

RNAseq en théranostique ciblée

Adrien Buisson, Lyon - Alexandre Harlé, Nancy & Paul Hofman, Nice



RNAseq : État des lieux

Pr. Alexandre Harlé – 10 Décembre 2022



LIENS D'INTÉRÊT

Alira Health (Honoraria)
Amgen (Hospitality, travels and honoraria)
Apelo Consulting (Honoraria)
Archer Invitae (Hospitality, travels and honoraria)
AstraZeneca (Hospitality, travels and honoraria and clinical trials grants)
B3TSI (Honoraria)
Biocartis (Hospitality, travels and honoraria)
BioRad (Honoraria)
Boehringer Ingelheim (Hospitality)
BMS (Hospitality, travels and honoraria)
Decibio (Honoraria)
Diaceutics (Honoraria)
GSK (Hospitality, travels and honoraria)
HederaDX (Honoraria)
Icomed (Honoraria)
Illumina (Hospitality and travels)
Janssen (Honoraria)
Merck Serono (Hospitality, travels and honoraria and clinical trials grants)
MSD (Hospitality and honoraria)
Novartis (Hospitality, travels and honoraria and clinical trials grants)
Pfizer (Hospitality, travels and honoraria)
Pierre Fabre (Honoraria)
QualWorld (Honoraria)
Roche (Hospitality, travels and honoraria)
Sanofi (Hospitality, travels and honoraria)
Sophia Genetics (Hospitality, travels and honoraria)
Sysmex Inostics (Hospitality and travels)
Tesaro (Hospitality, travels and honoraria and clinical trials grants)



Origine des gènes de fusion

- « Gènes hybrides » : fusion de deux gènes en un seul avec production d'une nouvelle protéine.
- Celles-ci sont principalement dues à des translocations d'ADN, mais aussi parfois résultent d'insertions, d'inversions, de duplications ou de délétions d'ADN¹.
- Les événements de saut d'exon, l'excision erronée d'un ou plusieurs exons lors de l'épissage de l'ARN, conduisent également à des gènes pathologiques.
- Ils jouent un rôle important dans la cancérogenèse¹ et, de ce fait, sont des cibles privilégiées en médecine de précision^{2,3}.

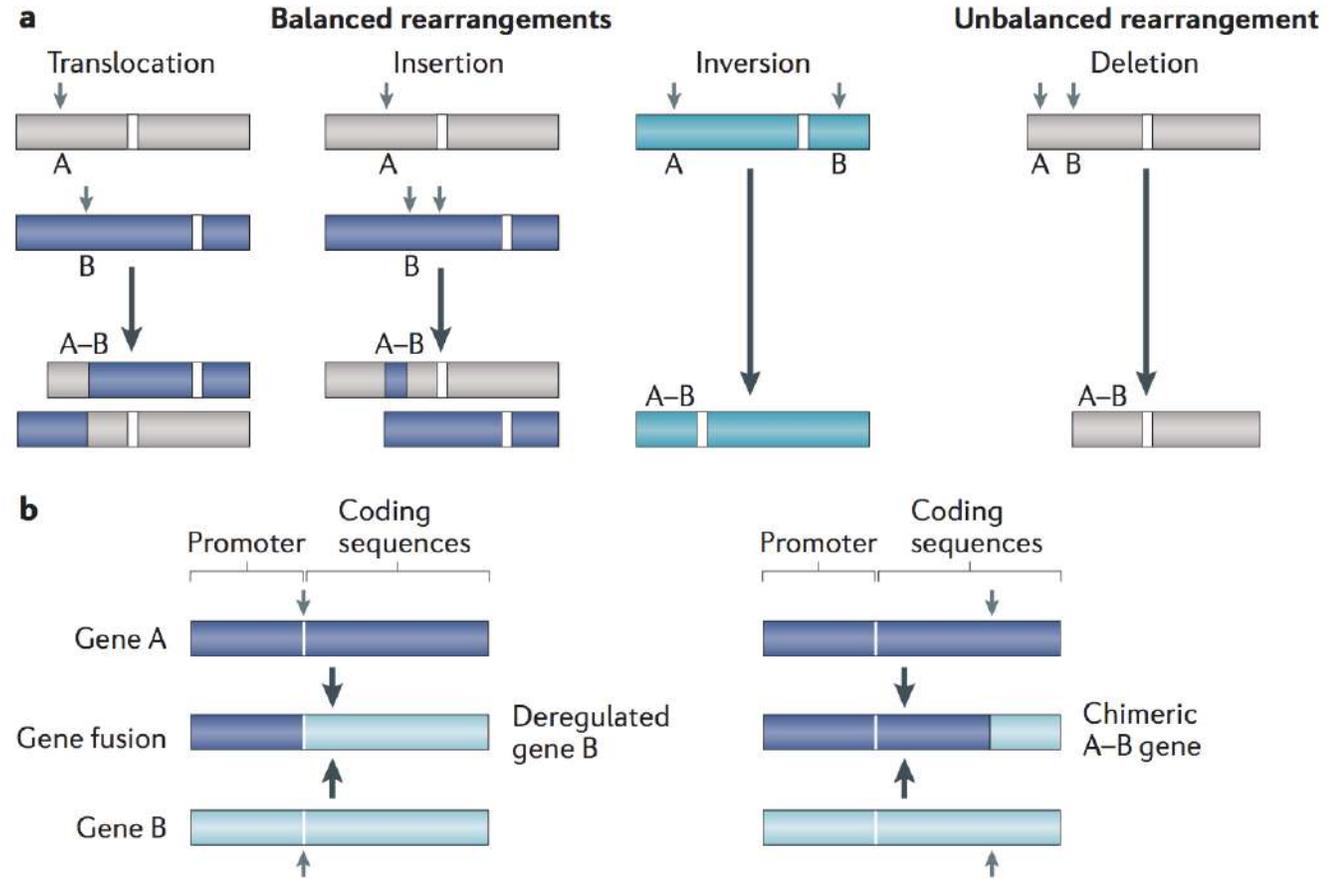


Figure: The chromosomal basis of gene fusions⁴

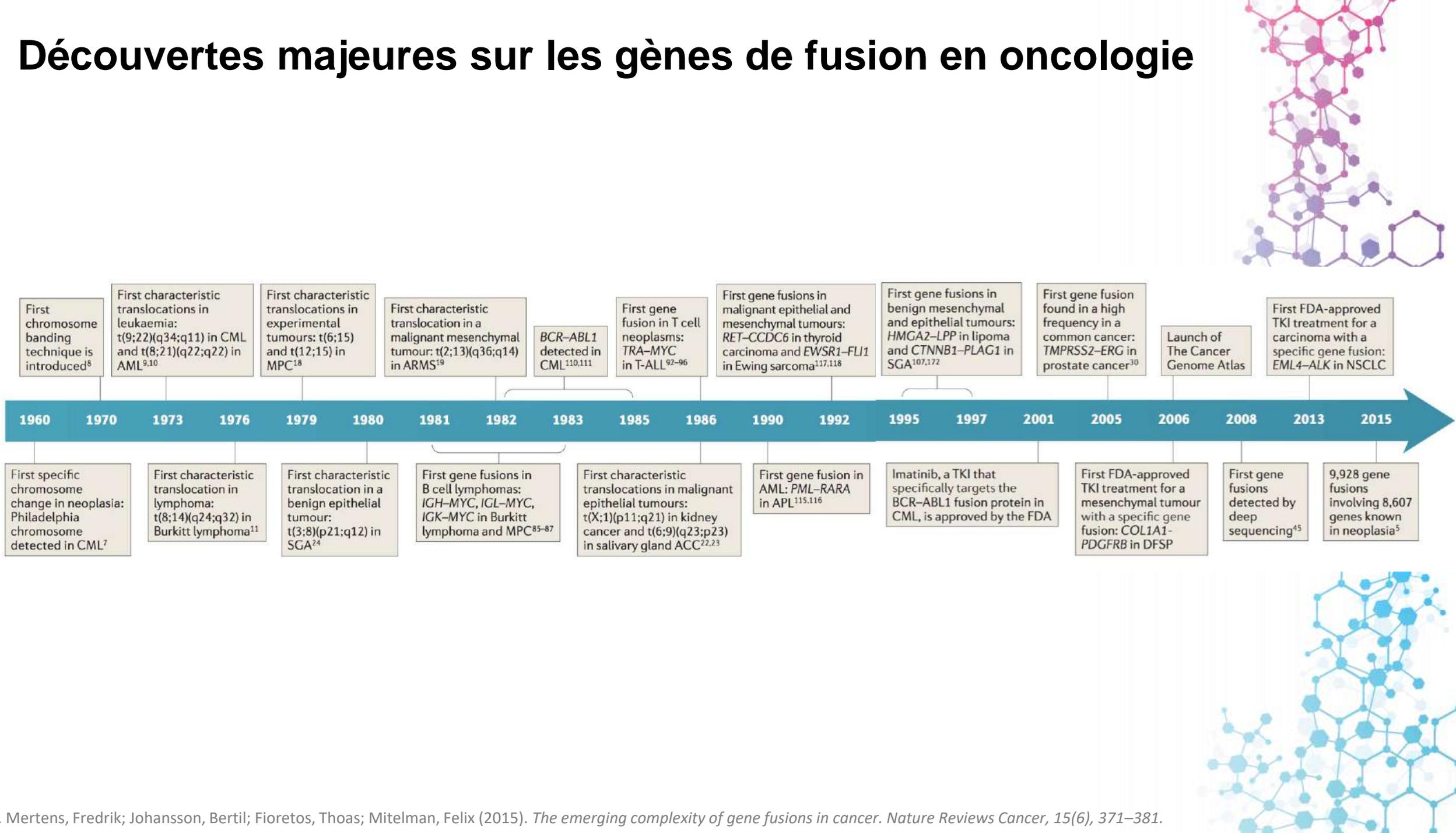
1. Mitelman F, Johansson B, Mertens F (eds.) (2016) Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer, <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.

2. Taniue K, Akimitsu N. Fusion Genes and RNAs in Cancer Development. *Noncoding RNA*. 2021 Feb 4;7(1):10.

3. Brien GL, Stegmaier K, Armstrong SA. Targeting chromatin complexes in fusion protein-driven malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2019 May;19(5):255-269.

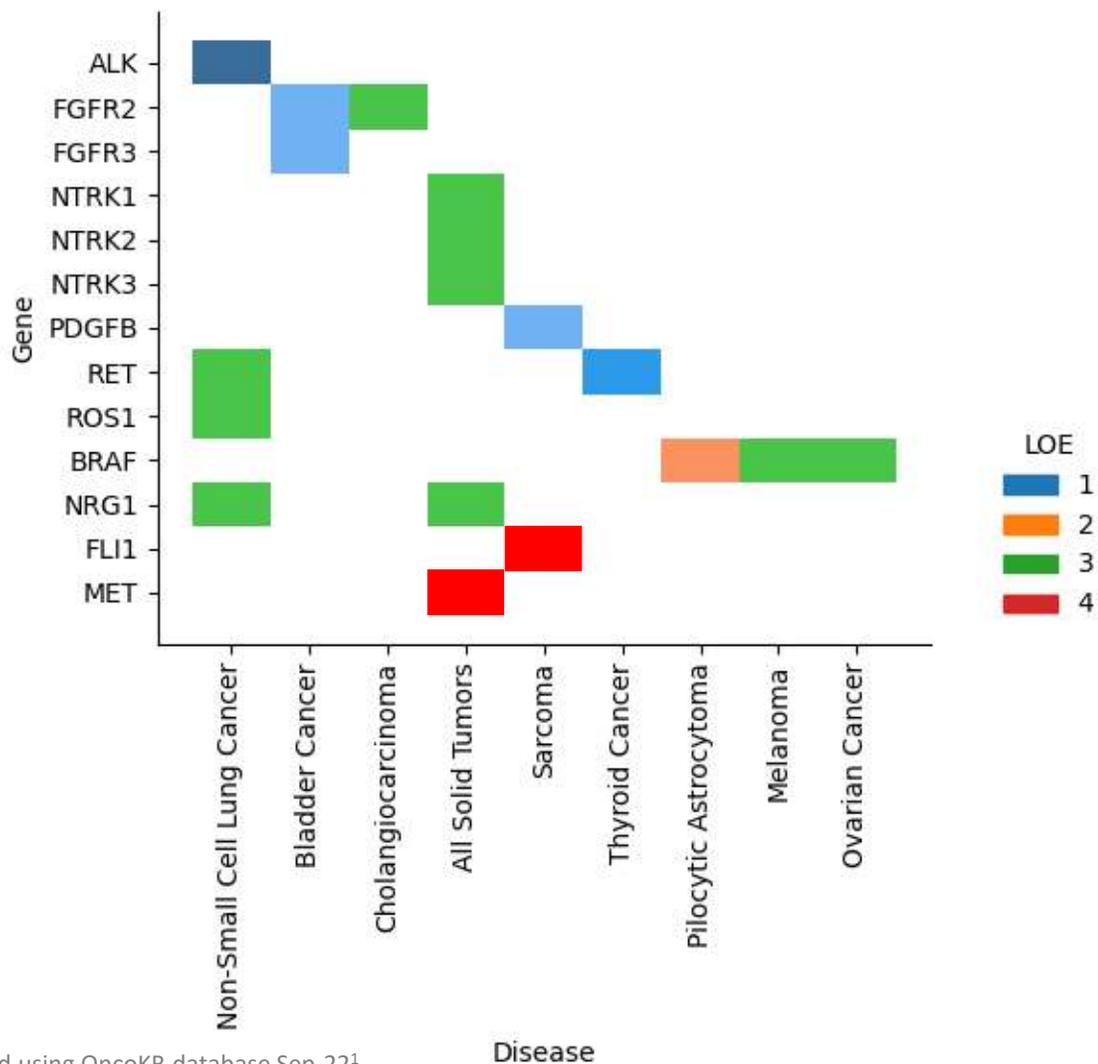
4. Mertens, Fredrik; Johansson, Bertil; Fioretos, Thoas; Mitelman, Felix (2015). *The emerging complexity of gene fusions in cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 15(6), 371–381.

Découvertes majeures sur les gènes de fusion en oncologie

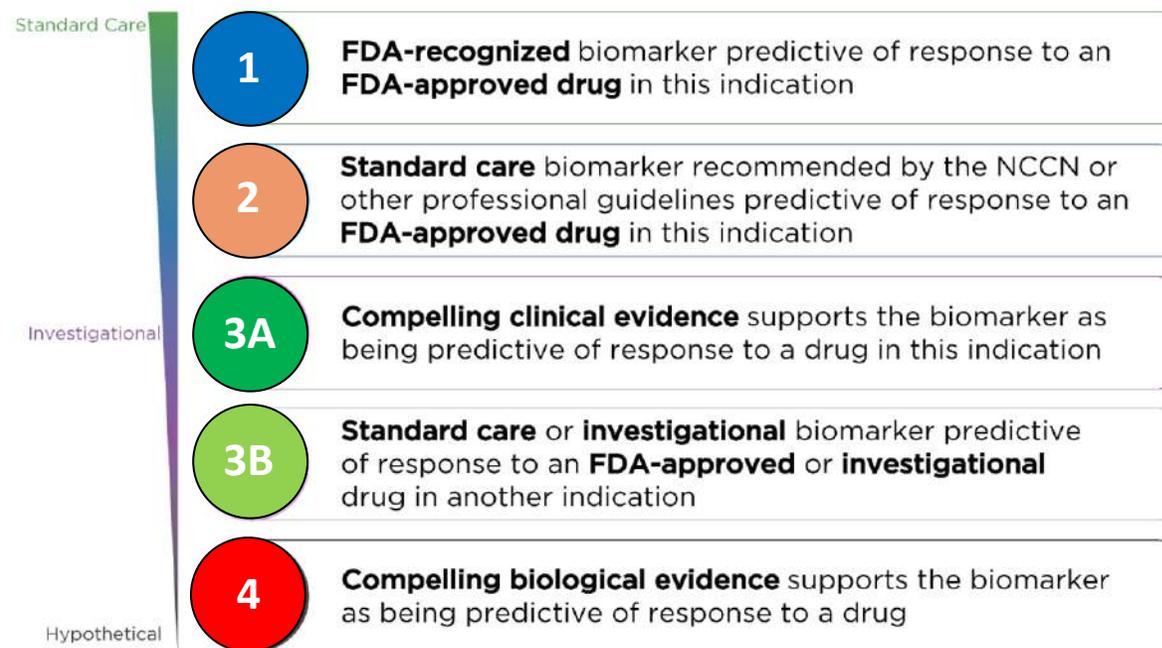


Les fusions en médecine de précision

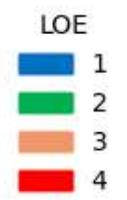
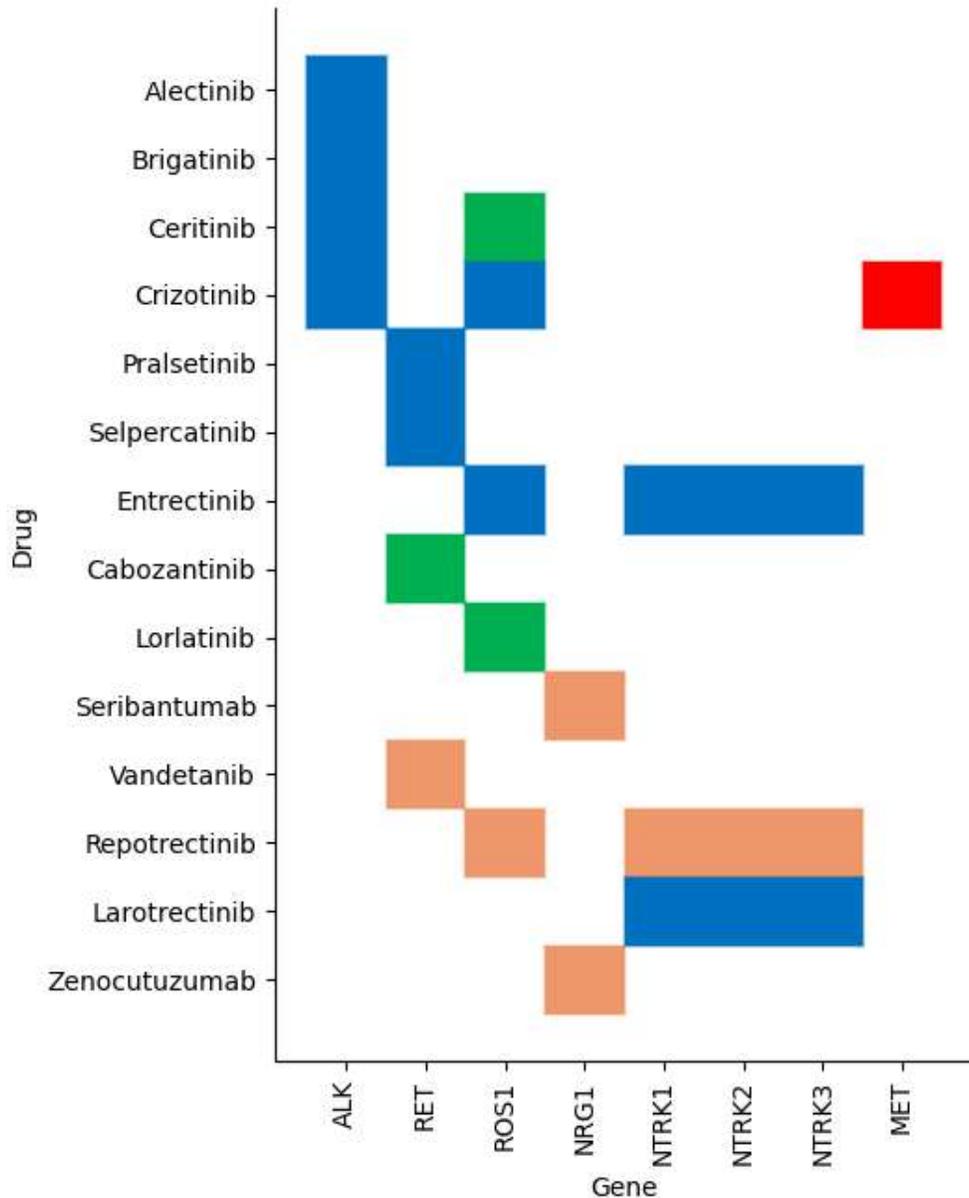
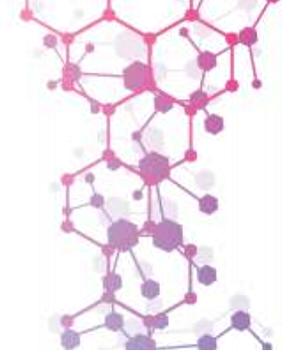
- 22 molécules avec un LOE de 1 à 4 associées avec des fusions



