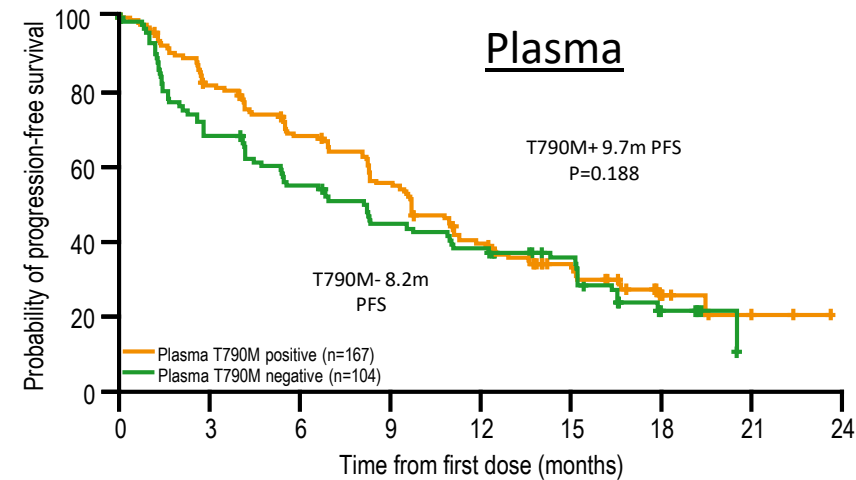
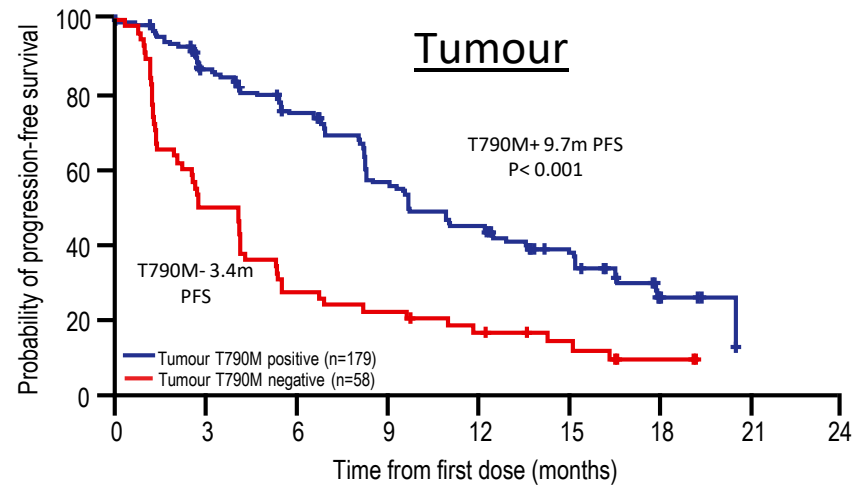
- Indication et remboursement du Tagrisso (Osertimib)
 - Analyse de la mutation sur plasma (n=271 patients) pour T790M, Del19, & L858R chez les patients sous Tagrisso doses (20-240mg)



Présence de la T790M sur le plasma prédit un haut taux de réponse et une PFS prolongée, de manière identique au résultat donné sur la tumeur !

Que veulent dire les faux négatifs ?