OncoKB™ Therapeutic Level of Evidence V2



Nombreux développements dans les NSCLC



OncoKB™ Therapeutic Level of Evidence V2

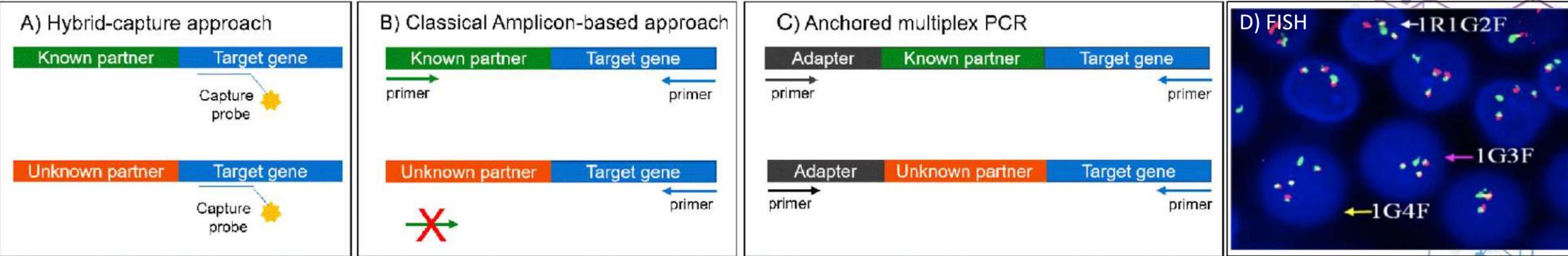
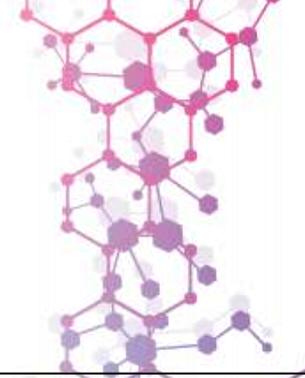
- 1** **FDA-recognized** biomarker predictive of response to an **FDA-approved drug** in this indication
- 2** **Standard care** biomarker recommended by the NCCN or other professional guidelines predictive of response to an **FDA-approved drug** in this indication
- 3A** **Compelling clinical evidence** supports the biomarker as being predictive of response to a drug in this indication
- 3B** **Standard care** or **investigational** biomarker predictive of response to an **FDA-approved** or **investigational** drug in another indication
- 4** **Compelling biological evidence** supports the biomarker as being predictive of response to a drug





Quelles méthodes pour détecter les fusions ?

Plusieurs techniques disponibles



Représentation schématique des principales approches ciblées par NGS pour les tests de fusion de gènes.

(A) Hybrid-capture : Enrichissement spécifique d'un gène par une étape d'hybridation avec des sondes d'ADN ou d'ARN biotinylées spécifiques des régions d'intérêt.

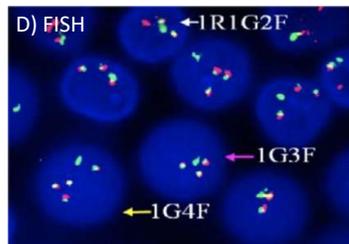
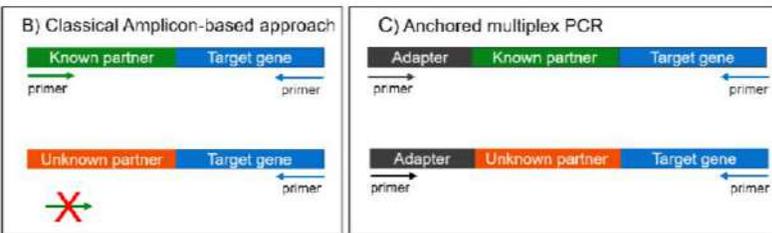
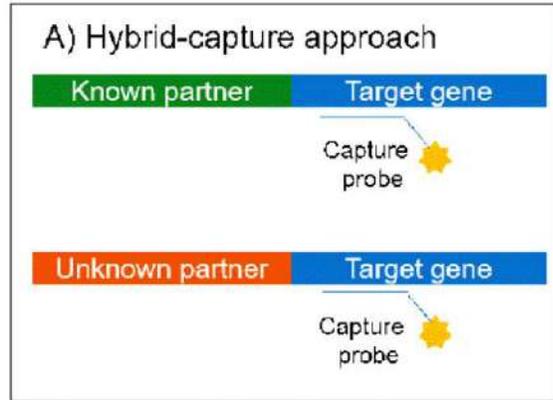
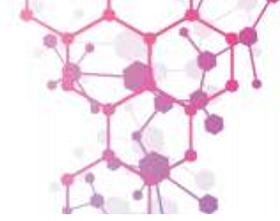
(B) Approche classique basée sur les amplicons : Enrichissement de la cible par une PCR multiplex à l'aide d'amorces spécifiques à une fusion.

(C) Anchored Multiplex PCR : Un seul partenaire de fusion ciblé. Un adaptateur NGS est ligaturé à des fragments d'ADNc, l'enrichissement cible est basé sur l'amplification entre des amorces spécifiques au gène et une amorce à l'adaptateur.

(D) Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)



Comparison



	PROS	CONS
Hybrid-capture	<ul style="list-style-type: none"> • Characterization of both known and unknown fusion variants of target genes • Easily scalable to large gene panels • Adequate for DNA and RNA gene fusion analysis • At DNA level it does not require RNA purification and allows a simultaneous analysis of different gene variants 	<ul style="list-style-type: none"> • Higher RNA input than amplicon-based methods • Difficulty with fusion variants involving large DNA intronic regions with repetitive sequences
<p>➤ Amplicon-based:</p> <p>➤ <i>Classical multiplex PCR (mPCR)</i></p> <p>➤ <i>Anchored multiplex PCR</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Low RNA input • Particularly effective with small and mid-size panels • Analysis of both known and unknown fusion variants of target genes (anchored mPCR) • 5' and 3' imbalance evaluation can increase test diagnostic accuracy 	<ul style="list-style-type: none"> • Not adequate for gene fusion analysis at DNA level • Primer design can be complex • Characterization of only known fusion variants included in the panel (classical mPCR) • PCR bias like allele dropout can impact on analysis result
FISH	<ul style="list-style-type: none"> • Available in many pathology labs • No NA extraction needed • Quick hand-on time 	<ul style="list-style-type: none"> • Characterization of only known fusions





Recommandations et déploiement en France

Recommendations ESMO

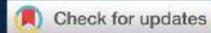
REVIEW | VOLUME 32, ISSUE 3, P337-350, MARCH 01, 2021

ESMO recommendations on the standard methods to detect *RET* fusions and mutations in daily practice and clinical research

C. Belli [†] • F. Penault-Llorca [†] • M. Ladanyi • ... F. André • J.-Y. Douillard • G. Curigliano  

[Show all authors](#) • [Show footnotes](#)

[Open Archive](#) • Published: January 14, 2021 • DOI: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.11.021> •



Annals of Oncology

Volume 30, Issue 9, September 2019, Pages 1417-1427



Special article
Editor's Choice

ESMO recommendations on the standard methods to detect *NTRK* fusions in daily practice and clinical research

C. Marchiò ^{1,2}, M. Scaltriti ^{3,4}, M. Ladanyi ³, A.J. Iafrate ^{5,6}, F. Bibeau ⁷, M. Dietel ⁸, J.F. Hechtman ³, T. Troiani ⁹, F. López-Rios ¹⁰, J.-Y. Douillard ¹¹, F. André ¹²  , J.S. Reis-Filho ³



Annals of Oncology 29 (Supplement 4): iv192-iv233, 2018
doi:10.1093/annonc/mdy275
Published online 3 October 2018, updated 26 January 2019

CLINICAL PRACTICE GUIDELINES

Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[†]

D. Planchard¹, S. Popat², K. Kerr³, S. Novello⁴, E. F. Smit⁵, C. Falvre-Finn⁶, T. S. Mok⁷, M. Reck⁸, P. E. Van Schil⁹, M. D. Hellmann¹⁰ & S. Peters¹¹, on behalf of the ESMO Guidelines Committee[†]

REVIEW | VOLUME 31, ISSUE 11, P1491-1505, NOVEMBER 01, 2020

Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group

F. Mosele • J. Remon • J. Mateo • ... J.S. Reis-Filho • R. Dienstmann • F. André   • [Show all authors](#)

[Open Archive](#) • Published: August 24, 2020 • DOI: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.07.014> •

Déploiement en France



Campagne 2021 (2020)

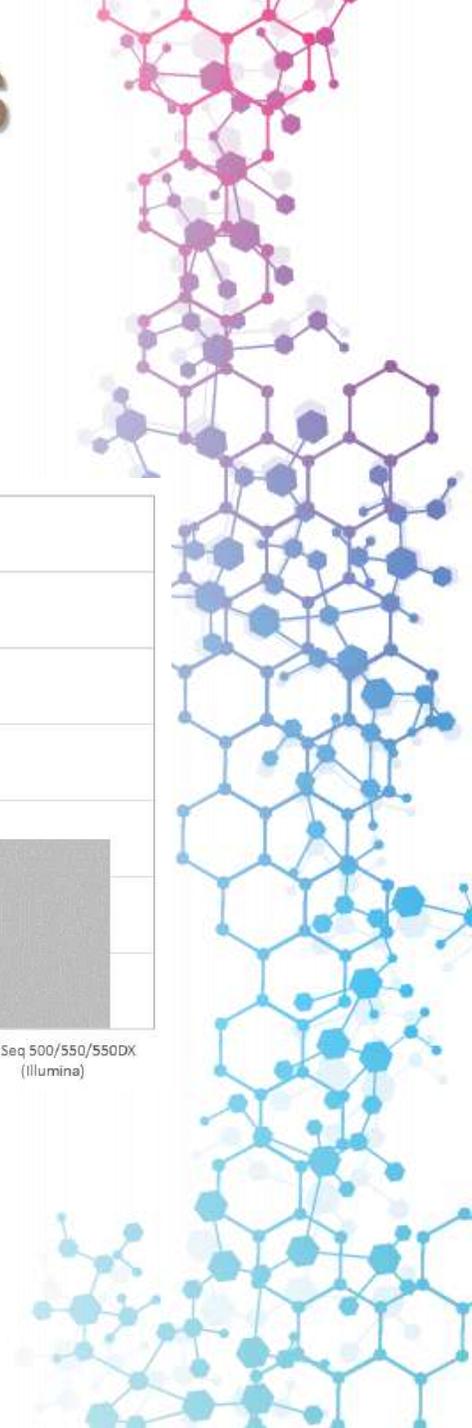
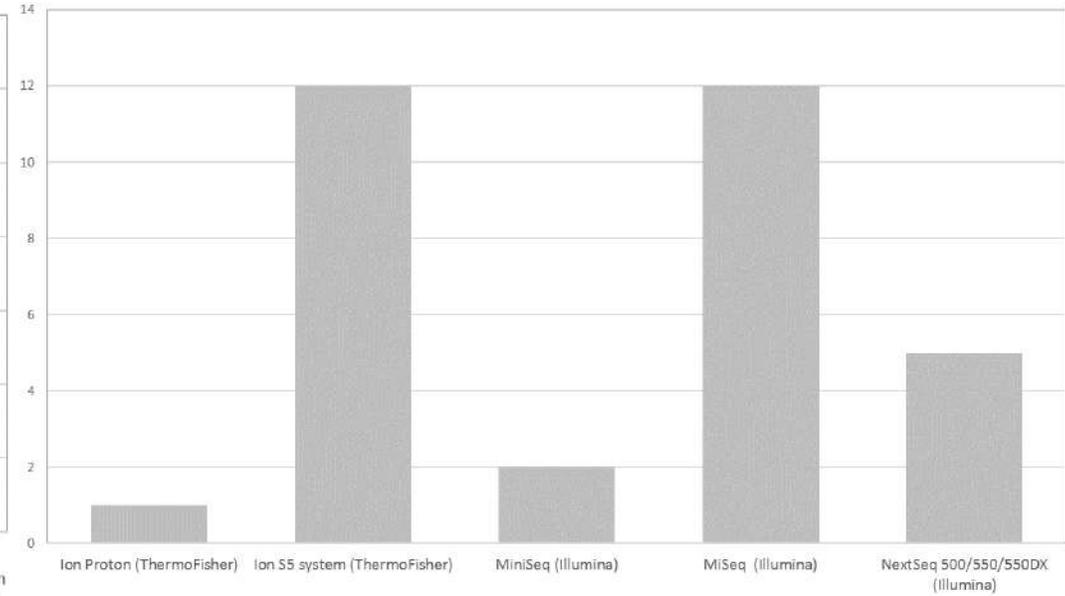
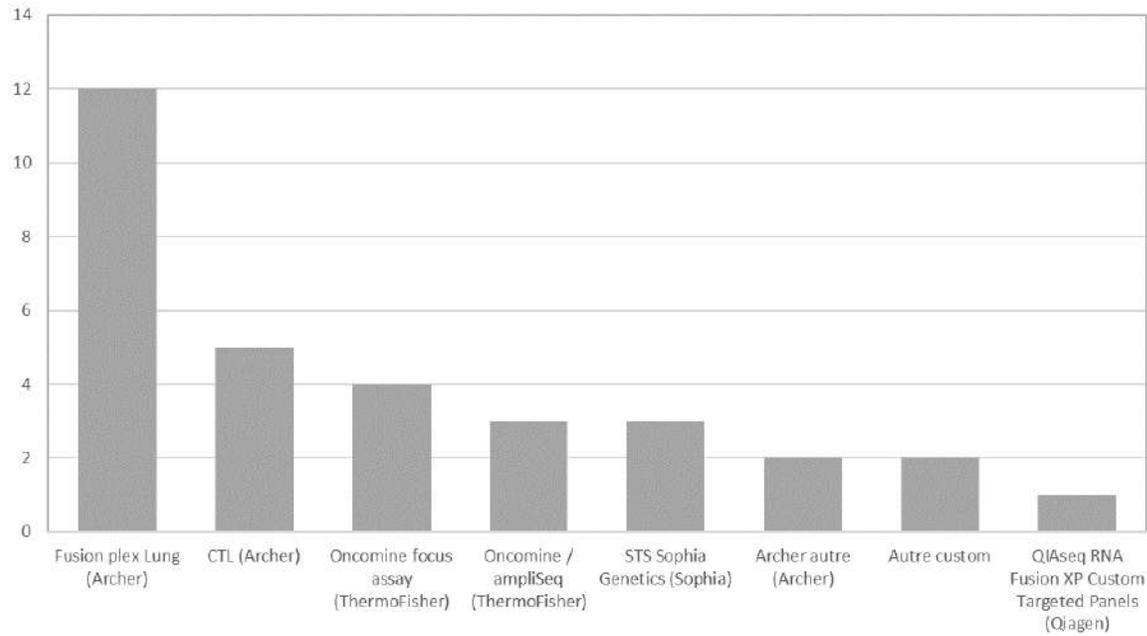
Marqueur	Nombre	Succes	% succes	Score moyen
<i>ALK</i>	33	32	97%	97%
<i>ROS1</i>	33	33	100%	100%
<i>RET</i>	33	32	97%	97%
<i>NTRK1,2,3</i>	33	32	97%	97%

Au total – 3 erreurs pour **2 participants** / 132 échantillons – 528 analyses
Taux d'erreurs : 0,56% (3/528)



Déploiement en France

Campagne 2021 (2020)

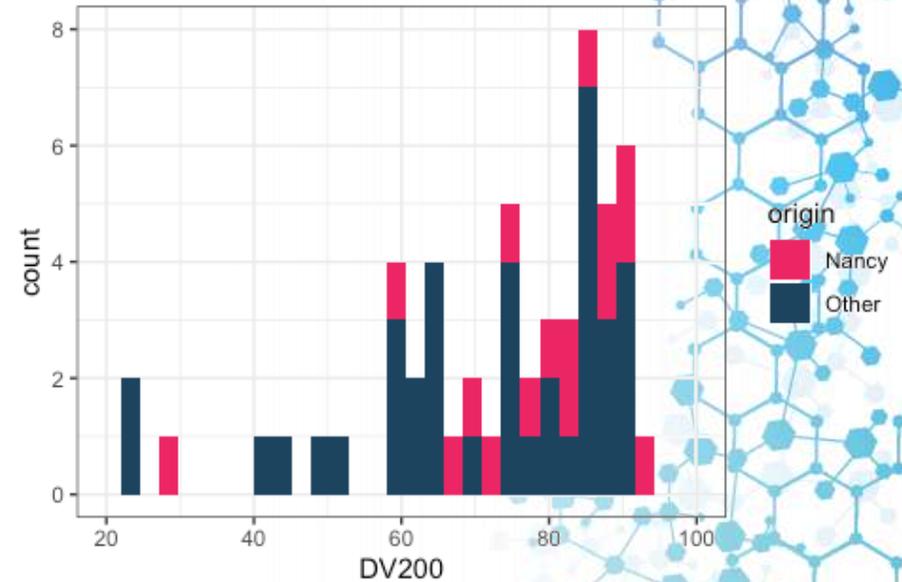
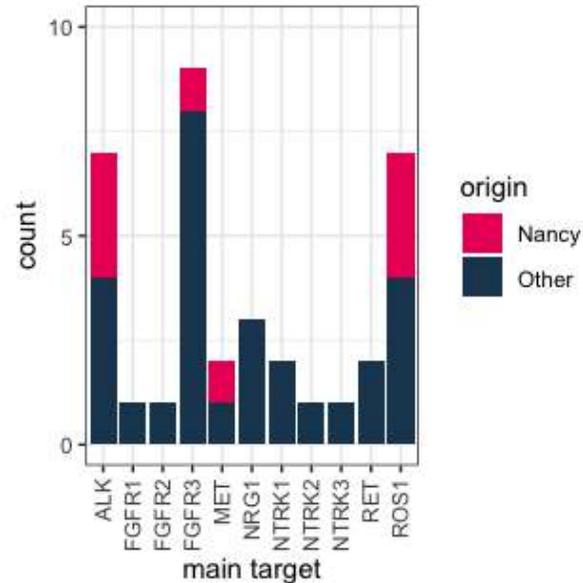
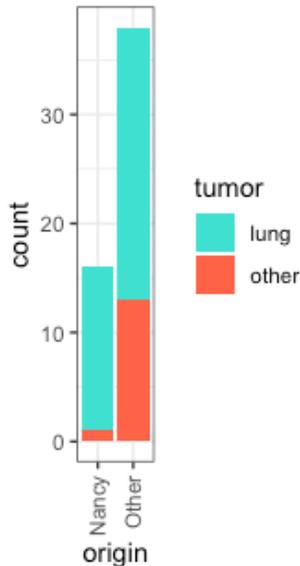
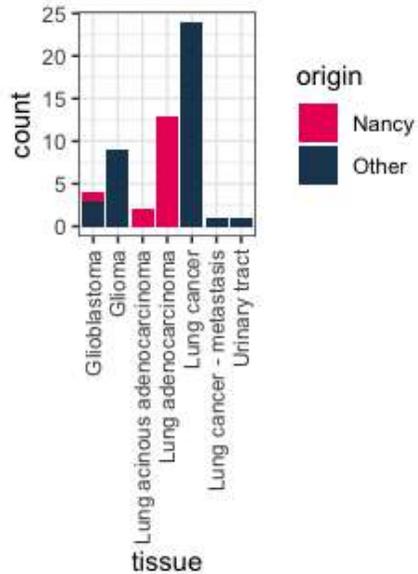
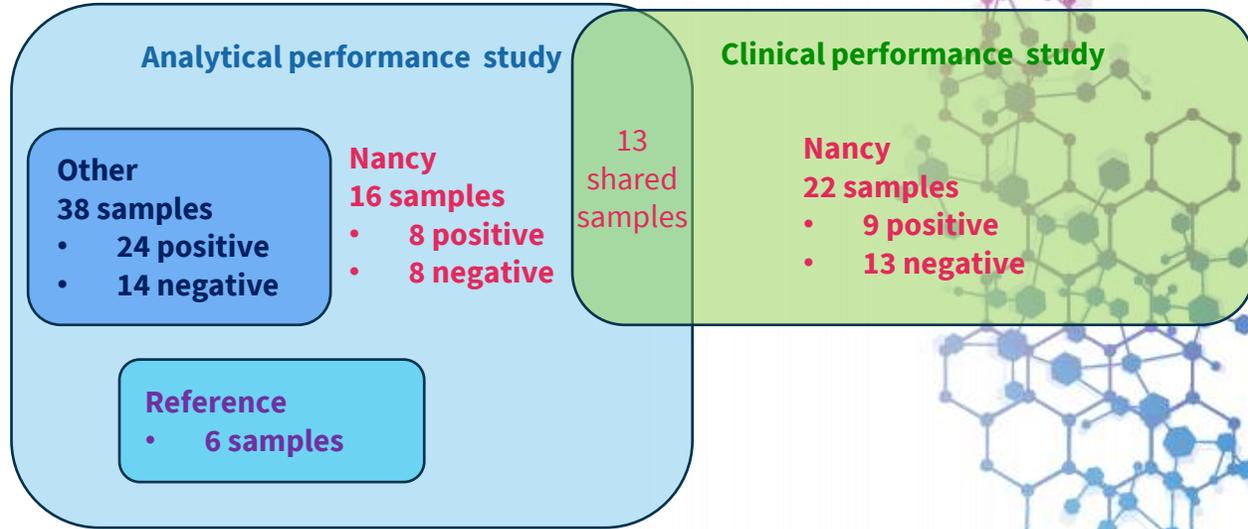




Exemple de validation de méthode :
kit SOPHiA DDM™ Dx ROS

Sélection des échantillons

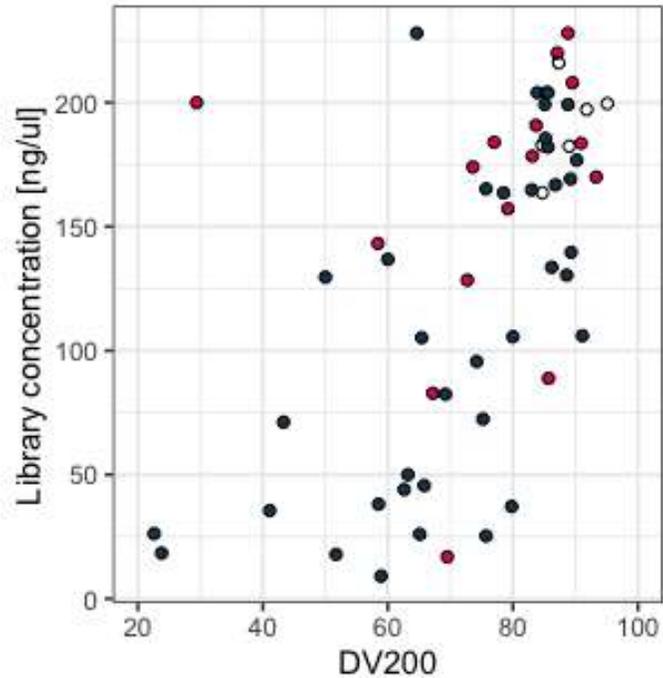
- Fusion/exon skipping-**positive lung** samples
- Fusion/exon skipping-negative **lung** samples
- Fusion/exon skipping-**positive non-lung** samples
- Previously characterized using Archer FusionPlex, FISH or EasyPGX Fusion assays



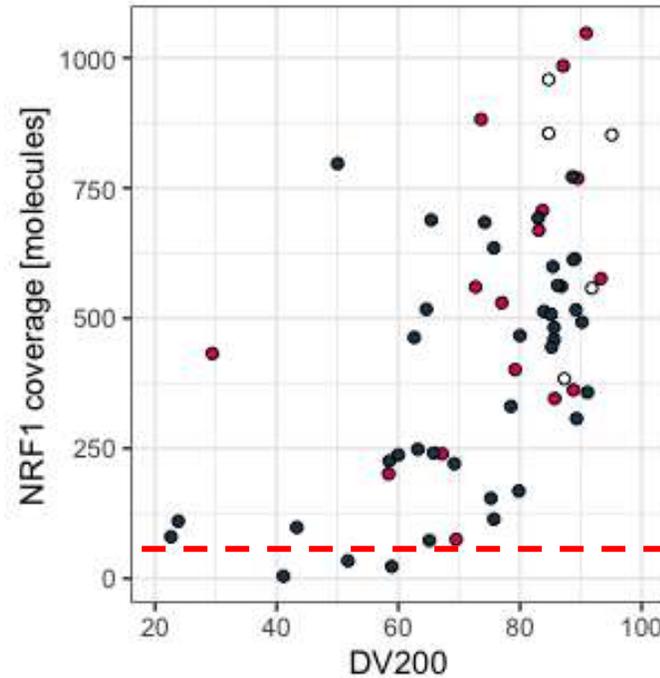
Échantillons : Critères qualité

- DV200: percentage of RNA fragments > 200 nucleotides

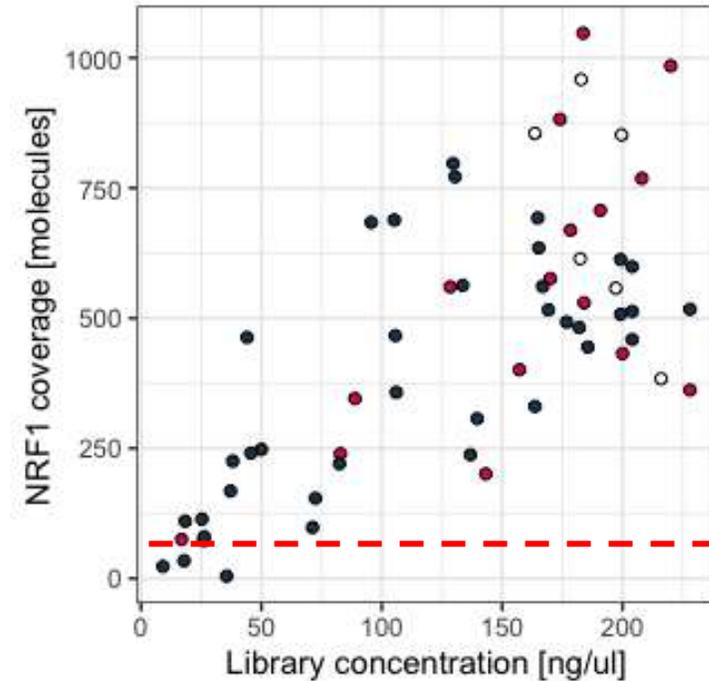
DV200 vs Library concentration



DV200 vs NRF1 coverage

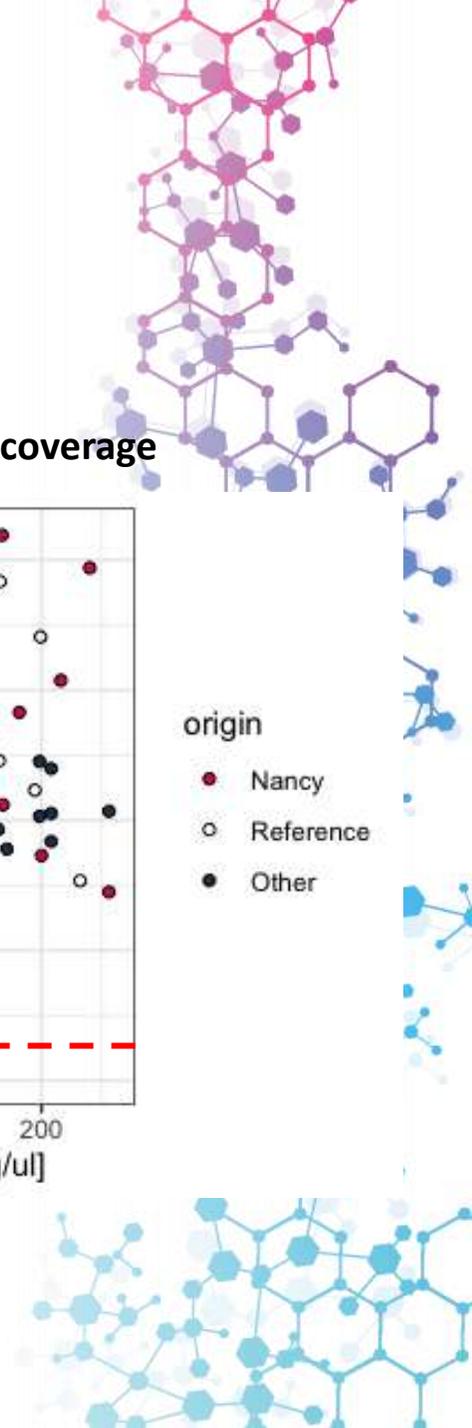


Library concentration vs NRF1 coverage

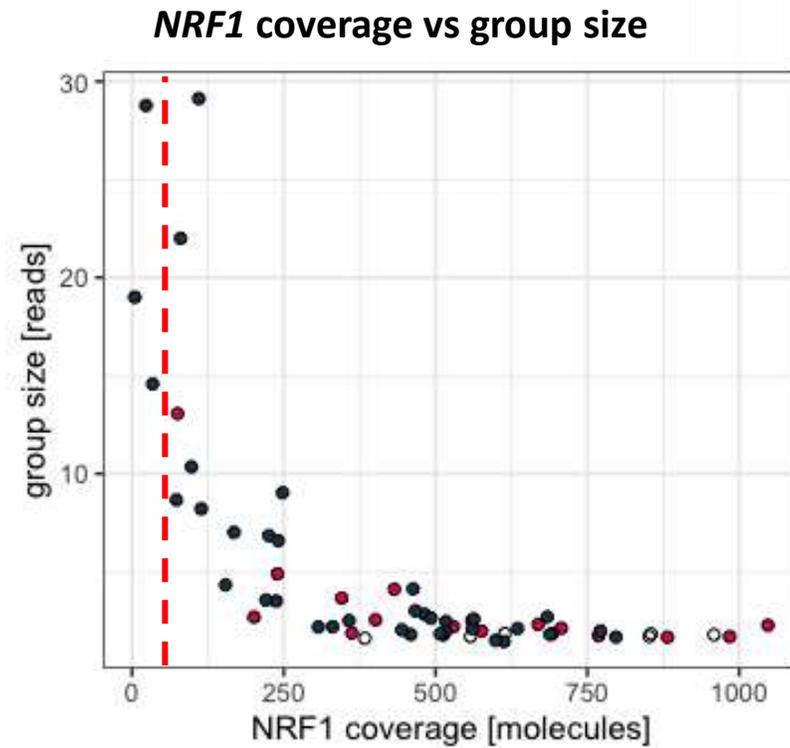
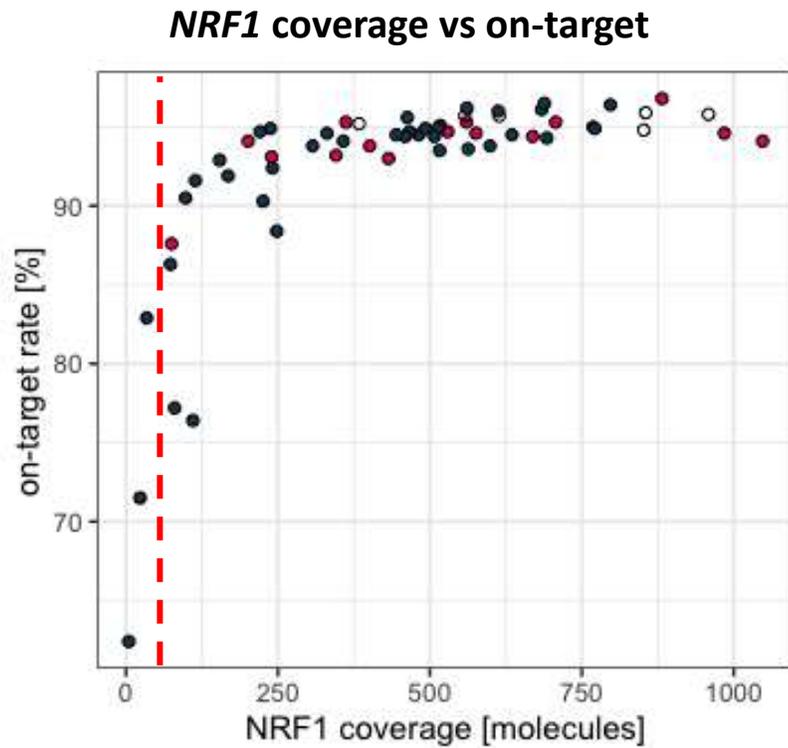


origin

- Nancy
- Reference
- Other

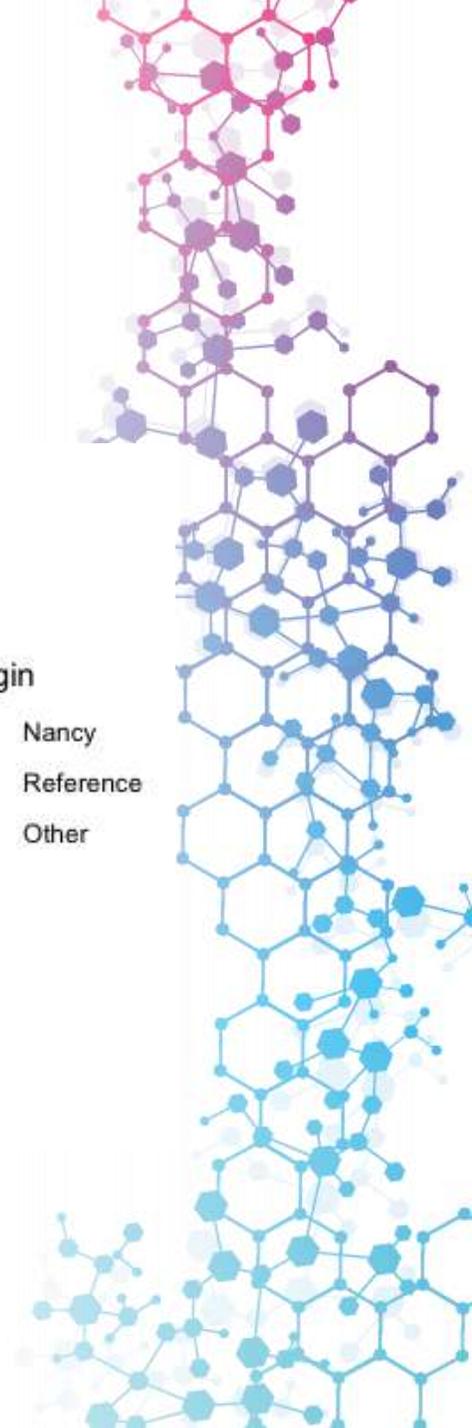


Échantillons : Critères qualité



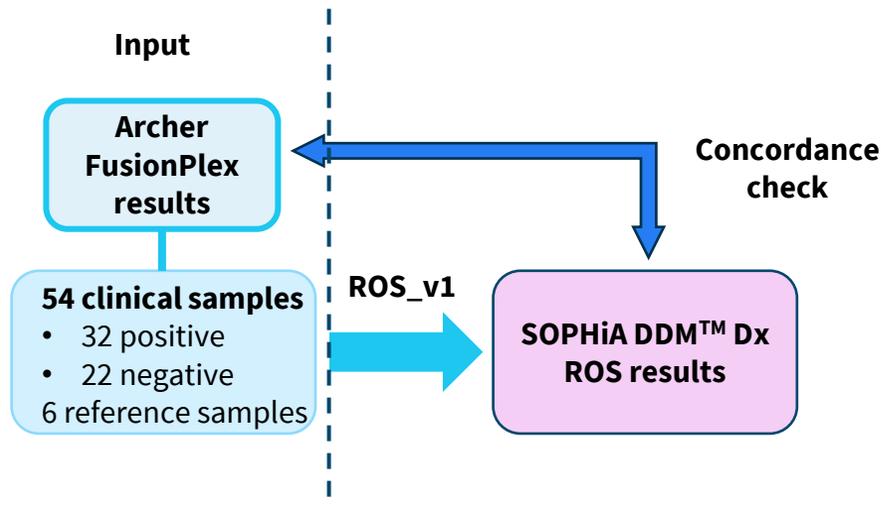
origin

- Nancy
- Reference
- Other



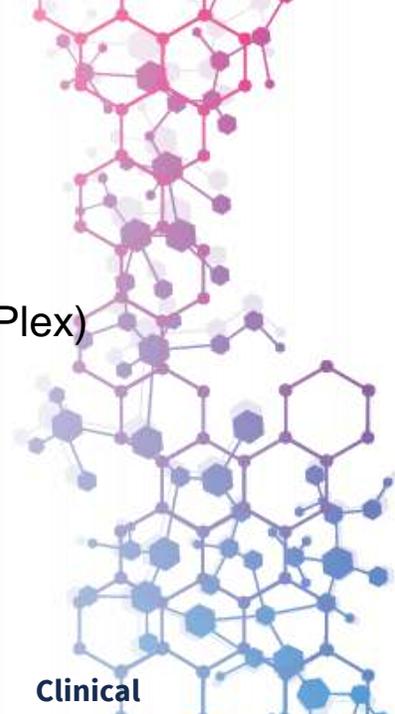
Performance analytique : Concordance

- **But**
Déterminer la concordance des résultats de fusions obtenus avec une méthode externe validée (Archer FusionPlex)
- **Critères d'acceptation**
 - OPA $\geq 99.0\%$
 - PPA $\geq 95.0\%$; lower boundary of 95% CI $\leq 30\%$
 - NPA $\geq 99.0\%$; lower boundary of 95% CI $\leq 5\%$
 - Résultats discordants vérifiés avec une technique tierce indépendante (TST170)