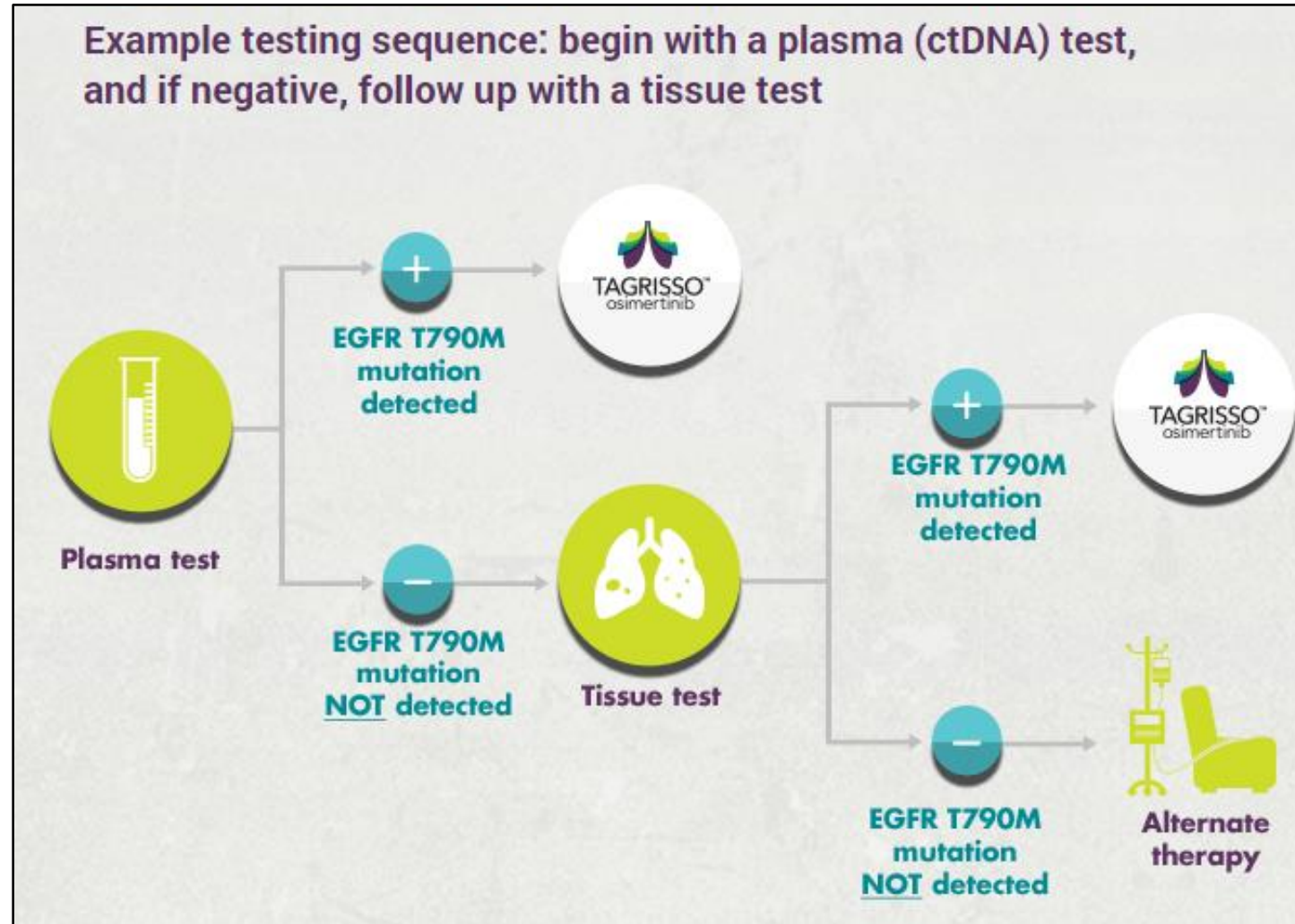
- Oxnard G, Thress K, et al, Journal of Clinical Oncology 2016
- Oxnard G, et al. ELCC 2016; Abstract 1350_PR



Si la tumeur n'exprime pas la T790M → mauvais résultat

Si T790M negative sur plasma, il existe un taux de réponse mais moindre → risque de faux négatifs

Exemple du Tagrisso



Biopsie liquide ne remplace pas la biopsie tumorale

- La biopsie liquide reste en cours de validation et d'application
- Complément d'information si prélèvement insuffisant ou patient non éligible pour une nouvelle biopsie tumorale
- Pas d'analyse morphologique de la cellule tumorale
>< pas nécessaire lors de la progression
- Challenge technique / coût
- Taux de faux négatifs
>< Réitérer le test : simple prise de sang
- Analyse dynamique de la tumeur ?
- Détection précoce du cancer dans le futur ?

Le traitement du cancer devient de plus en plus spécifique et personnalisé

- Importance de la caractérisation complète de la tumeur lors du diagnostic
- Importance d'un traitement fondé sur le génotype précis de la tumeur
 - Importance des prélèvements
- Sans perdre du temps dans le délai diagnostique !

Merci de votre attention !
Avez-vous des questions ?