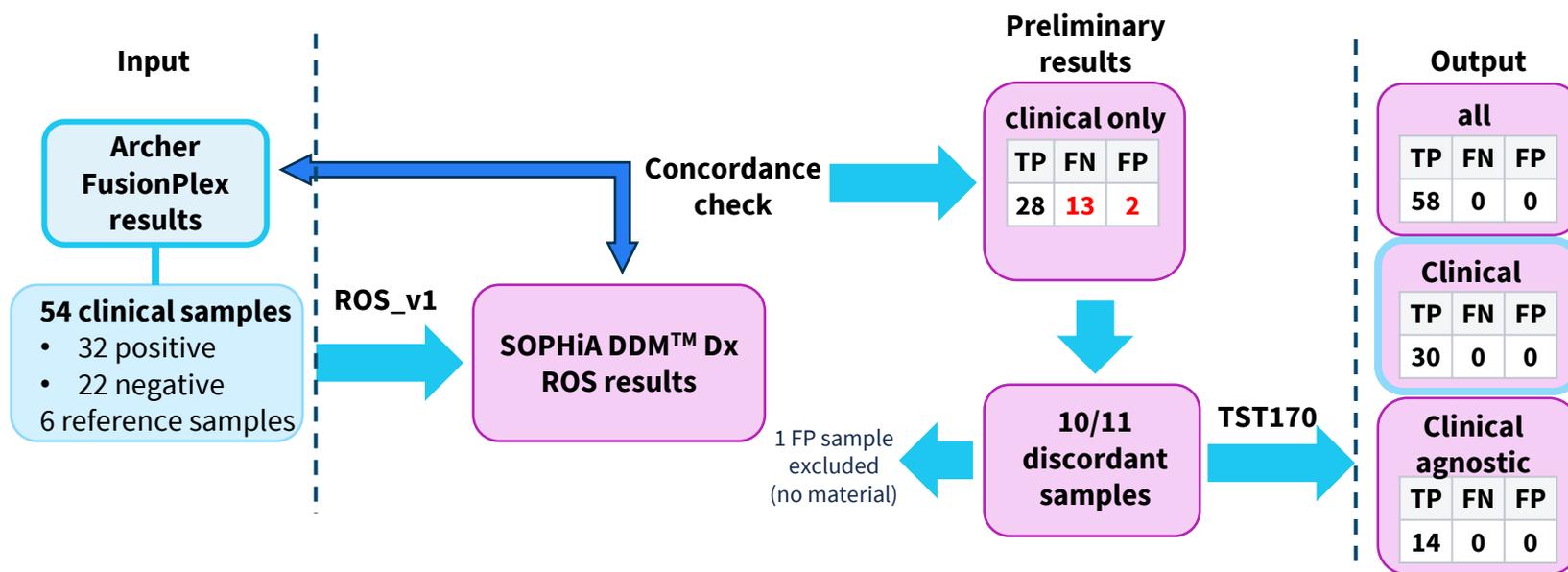


Performance analytique : Concordance

- **But**
Déterminer la concordance des résultats de fusions obtenus avec une méthode externe validée (Archer FusionPlex)
- **Critères d'acceptation**
 - OPA $\geq 99.0\%$
 - PPA $\geq 95.0\%$; lower boundary of 95% CI $\leq 30\%$
 - NPA $\geq 99.0\%$; lower boundary of 95% CI $\leq 5\%$
 - Résultats discordants vérifiés avec une technique tierce indépendante (TST170)



Clinical



- ✓ OPA = **100%**
- ✓ PPA = **100%**
- ✓ PPA - lower boundary of 95% CI = **11.69%**
- ✓ NPA = **100%**
- ✓ NPA - lower boundary of 95% CI = **0%**
- ✓ discordant results verified with an independent method (TST170)
- ✓ Performance reported separately for lung cancer samples (no target to achieve)

Performance analytique : Concordance

- Détail des échantillons discordants

Group	5' gene	3' gene	type	Info origin	ROS	TST170	Archer vs SG	Archer vs Nancy
False negatives	<i>ALK</i>	<i>EML4</i>	gene.fusion	Source lab	negative	negative (reverse)	negative (reverse detected)	positive
	<i>ALK</i>	<i>EML4</i>	gene.fusion	Source lab	negative	negative (reverse)	negative (reverse detected)	positive
	<i>ROS1</i>	<i>CD74</i>	gene.fusion	Source lab	negative	No material available	No material available	positive
	<i>ETV6</i>	<i>NTRK3</i>	gene.fusion	client	negative	negative	negative	positive
	<i>ARHGEF2</i>	<i>NTRK1</i>	gene.fusion	Archer	negative	negative	negative	positive
	<i>MLPH</i>	<i>ALK</i>	gene.fusion	Archer	negative	negative	negative	positive
	<i>NR0B2</i>	<i>ALK</i>	gene.fusion	Archer	negative	negative	negative	positive
	<i>SPAG4</i>	<i>FGFR2</i>	gene.fusion	Archer	negative	negative	negative	positive
	<i>SPTBN2</i>	<i>NTRK1</i>	gene.fusion	Archer	negative	negative	negative	positive
	<i>LOC101929418</i>	<i>ALK</i>	gene.fusion	Archer	negative	negative	negative	positive
	<i>IGH</i>	<i>FGFR3</i>	gene.fusion	Archer	negative	negative	negative	positive
<i>PRCC</i>	<i>NTRK1</i>	gene.fusion	Archer	negative	negative	negative	positive	
Group	5' gene	3' gene	type	molecules	ROS	TST170	Archer vs SG	Archer vs Nancy
Extra positives	<i>FGFR3</i>	<i>AGO3</i>	gene.fusion	214	positive	positive	negative	negative
	<i>EGFR</i>	<i>EGFR</i>	exon.skipping	19	positive	positive	negative	negative
	<i>MET</i>	<i>MET</i>	exon.skipping	141	positive	positive	negative	negative
Reciprocal fusions	<i>ROS1</i>	<i>TPM3</i>	gene.fusion	105	positive	positive	negative	negative

Performance analytique : Nombre de molécules

■ But

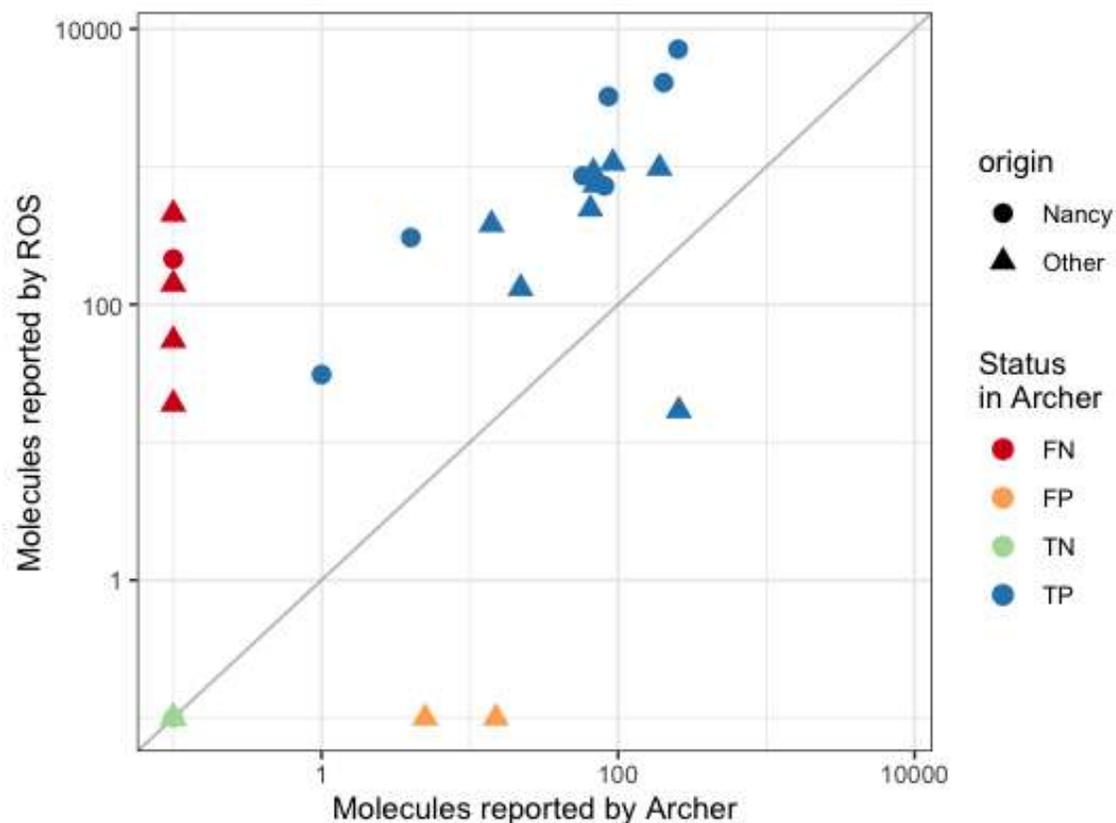
Comparaison des performances de SOPHiA DDM™ Dx ROS et d'Archer FusionPlex sur l'ARN isolé d'échantillons FFPE

■ 23 échantillons

- 18 positifs
 - 23 fusions
 - 4 exon skipping
- 5 négatifs

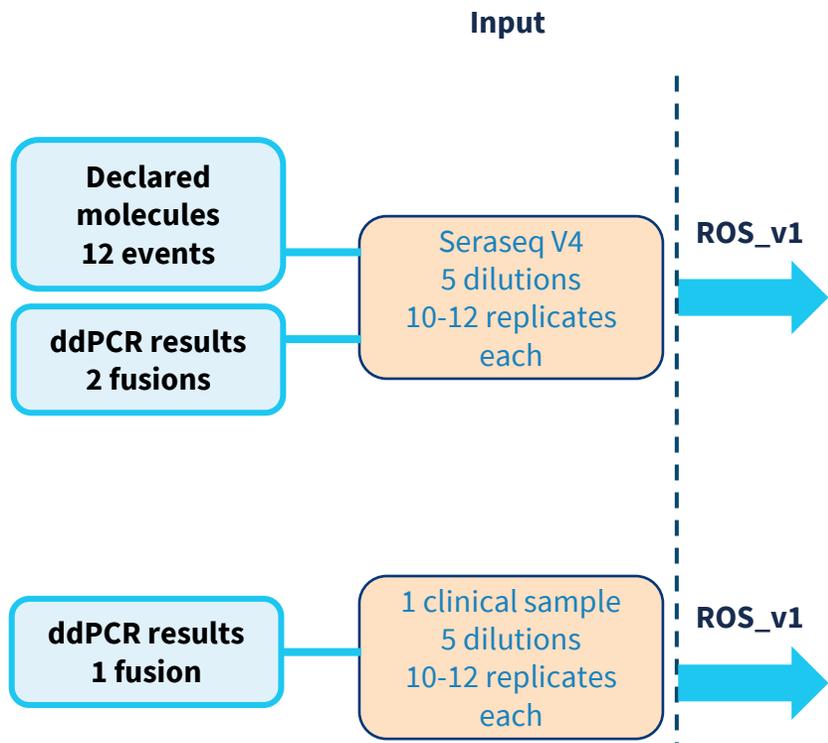
■ 50 ng RNA input

■ Confirmation méthode indépendante (TST170) pour les discordants



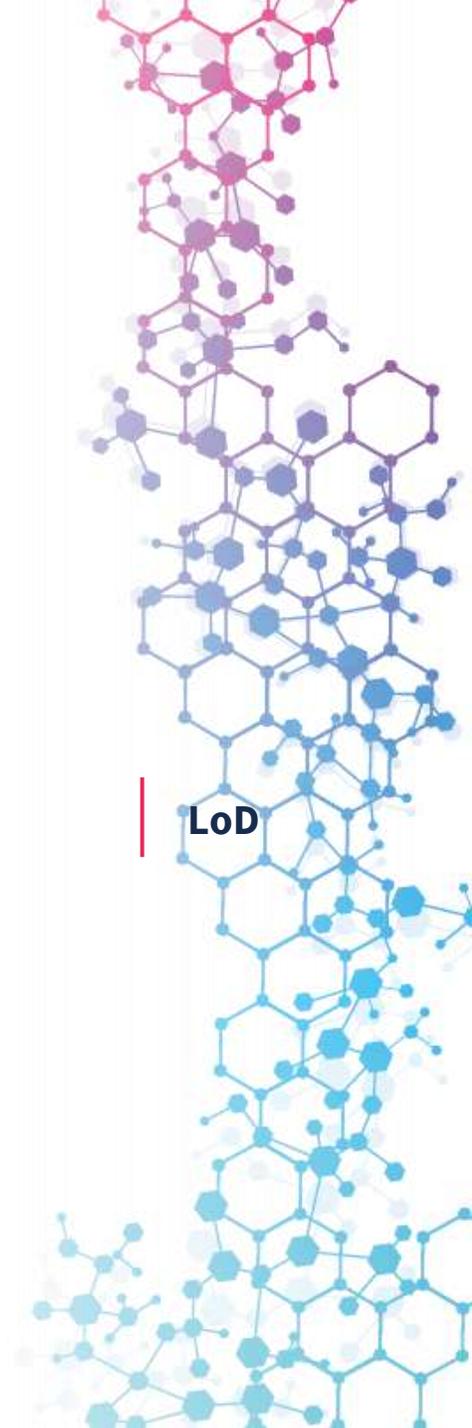
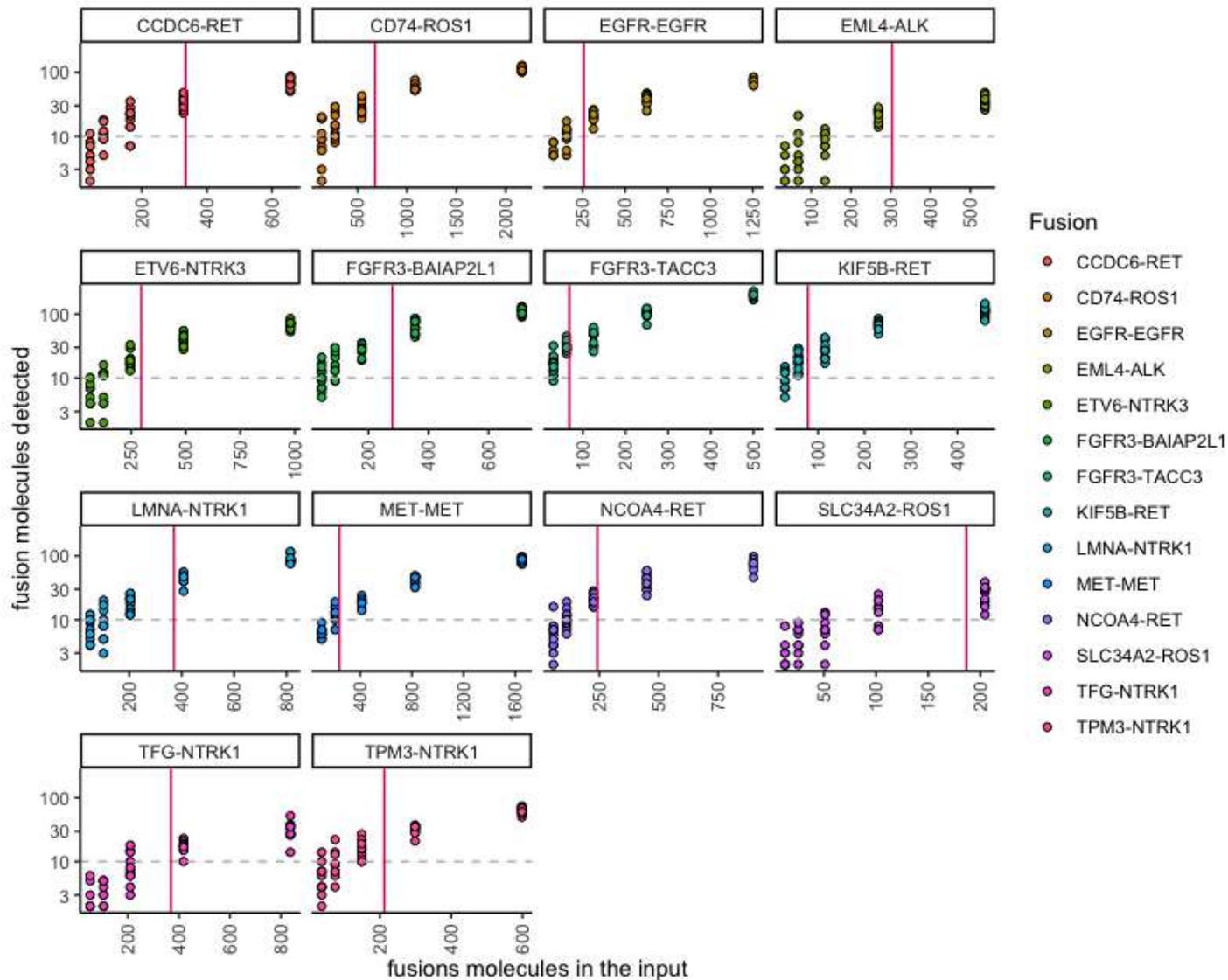
Performance analytique : LoD

- **But**
Déterminez la limite de détection (LoD) définie comme le plus petit nombre de molécules de fusion pour lequel la sensibilité atteint $\geq 95\%$, avec un intervalle de confiance de 95% .
- **Critères d'acceptation**
La sensibilité atteint 95% avec ≤ 500 molécules de fusion pour $\geq 50\%$ des fusions testées ; rapportés séparément pour les échantillons de référence et cliniques.



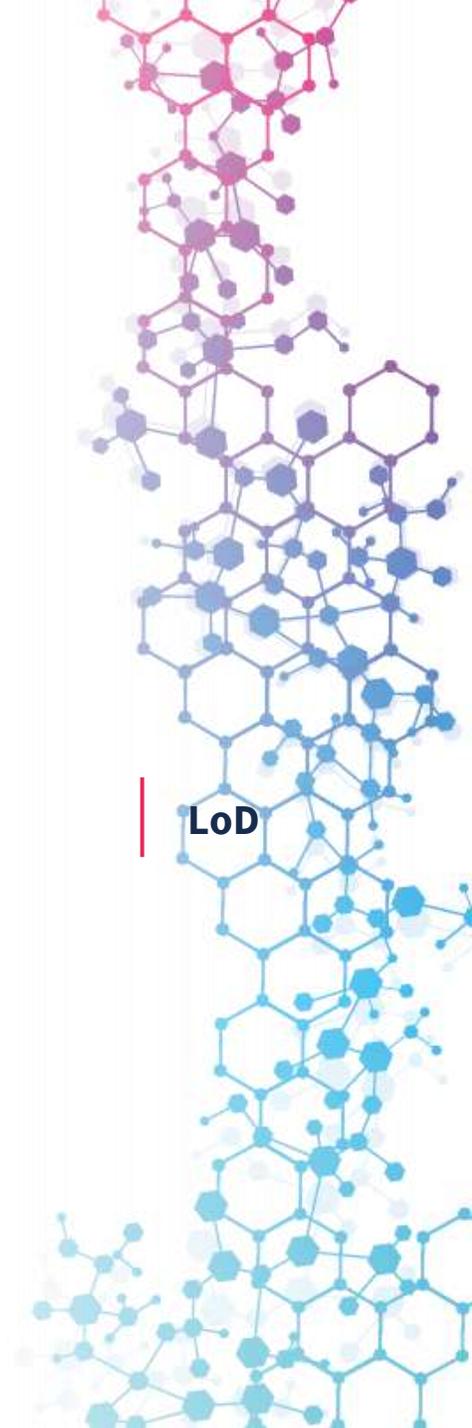
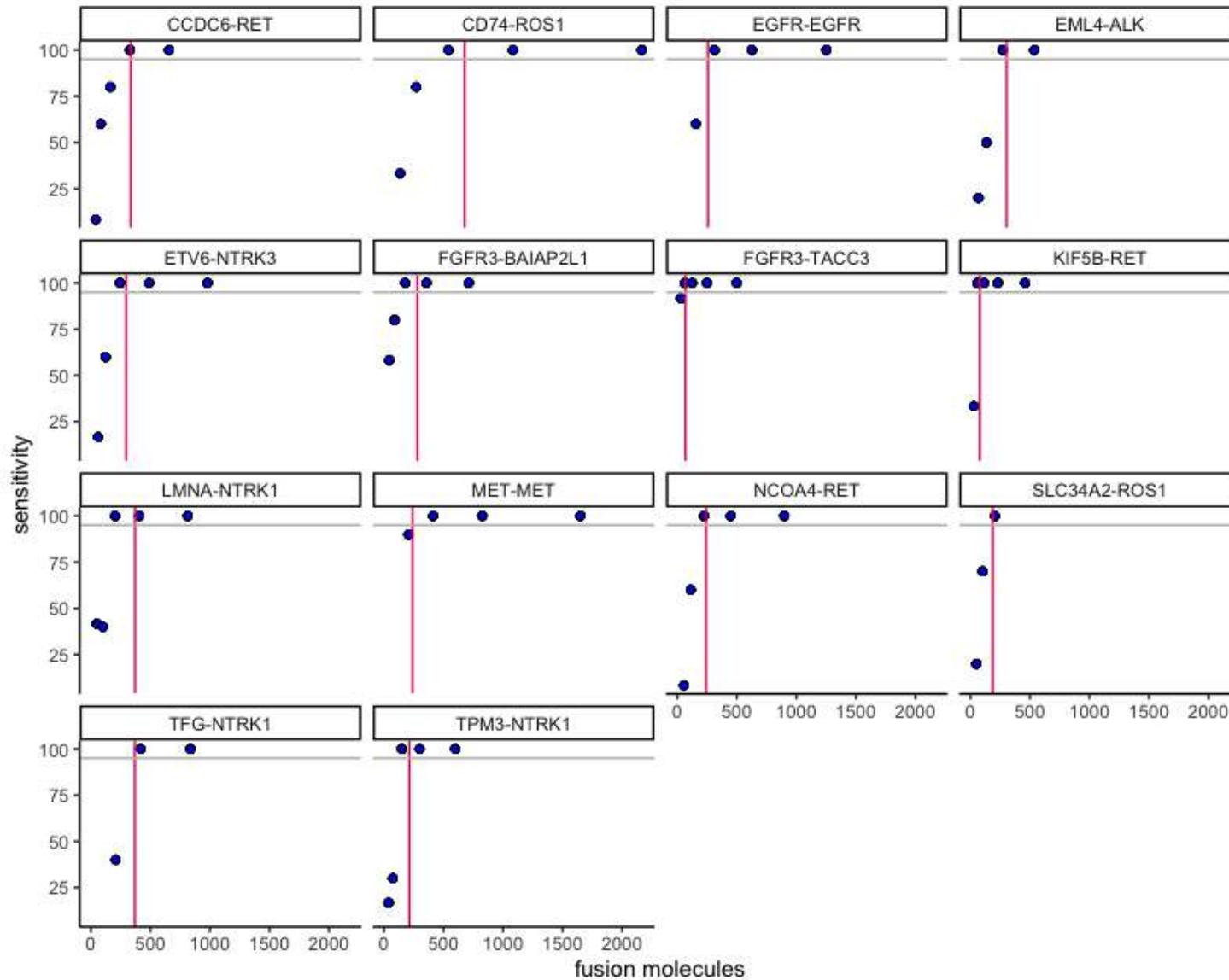
Performance analytique : LoD

Detected molecule counts



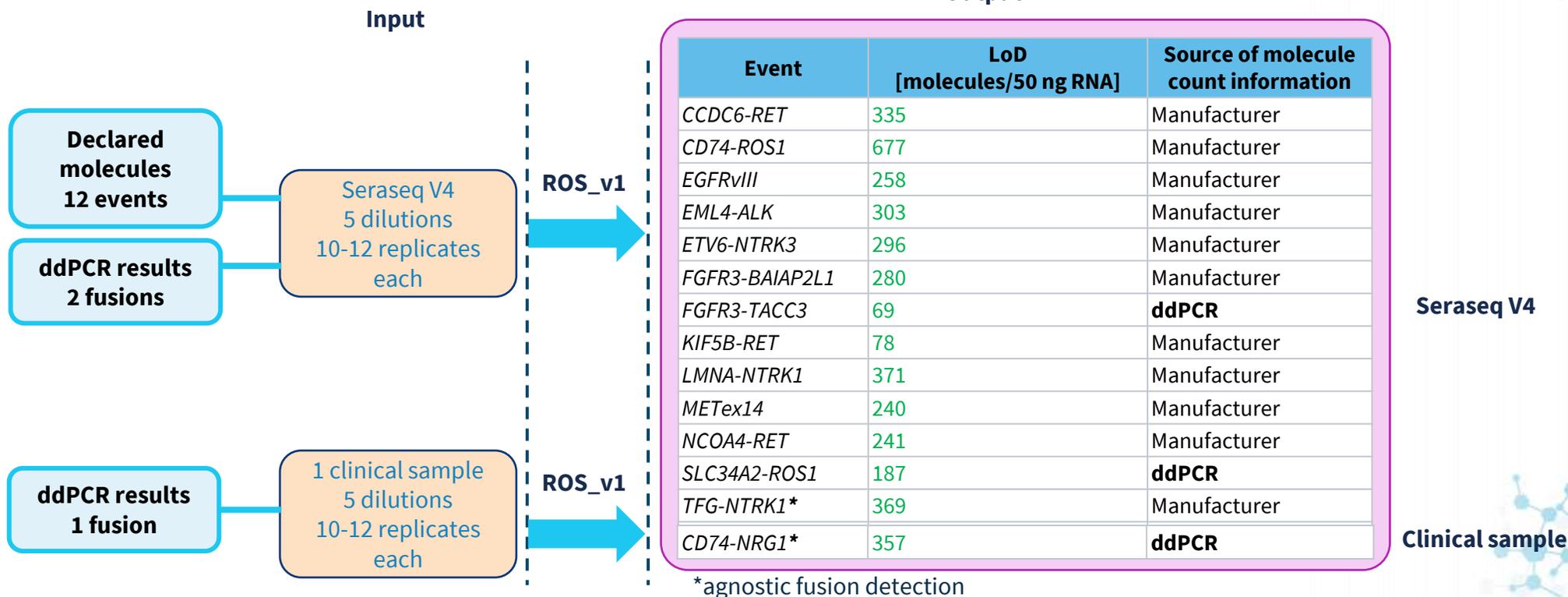
Performance analytique : LoD

Sensitivity



Performance analytique : LoD

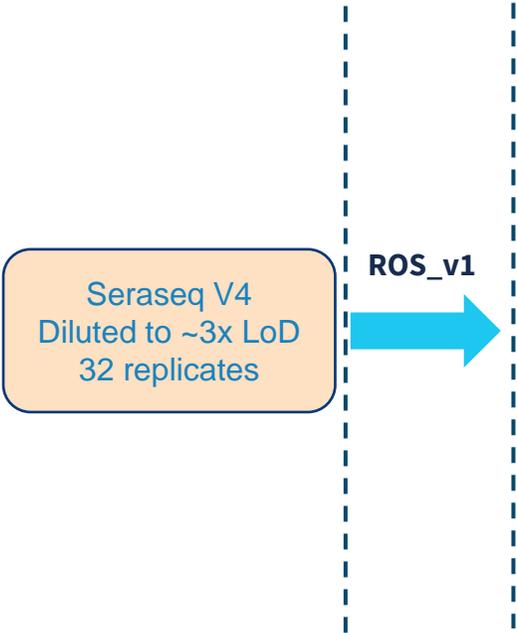
- But**
 Déterminez la limite de détection (LoD) définie comme le plus petit nombre de molécules de fusion pour lequel la sensibilité atteint $\geq 95\%$, avec un intervalle de confiance de 95% .
- Critères d'acceptation**
 La sensibilité atteint 95% avec ≤ 500 molécules de fusion pour $\geq 50\%$ des fusions testées ; rapportés séparément pour les échantillons de référence et cliniques.



Performance analytique : Répétabilité

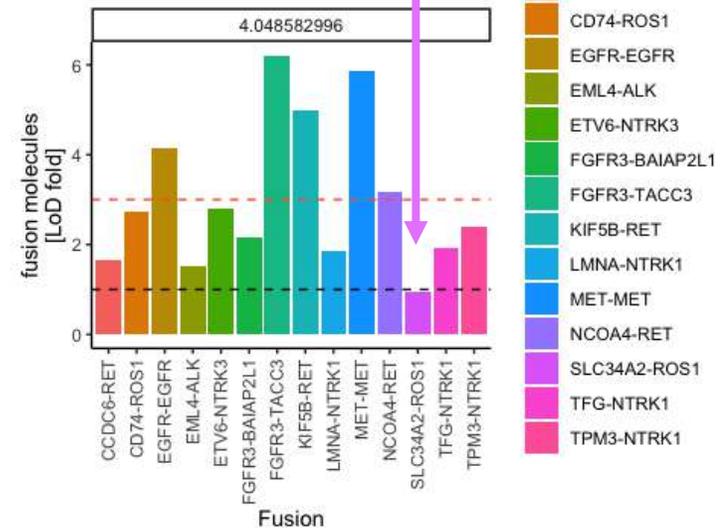
Input

Output



5.prim.gene	3.prim.gene	FN	TP	ETP	repeatability
CCDC6	RET	0	32	0	100
CD74	ROS1	0	32	0	100
EGFR	EGFR	0	32	0	100
EML4	ALK	0	32	0	100
ETV6	NTRK3	0	32	0	100
FGFR3	BAIAP2L1	0	32	0	100
FGFR3	TACC3	0	32	0	100
KIF5B	RET	0	32	0	100
LMNA	NTRK1	0	32	0	100
MET	MET	0	32	0	100
NCOA4	RET	0	32	0	100
SLC34A2	ROS1	5	27	0	84.375
TFG	NTRK1	0	32	0	100
TPM3	NTRK1	0	32	0	100

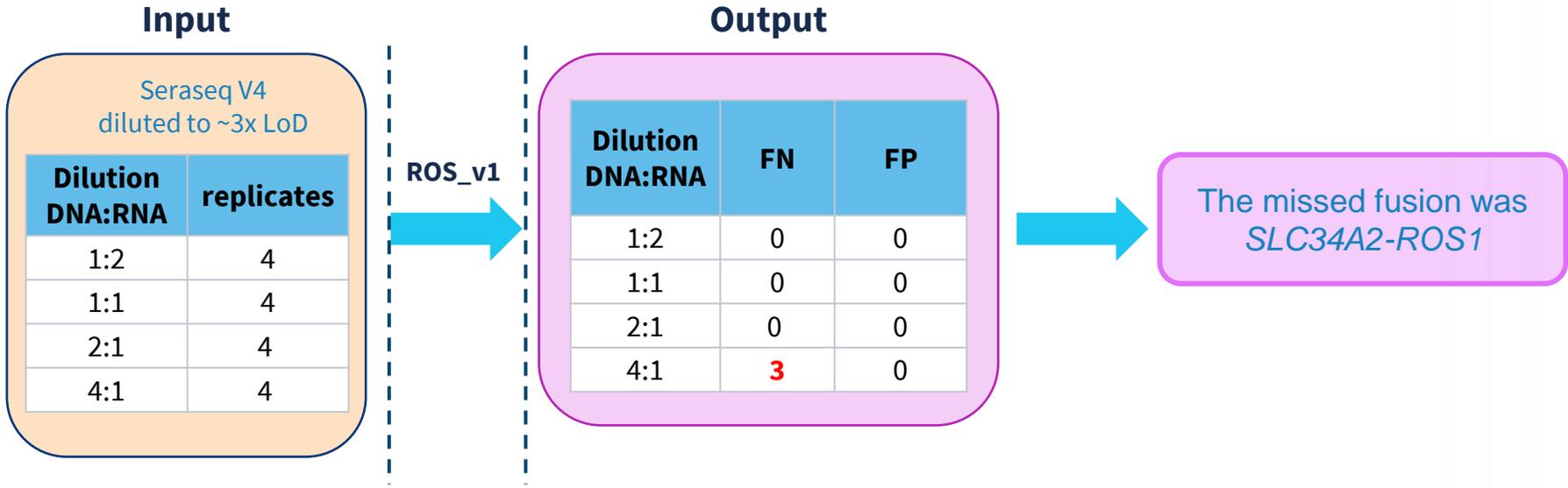
SLC34A2-ROS1 is present in the diluted Seraseq at an amount of molecules (n=170) below the LoD (n=187)



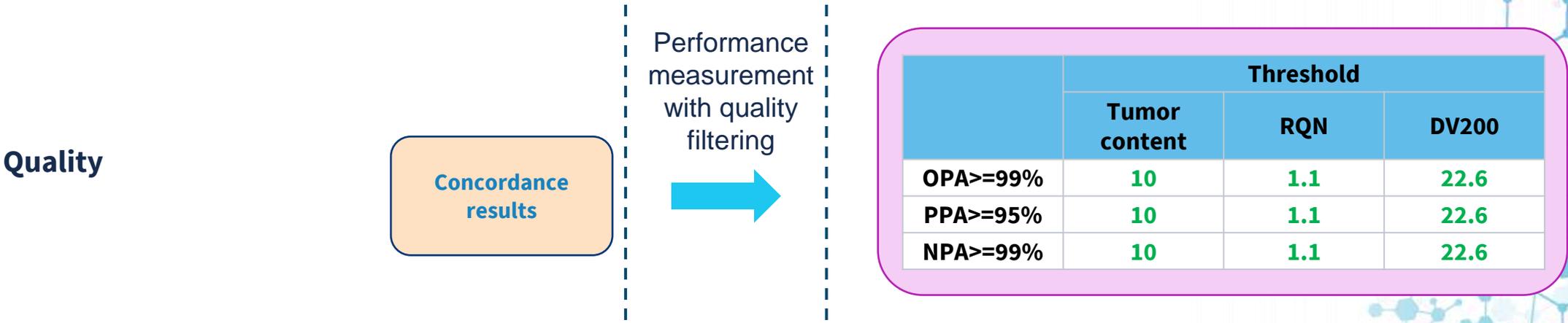
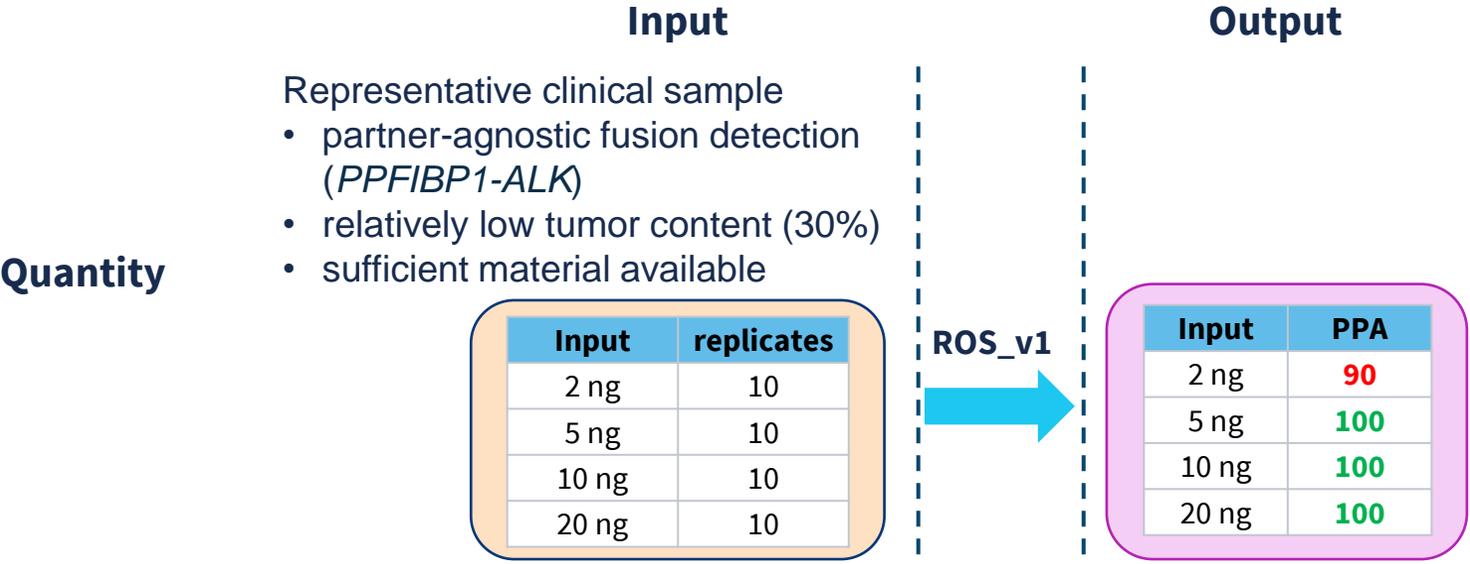
ETP, equivocal true positive; FN, false negative; ROS, SOPHiA DDM™ Dx ROS; TP, true positive

Performance analytique : Effet de la contamination ADN

- Quantités variables de DNA ajoutées à 50ng de RNA



Performance analytique : Effet de la quantité/qualité



OPA/PPA/NPA, overall/positive/negative percentage agreement; ROS, SOPHiA DDM™ Dx ROS; RQN, RNA quality number

Clinical performance: summary

Analysis time from FASTQ: Max. 8 hours per 16 samples

	Observed (%)	Lower 95% CI
Concordance with comparator NGS assay*		
Positive Percent Agreement (PPA)	100	79.61
Negative Percent Agreement (NPA)	100	99.99
Overall Percent Agreement	100	-
Repeatability**	100	-
Diagnostic sensitivity***	100	70.09
Diagnostic specificity***	100	77.19

*Based on analysis of fusion/exon skipping detection in 40 RNA FFPE lung tumor samples; status pre-determined by alternative NGS method(s) and compared with SOPHiA DDM Dx RNAtarget Oncology Solution outcome.

**Based on measurement of PPA/NPA in 32 replicates of a diluted reference samples, bearing 14 targeted rearrangements.

***Based on analysis of fusion/exon skipping detection in clinical study of 22 RNA FFPE lung tumor samples, performed by external site; status pre-determined by externally validated NGS method and compared with SOPHiA DDM Dx RNAtarget Oncology Solution outcome.

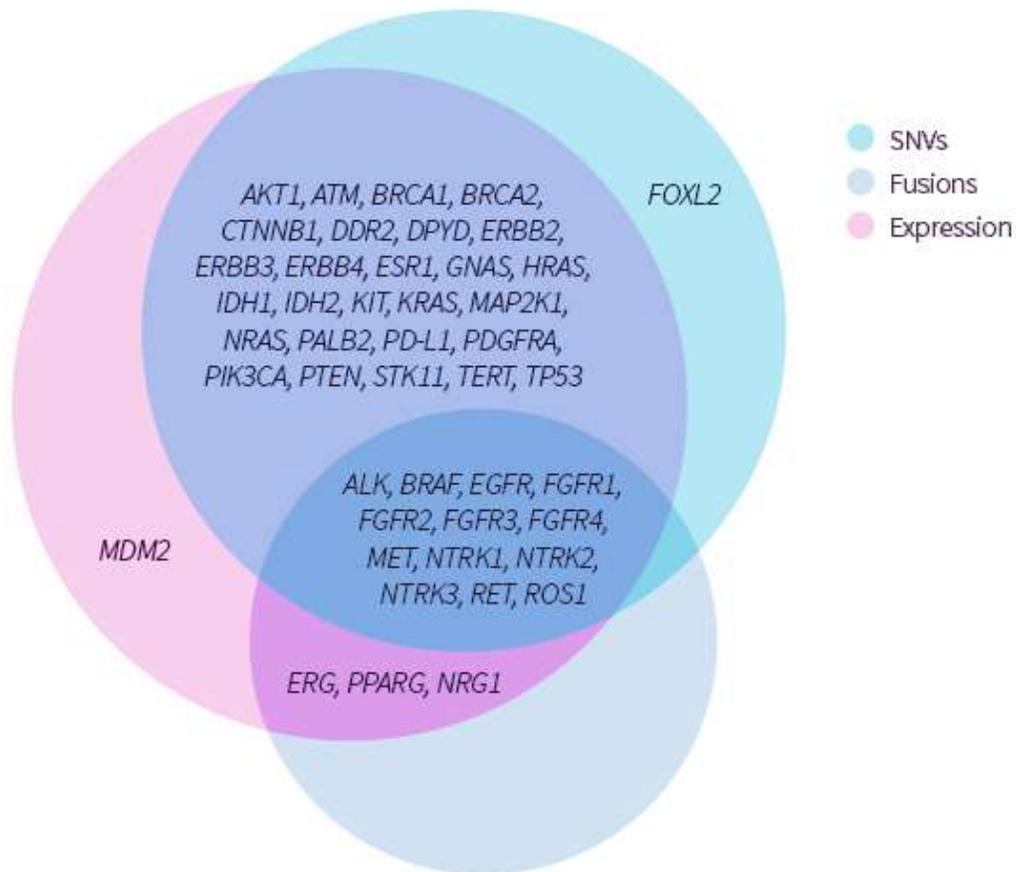




Stratégies combinées

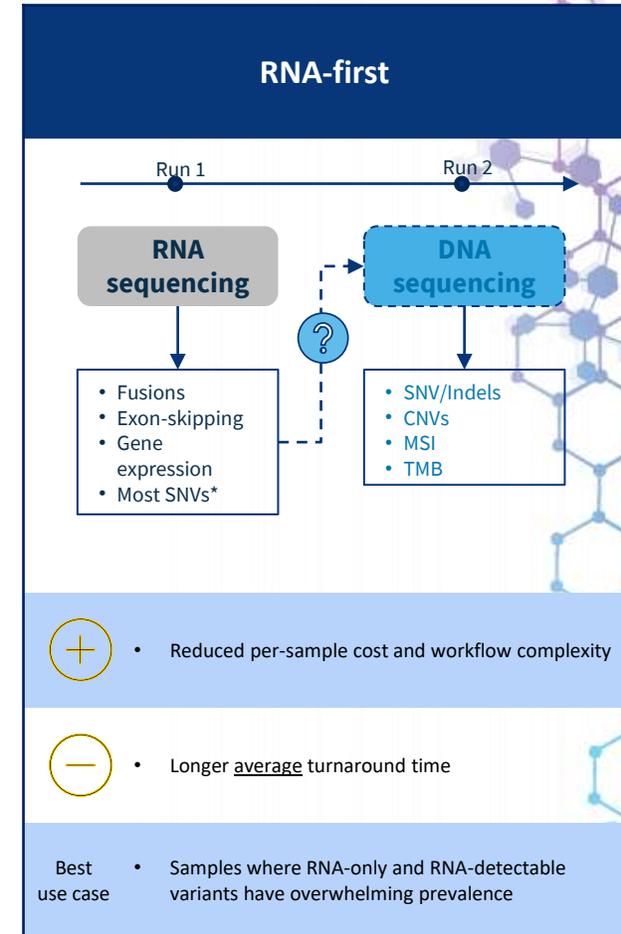
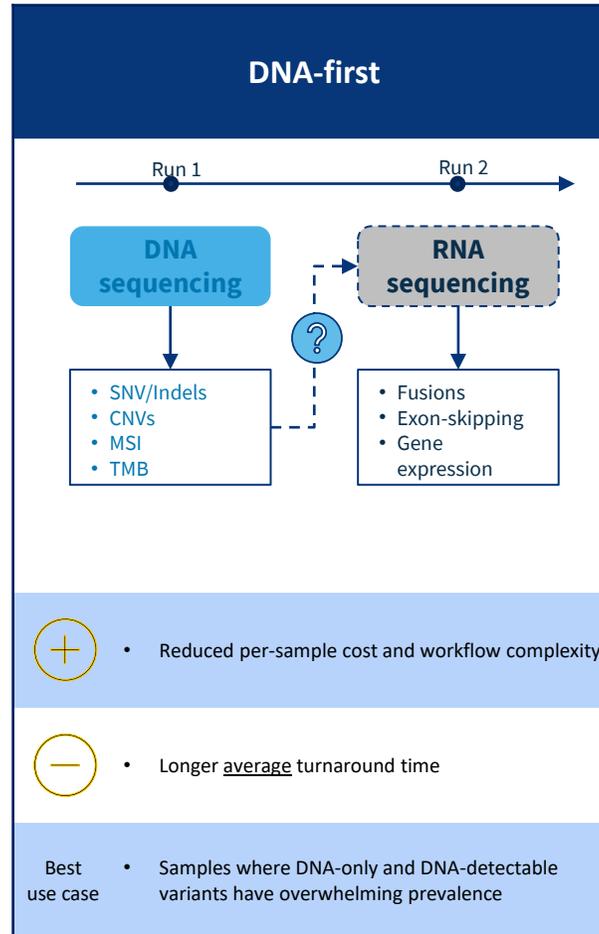
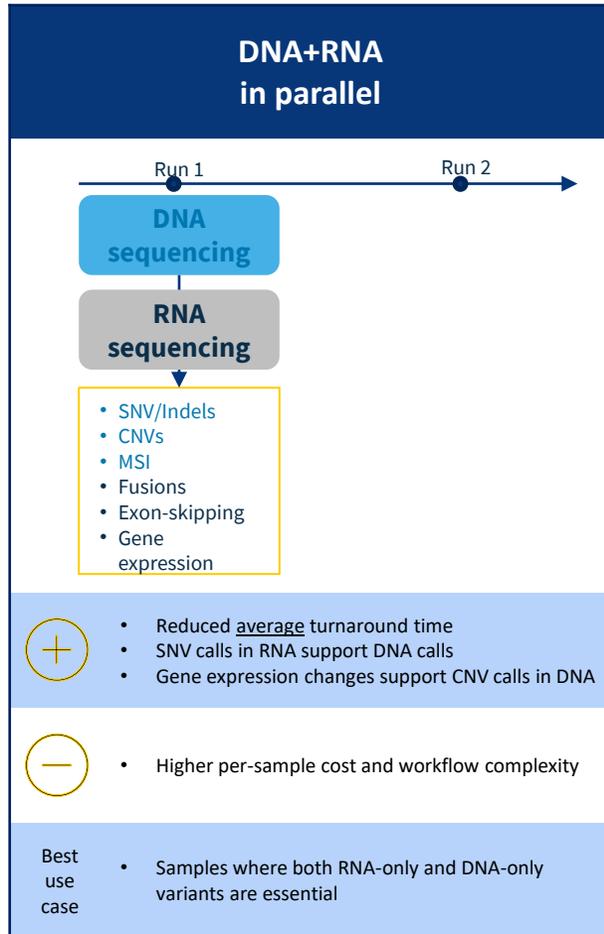
Détéction des variants

- SNVs et Indels
- Panel RUO :



- Les données préliminaires du laboratoire montrent une concordance de 100 % avec les techniques de référence (NGS, RNAseq et Idylla) sur 12 échantillons, mais des analyses supplémentaires sont nécessaires et l'estimation de la LoD sera obligatoire

Stratégies combinées



*SNV calling in RNA can detect up to 96% of SNVs vs. a DNA-based assay. Data on file.

Stratégies combinées

- Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour savoir si l'approche RNAseq est suffisante
- Dans le NSCLC, tous les biomarqueurs recommandés peuvent être évalués en un seul run (*EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *ALK*, *ROS1*, *MET*...)
- Flexibilité pour réaliser les workflows d'ADN et d'ARN séquentiellement ou en parallèle
 - Détection fiable des fusions
 - Personnalisation du panel ADN
 - Meilleure sensibilité des panels AND ?
 - Certains gènes sont peu ou pas exprimés



Conclusion

- Importance de la recherche des fusions en théranostique et le développement de la médecine de précision
- RNA seq en évolution constante
- Avec l'augmentation du débit des séquenceurs, le recours à des stratégies combinées DNA/RNA est possible



Merci]

RNAseq : État des lieux

Pr. Alexandre Harlé – 10 Décembre 2022



MERCI DE VOTRE ATTENTION



RNAseq en théranostique ciblée

Adrien Buisson, Lyon - Alexandre Harlé, Nancy & Paul Hofman, Nice

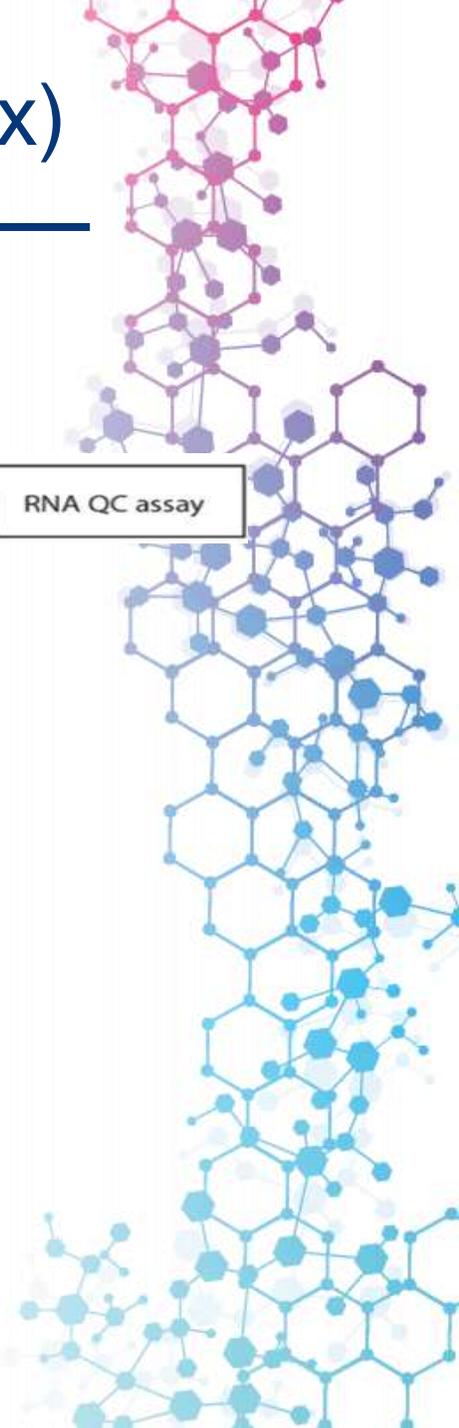
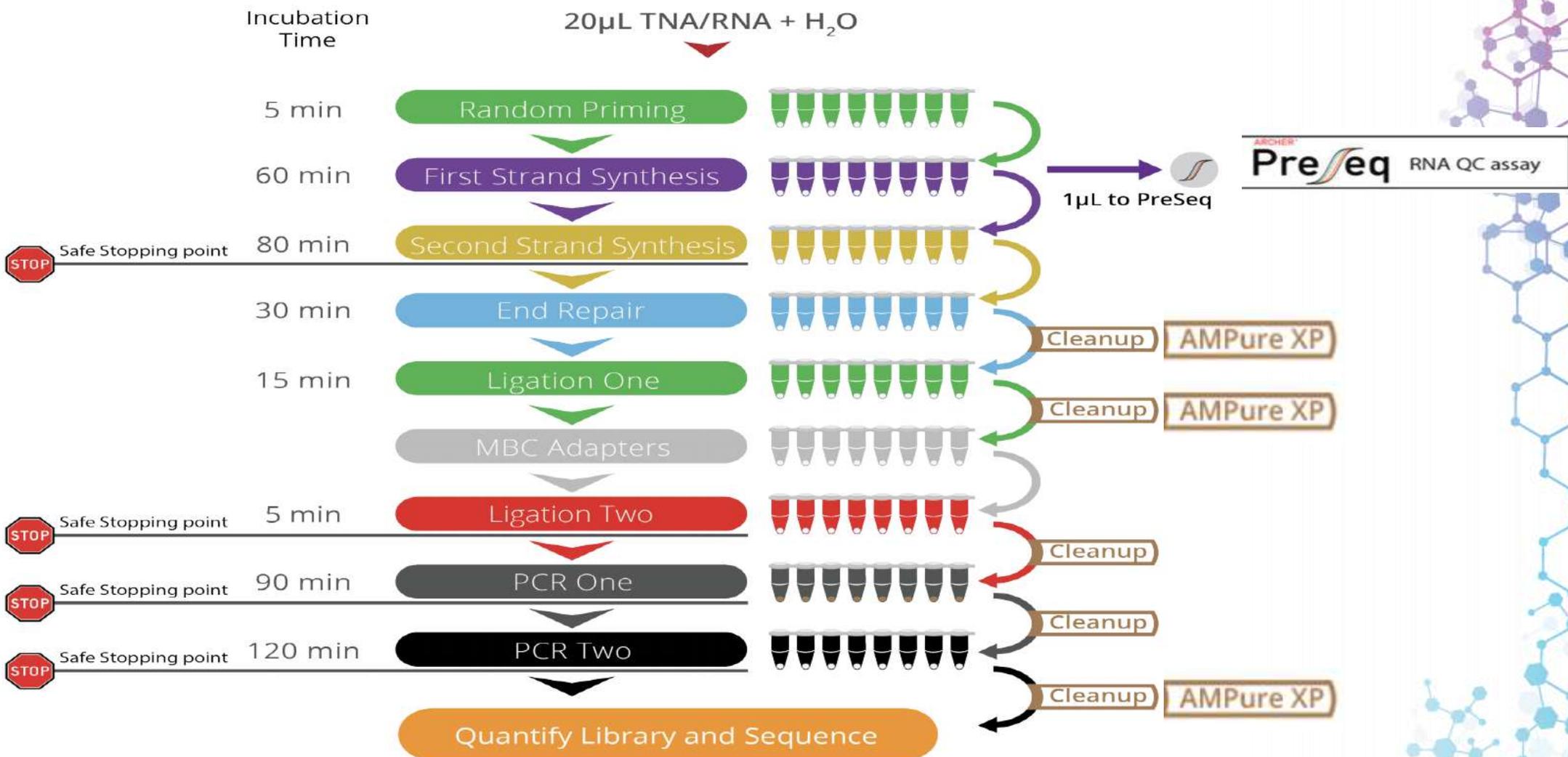


LIENS D'INTÉRÊT (A.Buisson)

- **Honoraires: Sophia Genetics, AMGEN.**



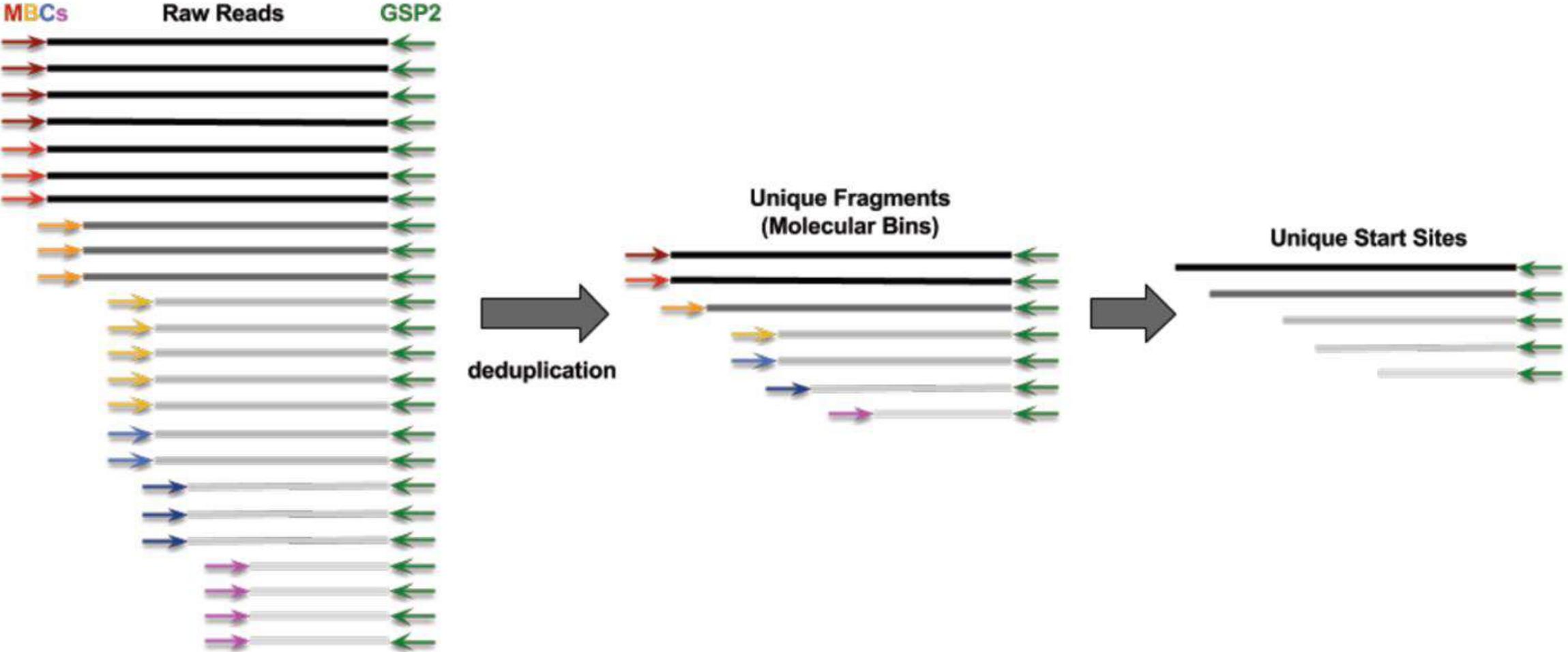
Rappels technologie Anchor-PCR (Archer Fusion Plex)



Rappels technologie MBC (Archer Fusion Plex)



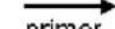
Sample indexes for



Capture probe 



primer 

primer 

primer 



Paramètres du sample QC: compilation des plusieurs critères

Variant QC (versant DNA): gage d'un nombre de read minimal pour la lecture des variants

Fusion QC(versant RNA): Gage d'une expression minimale de gènes de ménage

General Analysis Settings

MIN_AVERAGE_UNIQUE_DNA_AND_AMBIG_START_SITES_PER_GSP2	50
MIN_AVERAGE_UNIQUE_RNA_START_SITES_PER_GSP2_CONTROLS	10
ERROR_CORRECTION = utilisation des MBC	On
READ_DEPTH_NORMALIZATION = downsampling si nombre de reads > à 3500000.	3500000 → 0
BARCODE_LENGTH = nb de bp des MBC	8
DEBUG = permet de garder les temporary files au cas où	Off



Molecular Barcode Statistics

Total Fragments	Fragments with Complete Adapter	Number of Reads After Trimming Adapters
2,833,885 > 4M voulu	2,758,836	2,340,811

[Export Data \(tsv\)](#)

Read Statistics

Type	Total Fragments (# / %)	Mapped (# / %)	Pass Alignment Filter (%)	On Target (%)
All Fragments	2,340,811 / 100.0	2,332,181 / 99.6	99.6	98.7
Unique Fragments	164,528 / 7.0 >5%	162,889 / 99.0	99.0	91.7

[Export Data \(tsv\)](#)

DNA/RNA Statistics

Reads avec jonction exon-intron

Reads avec jonction exon-exon

Autres reads

Type	DNA Reads (# / %)	RNA Reads (# / %)	Ambiguous Reads (# / %)
All Fragments	669,950.0 / 29.1	1,090,069.0 / 47.4	541,704.0 / 23.5
Molecular Bins =molecular fragment	38,937.0 / 26.1 >20%	78,975.0 / 52.9 >20%	31,411.0 / 21.0
Average Molecular Bins per GSP2	106.39	215.78	85.82
Unique Start Sites	17,667.0 / 55.5	9,793.0 / 30.8	5,948.0 / 18.7
Average Unique Start Sites per GSP2	49.32 +	33.04 → 64,48 >50	18.18
Average Unique Start Sites per GSP2 Control	49.75	99.0 >10	30.75

Par rapport au région d'intérêt d'Archer Comprehensive Targets NIH v1.3.1



QC Statistics

Avg. Unique DNA And Ambiguous Start Sites Per GSP2	Avg. Unique RNA Start Sites Per GSP2 Control
67.48 >50	99.0 ✔ >10

Miscellaneous Statistics

On Target Deduplication Ratio
15.41:1

[Export Data \(tsv\)](#)

DNA/RNA Fragment Lengths

DNA Median Fragment Length	DNA Mean Fragment Length	RNA Median Fragment Length	RNA Mean Fragment Length
125.0 >100	142.0	103.0 >100	114.4

[Export Data \(tsv\)](#)



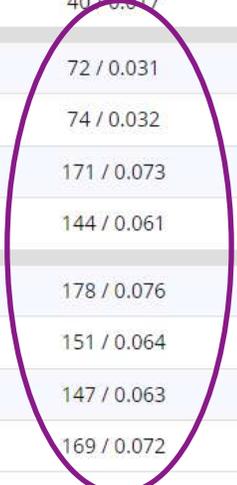
Dans Assay Target: Analyse du sexe

USP9X_chrX_40996236_26+_A1_GSP2	233 / 0.185
USP9X_chrX_41000406_25+_A1_GSP2	419 / 0.333
USP9X_chrX_41003799_29-_A1_GSP2	93 / 0.074
USP9X_chrX_41082481_28-_A1_GSP2	84 / 0.067
USP9Y_chrY_14838520_24-_A1_GSP2	0 / 0.000
USP9Y_chrY_14889957_22-_A1_GSP2	0 / 0.000
USP9Y_chrY_14898482_23-_A1_GSP2	0 / 0.000
USP9Y_chrY_14958404_26+_A1_GSP2	0 / 0.000
UTY_chrY_15362923_27-_A1_GSP2	0 / 0.000
UTY_chrY_15372172_27-_A1_GSP2	0 / 0.000
UTY_chrY_15469815_21+_A1_GSP2	0 / 0.000
UTY_chrY_15471669_29-_A1_GSP2	0 / 0.000



Femme

USP9X_chrX_40996236_26+_A1_GSP2	204 / 0.087
USP9X_chrX_41000406_25+_A1_GSP2	387 / 0.165
USP9X_chrX_41003799_29-_A1_GSP2	50 / 0.021
USP9X_chrX_41082481_28-_A1_GSP2	40 / 0.017
USP9Y_chrY_14838520_24-_A1_GSP2	72 / 0.031
USP9Y_chrY_14889957_22-_A1_GSP2	74 / 0.032
USP9Y_chrY_14898482_23-_A1_GSP2	171 / 0.073
USP9Y_chrY_14958404_26+_A1_GSP2	144 / 0.061
UTY_chrY_15362923_27-_A1_GSP2	178 / 0.076
UTY_chrY_15372172_27-_A1_GSP2	151 / 0.064
UTY_chrY_15469815_21+_A1_GSP2	147 / 0.063
UTY_chrY_15471669_29-_A1_GSP2	169 / 0.072



Homme



Approche pratico-pratique du RNA-seq (Archer fusionplex)

- **Archer Fusionplex Comprehensive Thyroid & Lung (CTL) depuis 2017 (5 ans)**
- **> 5 000 RNA-seq effectués depuis**
- **Utilisé au CLB pour :**
 - Cancer du poumon au diag
 - Rechute / résistance d'un cancer du poumon EGFR muté
 - Cancer colorectal
 - Cancer mélanome (theranostique)
 - Tumeur spitzoïde (HRAS)
 - Cancer du pancréas
 - CholangioK/voies biliaire
 - Cancer urothélial
 - Toutes demandes de recherches de fusion en théranostique
- **Custom panel (V6) depuis 2020 : rajout TP53, KEAP1, STK11, POLE (GST)**
=> bonne idée?

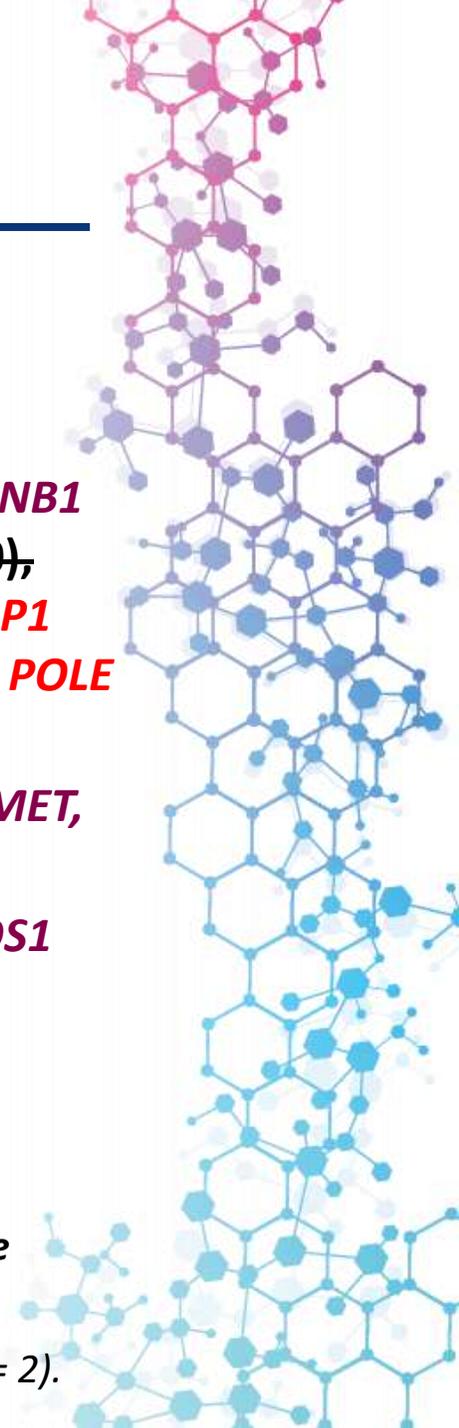


Design actuel (CTL_V6): ré-évalué

■ Cibles (exons étudiés entre parenthèses, ou « full » pour le gène entier) :

En **Rouge**: les rajouts de la V6, en **noir barré** : ce qu'on a enlevé de notre description suite à ré-évaluation

- Détection des mutations : **AKT1 (3), ALK (21, 22, 23, ~~24, 25~~), AXL (~~5, 11, 15, 17~~), BRAF (11, 15), CTNNB1 (3), DDR2 (17), EGFR (18, 19, 20, 21), ERBB2 (20), FGFR1 (13, ~~2, 8, 9, 10, 17~~), FGFR2 (~~2, 5, 7, 8, 9, 10~~), FGFR3 (~~3, 5, 8, 9, 10~~), GNA11 (4,5), GNAS (8, 9), GNAQ (4,5), HRAS (2, 3, 4), IDH1 (4), IDH2 (4), KEAP1 (full), KIT (11, 13, 17), KRAS (2, 3, 4), MAP2K1 (2, 3), MET (13 à 19), NRAS (2, 3, 4), PIK3CA (~~10~~, 21), POLE (9 à 14), RAF1 (~~4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12~~), RET (11, 13, 14, 15, 16), ROS1 (38), STK11 (full), TP53 (full)**
- Détection de transcrits de fusion : **ALK, AXL, BRAF, CCND1, EGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MAP2K1, MET, NRG1, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PPARG, RAF1, RET, ROS1, THADA**
- Expression: **ALK, ~~CCND1~~, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MET, NTRK1, NTRK2, NTRK3, RET, ROS1**
- Ce panel permet la détection :
 - Des **mutations** (dans les exons ou gènes entiers cités ci-dessus),
 - Des **transcrits de fusion** (technique semi-spécifique, n'importe quel partenaire de fusion des gènes ciblés peut être détecté),
 - Et de l'**expression** (confirmation d'amplifications des gènes sur-exprimés par technique FISH => LBlanches coupées = 2).



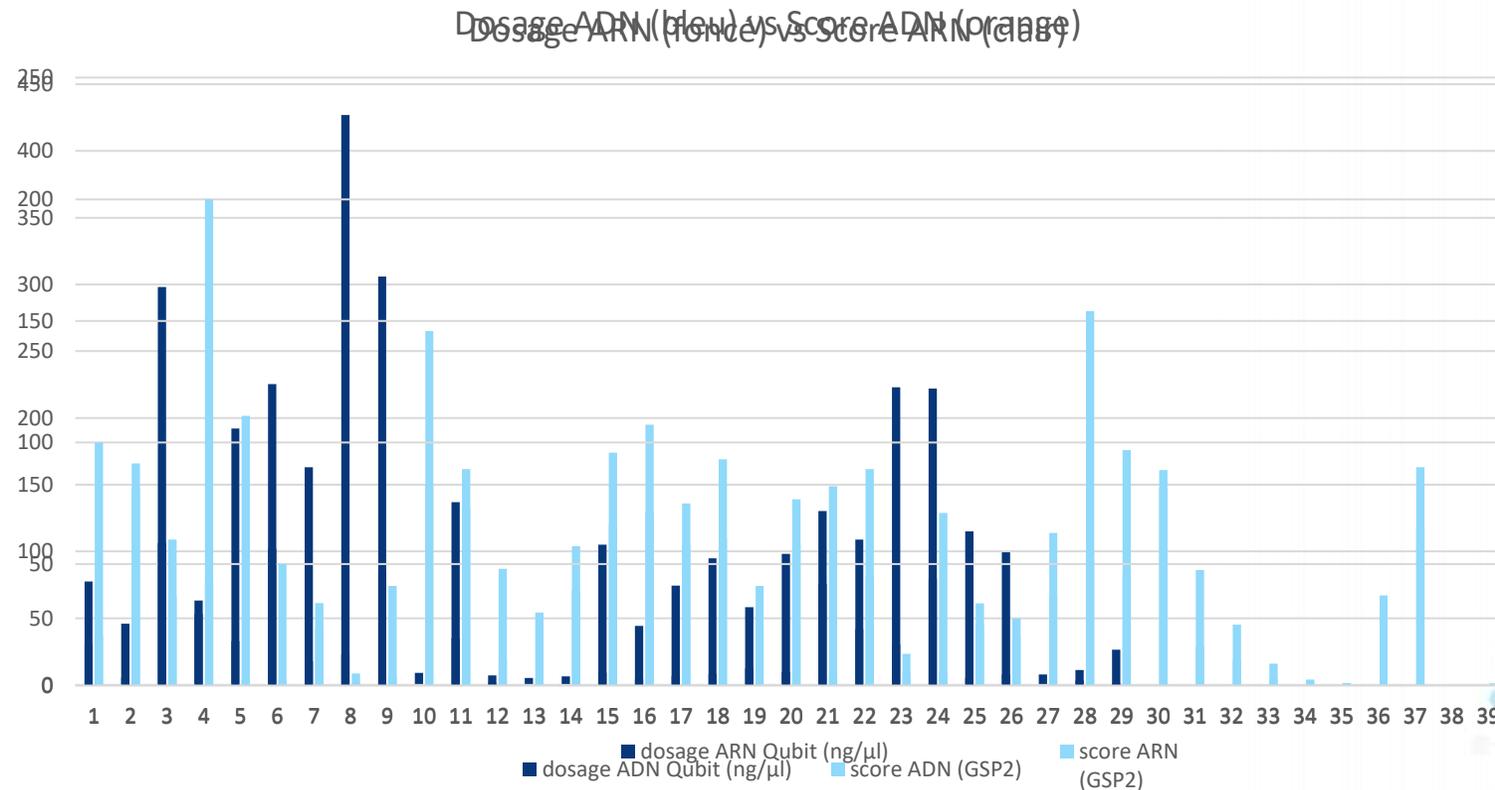
Extraction : préambule

- **Actuellement sur Maxwell (Promega) 16 (ref AS3050, 2015)**
 - Avec le kit « LEV RNA FFPE Kit», pas de DNase
 - Obtention de TNA (Total = ADN + ARN) dans un ratio d'environ 1/3 ADN 2/3 ARN (dépend des échantillons)
 - Dosage en routine d'ARN (seulement) par QuBit (DSDNA BR ASSAY KIT)
 - Input NGS de 200ng d'ARN (seulement fonction de l'ARN, pas de l'ADN)
 - Pas d'arrêt après le pré-seq => information surtout utile à posteriori de la technique
 - Si discordance entre concentration librairie finale vs pré-seq (cause à rechercher: mauvaise quantif de la librairie en qPCR : variance forte entre 2 répéatas?)
 - Repasse de l'échantillon (augmenter l'input à 400ng / 600ng)



Extraction : problématique

- L'extraction TNA ne permet pas, dans sa quantification (dosage quBit) ou qualification (DIN / RIN) de prédire la qualité de l'analyse finale (indicateur utilisé: score ARN = nombre moyen de reads ARN avec des « unique start site » par GSP2 servant comme contrôles (8 GSP2 sur 4 gènes de ménages)).
 - Certains échantillons sont très concentrés mais souvent mauvaise qualité
 - Certains échantillons sont indosables (ou < à la LOD) mais souvent de bonne qualité



Comment qualifier la qualité d'un bloc (prévoir la qualité de l'analyse) ?

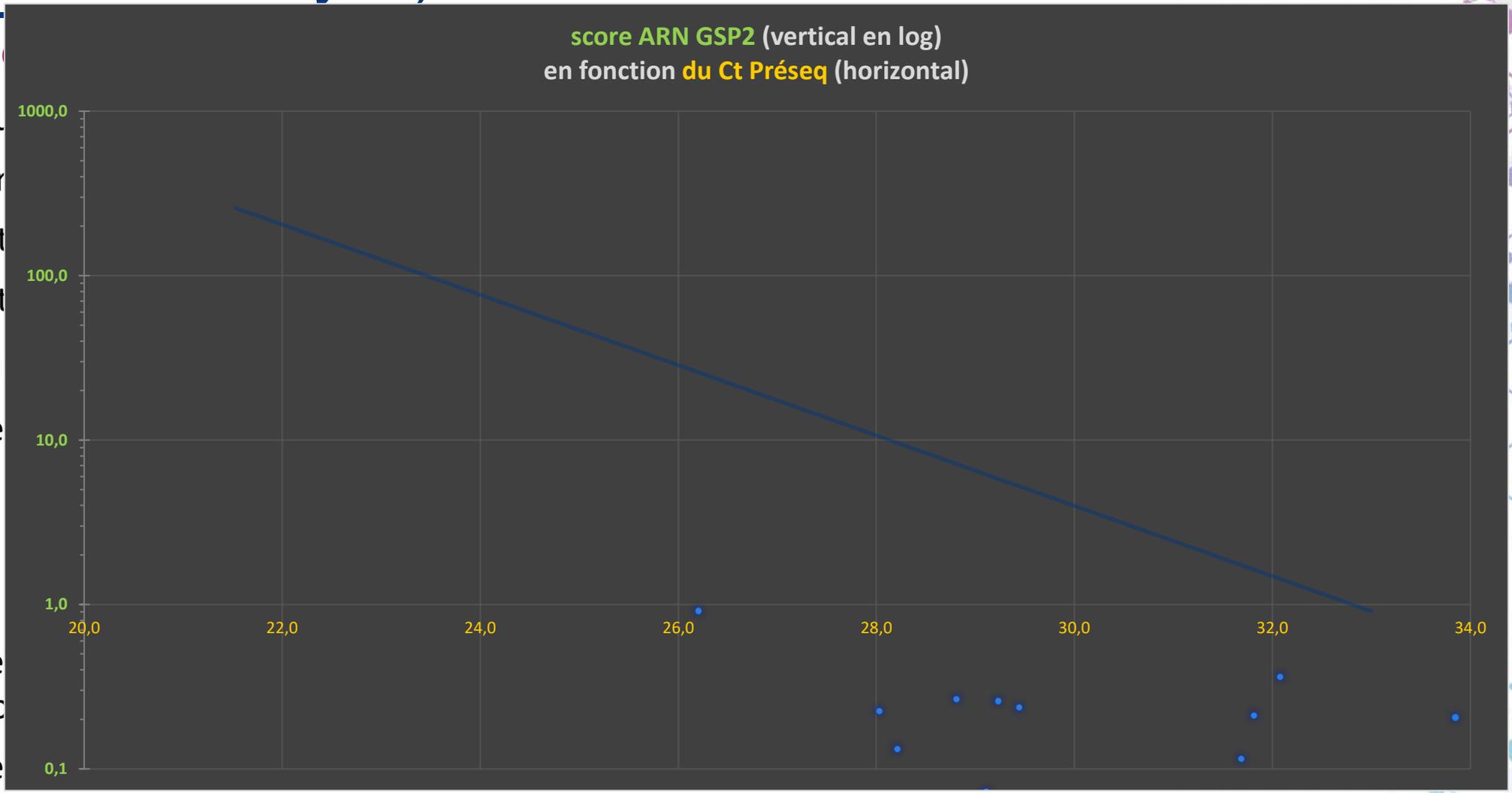


■ Compli

- Très sou
- sur
- Pas d'ut
- Pas d'ut

■ Au fina

- Si score
- Si score
- théranc
- Si score



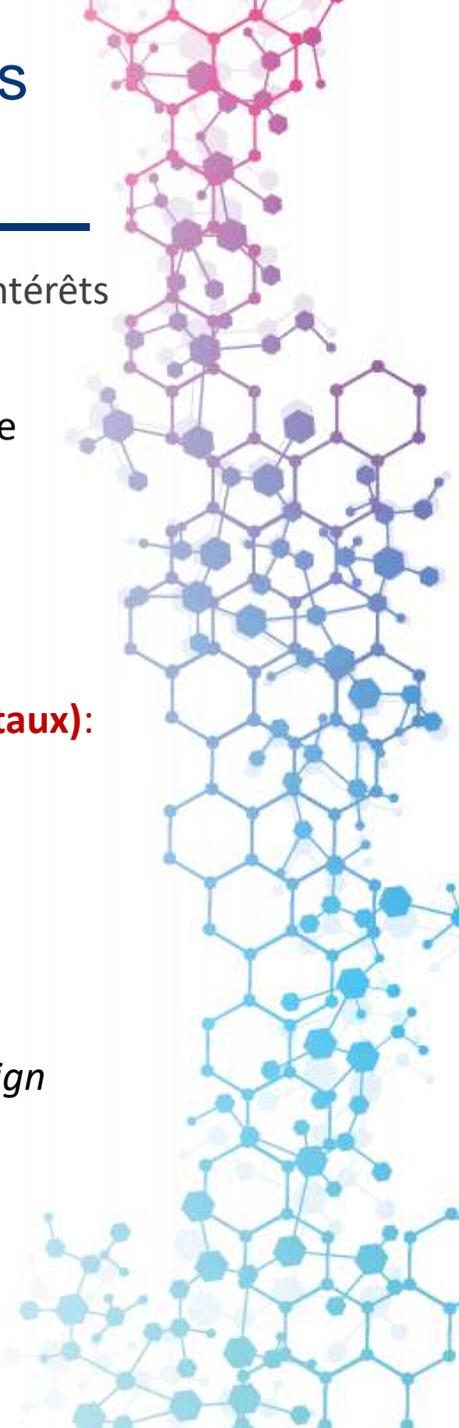
■ A savoir: Archer a arrêté depuis quelques mois de fournir en doublons les réactifs pour aller jusqu'au QC Préseq → Réactifs perdus si on s'arrête (autant continuer jusqu'au séquençage)

Difficultés spécifiques au RNA-seq ciblé

- ❖ Les résultats obtenus sont **dépendants de l'expression** du gène dans la tumeur → paramètre difficilement maîtrisable et non évalué chez nous (niveau d'expression d'un gène par organe non connu...)
- ❖ Un gène peut être « faiblement » exprimé mais être quand même d'une **importance majeure** pour la prise en charge du patient (les gènes non-kinases comme POLE)
 - ➔ Risque de FN
- ❖ Difficultés à robotiser la technique (Beckman) : au niveau de la ligation 2 => lyophilisat rond et gros (bouche le tube) compliqué à mettre en suspension => obligé de faire un stop et étape manuelle



Difficultés liées au Design (révélées par CQE + Analyse des fréquences de mutations // littérature + analyse poussée du design de probes)



- **Résultats rendus faux pour le gène *PIK3CA*** : gène rendu non muté (négatif) alors que la moitié des altérations d'intérêts ne sont pas couvertes/analysées par le CTL (**CQE FAUX**)
- ➔ Heureusement ce gène est non essentiel pour une AMM/ATU. Il est utile pour des **essais cliniques** (perte de chance d'accès aux essais cliniques)

Solution temporaire: *PIK3CA* région d'intérêt exon 10 enlevé du panel et précisé dans le CR pour les cliniciens

- **Résultats rendus faux pour les 2/3 des cancers de l'endomètre (et probablement pour plusieurs cancers colorectaux):** la moitié des altérations d'intérêt du gène *POLE* ne sont pas couvertes/analysées
- ➔ Gène nécessaire à la **classification** des endomètres depuis environ 2 ans + utiles pour des **essais cliniques** d'immunothérapie avec de très bon résultats dans les CRC.

Solution temporaire:

- **Rattrapage** de tous les endomètres passés ces dernières années → repasse en technique Sanger (*nouveau design (EB/NI), recherche des patients, réanalyse sur Archer...*)
- Les nouveaux endomètres sont passés en STS (pour TP53) **et** en sanger (pour détection de POLE).
- Colon toujours passés en RNAseq : si couverture POLE faible → passés en sanger

Difficultés liées au Design (révélées par CQE + Analyse des fréquences de mutations // littérature + analyse poussée du design de probes)

- **Résultats rendus faux pour l'exploration des gènes *FGFR1/2/3* (SNV)** : le panel ne contient pas les régions d'intérêt utiles pour la prise en charge des cancers urothéliaux (et cholangiocarcinomes)
- ➔ **ATU nominative** dans les cancers urothéliaux depuis juillet 2021. **Essais clinique** pour les autres cancers (cholangiocarcinomes +++)

Solution temporaire :

- **Rattrapage** de tous les cancers urothéliaux/vessie depuis juillet 2021 en panel STS
- Pour les nouveaux cancers urothéliaux /vessie, faire RNAseq ciblé + STS.
- Pour les nouveaux cholangiocarcinomes, RNAseq **puis** STS (si RNAseq neg)
- **Résultats rendus faux pour les mutations de résistances *ALK, ROS1***: le panel ne contient pas toutes les régions d'intérêts utiles pour la détection des mutations de résistances (ou régions mal couvertes)
- ➔ **Essais cliniques +++** (perte de chance d'accès aux essais cliniques)

Solution temporaire : Les nouveaux prélèvements sont passés en analyse STS



Difficultés liées au Design (révélées par CQE + Analyse des fréquences de mutations // littérature + analyse poussée du design de probes)

- **Résultats potentiellement faux pour l'exploration des résistances des cancers du poumon mutés *EGFR***: corrélation entre l'expression de *MET* et l'amplification de *MET* non maîtrisée, faux-négatifs possibles

→ **Essais cliniques+++** (perte de chance d'accès aux essais cliniques)

Solution temporaire : Pour tous les nouvelles demandes de cancers du poumon résistants à l'osimertinib : RNAseq ciblé + FISH *MET* et *ERBB2* en systématique

- **Proportion d'altérations détectées dans les mélanomes inférieure à la moyenne nationale** : biais de sélection des patients du CLB ou lié à des faux négatifs de l'analyse CTL? Idem pour les autres localisations (poumon ok mais colon, endomètre...)?

→ **Possiblement d'autres résultats rendus faux non rattrapables**

Solution temporaire : Indicateurs de coverage/depth sur les hotspots par pathologie implémentée en routine → réalisée avec l'aide d'Archer (création de filtres spécifiques basées sur le fichier hotspot selon la pathologie)



Difficultés liées au Design (révélées par CQE + Analyse des fréquences de mutations // littérature + analyse poussée du design de probes)

- ▶ Poumon: **EGFR, KRAS, BRAF, ERBB2**, *KEAP1, STK11, PIK3CA (que l'ex21 pour l'instant)*
- ▶ Colon: **KRAS, NRAS, BRAF, POLE**, *PIK3CA (que l'ex21 pour l'instant)*
- ▶ Mélanome: **BRAF, NRAS**, *KIT, HRAS, GNA11, GNAQ, IDH1*
- ▶ Endomètre: **POLE**, *CTNNB1, TP53, KRAS, PIK3CA (que l'ex21 pour l'instant)*
- ▶ Cholangiocarcinome: **IDH1**, *BRAF, ERBB2, FGFR2, FGFR1, PIK3CA (que l'ex21 pour l'instant)*
- ▶ Vessie/urothéliale: **FGFR2, FGFR3, FGFR1**, *DDR2*
- ▶ Estomac: **ERBB2**, *PIK3CA, MET*
- ▶ Thyroïde: **RET**
- ▶ Histiocytose: **BRAF, MAP2K1**
- ▶ Pancréas: **KRAS**, *BRAF, PIK3CA, ERBB2*
- ▶ **Remarque**: les autres gènes servent pour des essais cliniques: *RAF1, AKT1, IDH2...*



Difficultés liées au Design (révélées par CQE + Analyse des fréquences de mutations // littérature + analyse poussée du design de probes)

Dans le cas d'un échantillon contributif (non QC failed)

- ▶ Si tous les gènes d'intérêt (hotspots) >50X : OK
 - ▶ Si un ou plusieurs des gènes d'intérêts (hotspots) <50X:
 - ❖ Si l'échantillon est muté (patho) sur un hotspot: Rendre le résultat et indiquer dans le compte-rendu : *A noter que la faible profondeur n'a pas permis d'avoir une sensibilité analytique optimale pour ce(s) gène(s) d'intérêts ...*
 - ❖ Si l'échantillon est WT: le biologiste gère au cas par cas
- exemple** : - Mélanome WT avec BRAF V600E < 50X → ddPCR ou STS.
- Mélanome WT avec BRAF ex11 < 50X → rendre en ajoutant la phrase : *A noter que la faible profondeur n'a pas permis d'avoir une sensibilité analytique optimale pour l'exon11 du gène BRAF.*

Si QCfailed : on garde la routine habituelle (cf document « Interprétation technique et biologique du CTL sur ArcherDX », déjà validé ensemble)

Difficultés liées au Design (révélées par CQE + Analyse des fréquences de mutations // littérature + analyse poussée du design de probes)

➤ Ces solutions temporaires sont :

- ❖ Chronophages (formation techniciennes, secrétaires, rattrapage des dossiers...)
- ❖ Gaspillage du matériel tumoral (double extraction TNA/ADN)
- ❖ Augmentation des coûts (doubles techniques)
- ❖ Faible sensibilité (sanger)
- ❖ Base access/publipostage non appropriés pour faire du cas par cas...

Réflexion en cours pour une solution plus pérenne:

- **Update panel CTL**
- Re-design du panel STS
- Nouveau panel autre...

Mais manque de temps, priorisation nécessaire



Difficultés liées au Design (révélées par CQE + Analyse des fréquences de mutations // littérature + analyse poussée du design de probes)

VALIDATION TECHNIQUE RUN RNASEQ – PANEL CTL	
Résultats limites	<ul style="list-style-type: none"> Quantité de TNA mise dans la technique est < 200ng Valeur du Preseq est ≥ 30 CT entre 10 et 20% Concentration des librairies est < 200 nM Nombre de variant dans « low confidence » de Sophia est >1000
Non contributifs	<ul style="list-style-type: none"> QC failed ou CT<10% Autre critères en réflexion (Emmanuel)
QC fail	Repasser à 400ng (en fonction de la concentration de l'échantillon) sauf si : <ul style="list-style-type: none"> la [C]^o initiale de l'échantillon < 0,05 ng/μl ou ne permettant pas une repasse à 400ng détection d'une mutation d'intérêt (AMM...) •si QCfailed <5

VALIDATION BIOLOGIQUE RUN RNASEQ – PANEL CTL	
FUSION – EXON SKIPPING – NOVEL ISOFORM	
FUSION	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Fusions « True » dans colonnes Strong et Inframe avec Reads >40 et SS>10 rendues sans vérification. ✓ Fusions « True » dans colonnes Strong et Inframe avec des Reads <40 ou SS<10 doivent être vérifiées par FISH ou IHC sauf si déjà confirmé par une autre technique (ex : IHC pour ALK, ROS). <i>Remarque : certaines fusions à bas bruit (reads <40 et SS<10) sont des artefacts (PTPRZ1 → MET) et ne nécessitent pas de vérification.</i> ✓ Fusions « False » ou « unknown » dans colonnes Strong ou inframe ne sont pas considérées. Elles peuvent être vérifiées à la discrétion du biologiste si forte suspicion [IHC ALK/ROS +, gène supp de tumeur (TP53)]... ✓ Aucune fusion ne sera rendue si QC failed mais une autre technique pourra être lancée pour confirmer des suspicions (ex : fusion de ALK true true >10ss >20 reads chez un non-fumeur...)
Exon Skipping	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Tous les exons skipping (SS> 10 et Depth > 10) → Sanger de vérif^o et détermination mutation d'épissage ✓ Les exons skipping SS<10 et Depth < 10 → faux positifs → non rendus. Ils peuvent néanmoins être vérifiés par repasse CTL par le biologiste en fonction du contexte clinique... ✓ Aucun exon skipping ne sera rendu si QC failed (mais une autre technique ou repasse pourra être lancée pour confirmer des suspicions fortes (ex : exon skipping MET >10ss >20 Depth chez un non-fumeur...))
Novel Isoform	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Attention artefacts répétitif → colonne TO très informative ✓ Des « novel isoform » avec TO <20, SS>20 et reads >50, hors gène THADA doivent être explorés plus en détail par les biologistes avant un possible rendu : recherche de mutation d'épissage (sanger...), transcript alternatif déjà décrit dans la littérature, mutation de l'exon20 de ERBB2... ✓ Aucun novel isoform ne sera rendu si QC failed (mais autre technique/repasse possible si douteux)



Difficultés liées au Design (révélées par CQE + Analyse des fréquences de mutations // littérature + analyse poussée du design de probes)

EXPRESSION	
Données actuelles (Etude Gaëlle)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Moyenne des niveaux d'expression étudiés : 0,7 à 31,4. ✓ Pas de corrélation expression/amplification franche. Pas de corrélation avec %CT ✓ Seuils par gène pas évident à déterminer. Si QC failed → souvent c'est des faux positifs (n=4) ✓ En global : seuil actuel de > 2 → Aucun faux négatif mais 21 « faux positifs » (analyse FISH neg)
Stratégie : Diminuer le nombre de vérification FISH	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Seulement rendre une surexpression si >2,5. <i>Présence d'une surexpression du gène XX (moyenne d'expression XXX).</i> ✓ Lancer une vérif FISH uniquement si moy d'expression >2,5 et absence de fusion ou mutation du même gène déjà présente (hors mécanisme de résistance suspecté). <i>Présence d'une surexpression du gène XX (moyenne d'expression XXX). Une recherche d'amplification génique est en cours par technique FISH pour rechercher un mécanisme possible de la surexpression. Elle fera l'objet d'un compte rendu séparé.</i> ✓ L'expression n'est pas rendue/vérifiée si QC sont failed (mais demander FISH si cas vraiment suspicieux)
MUTATION	
Remarque	<ul style="list-style-type: none"> ✓ <u>Mauvaise détection des mutations ERBB2</u> (duplication, insertion) : parfois rapportées dans « novel isoform », parfois dans « All results » uniquement... Toujours regarder sur Sophia genetics. ✓ <u>Mauvaise détection des mutations de PIK3CA</u> (couverture faible) : Toujours regarder sur Sophia genetics. ✓ Archer : KRAS : très peu de faux positif donc ne pas hésiter à faire confirmer ✓ Ne jamais mettre de filtre sur les « artéfacts ». Car mal enregistrés (EGFR T790M enregistré en artéfact) ✓ Rappel : notre technique est basée sur l'analyse de l'ARN → pas fiable pour détecter les mutations introniques ou jonction exon/intron (parfois détectable car contamination ADN)
Stratégie :	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Pour être considéré, un variant doit présenter les caractéristiques suivantes : AO>=5, UAO>=3, Depth>=20, AF>=5%, non synonyme et non intronique (+/- 5) = « filtre général » ✓ Les variants de la liste de hotspot (Archer comprehensive targets) doivent être recherchés avec des paramètres moins stringents : AO>=2, UAO>=1, AF>=1%. <ul style="list-style-type: none"> - Entre 1 et 2%, les mutations ne sont pas considérées sauf cas particuliers (CT <10%...). - Entre 2 et 5%, les variants d'intérêts cliniques seront rendus <u>après vérification par une autre technique dans la mesure du possible (ddPCR...)</u> ✓ Si QC failed <ul style="list-style-type: none"> - Mais Avg. Unique DNA And Ambiguous Start Sites Per GSP2>50 : les mutations d'intérêt clinique >10% peuvent être rendues <u>sans vérification</u>. - Mais Avg. Unique DNA And Ambiguous Start Sites Per GSP2<50 : rendre les mutations d'intérêt clinique <u>après vérification</u> par une autre technique (si possible) ✓ Si l'échantillon est « désaminé et/ou limite », les VUS < 20% ne sont pas rendus. ✓ Toujours vérifier par technique Sanger (ou repasse CTL) les variants détectés par un seul pipeline (Archer ou Sophia) alors qu'ils devraient être vus par les 2 (<i>Exemple PIK3CA, ERBB2, MET...</i>)



Améliorations

- **Simplification du dosage des librairies au chargement de séquençage (gain de tps technique)**
 - ➔ qPCR vers dosage QuBit simple
 - ➔ Moins homogène mais suffisant (sur-séquençage des échantillons : Nextseq, 8M de reads visés)
- **CQI mutation en plus du CQI fusion**
- **Indicateur de « genre » (X / Y) : permet de repérer de possibles inversions de patients en techniques (si mauvaise qualité => FN / FP) car plus de vérifications Sanger**
- **V7 : disponible en ligne depuis 1 an environ. Maintenant disponible en VM (sera installée en janvier 2023)**
 - Améliore la détection des insertions dans l'exon 20 d'ERBB2 (HER2)
 - Pas beaucoup mieux sur le reste des problèmes



Améliorations

Gene/mutation	Problème	V7
Dup de ERBB2	déecté que en novel isoform, pas en variant	Ok vu dans "variant"
Nomenclature KRAS	"delins" appelée "inv"	Idem
TP53 dup 45nt	déecté que en novel isoform, pas en variant	Idem
Del RET c.1886_1891del	vue à 0,5% au lieu de 50%	Idem
TP53 c.919+1G>A	saut exon8 bien vu mais pas la mutation causale	Idem
BRAF mut epissage c.1742A>G	non vue au lieu de 18%	vue à 1,3% au lieu de 18%
TP53 c.272+15_919+27	saut exon7/8 bien vu mais pas la mutation causale	Idem
MET exon skipping c.3082G>A	saut exon14 bien vu mais pas la mutation causale	Idem
PIK3CA Q546L	Non vue par Archer (rattrapage par Sophia)	Idem
CQE PIK3CA E545K 20%	Non vue par Archer (rattrapage par Sophia)	Idem
ERBB2	vue à 1,2% dans novel isoform et dans variant	Ok vu dans "variant"



Améliorations

- **Simplification du dosage des librairies au chargement de séquençage (gain de tps technique)**
 - ➔ qPCR vers dosage QuBit simple
 - ➔ Moins homogène mais suffisant (sur-séquençage des échantillons : Nextseq, 8M de reads visés)
- **CQI mutation en plus du CQI fusion**
- **Indicateur de « genre » (X / Y) : permet de repérer de possibles inversions de patients en techniques (si mauvaise qualité => FN / FP) car plus de vérifications Sanger**
- **V7 : disponible en ligne depuis 1 an environ. Maintenant disponible en VM (sera installée en janvier 2023)**
 - Améliore la détection des insertions dans l'exon 20 d'ERBB2 (HER2)
 - Pas beaucoup mieux sur le reste des problèmes
- **Elargissement du fichier GTF pour avoir en ROI les introns**
 - Pas beaucoup mieux => problème d'appel de variants (pas fait pour en fusionplex)



Nouvelle version : ajout : V7

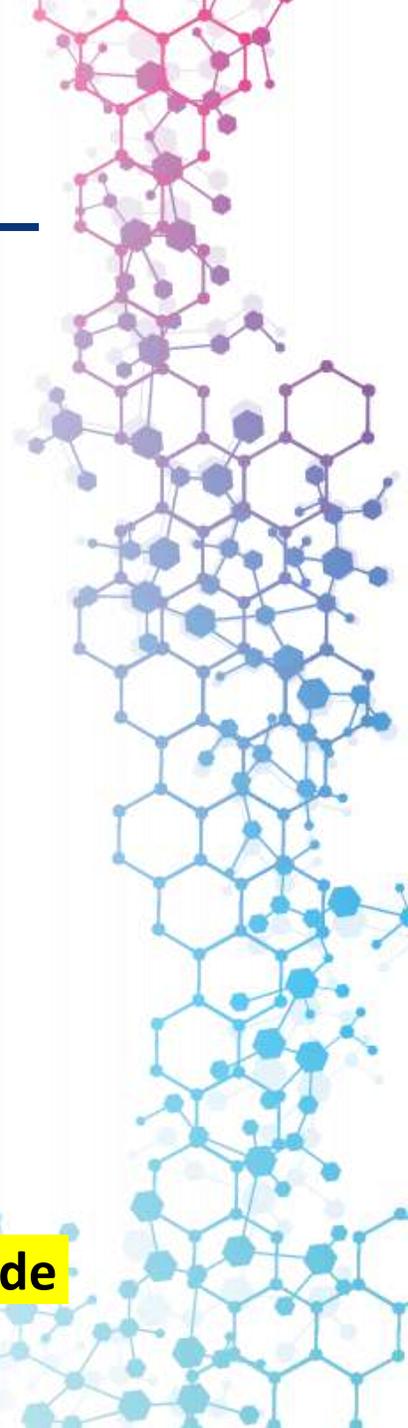
- **PRIX!!!! => 297€ demandé vs 120€ pour le V6 (grosse remise négociée)**
 - **Se fait en plusieurs mois**
 - **2 rajouts designés (probes ADN ou probes ARN)**
 - Commandé que les probes ARN
 - ➔ Sera testé pour début 2023 (avec la V7 de la VM)
 - ➔ Assez peu optimiste sur l'excellence des performances pour toutes les cibles
 - ➔ Difficultés d'homogénéité dans l'analyse / demande de l'expérience pour ne pas tomber dans les pièges de la technique (et des limites des échantillons)
 - ➔ Problème de rachat d'Invitae / Archer ? ➔ pas vraiment, pas d'arrêt de prod / livraison ? (mais perte de vitesse dans le développement ?)
- Au final:
- ➔ Changement de technologie / fournisseur ?



Cahier des charges d'un test biomarqueur « parfait »

- **Garder l'idée d'un test 2 ou 3 en 1 (Détection SNV, fusion, +/- amplif ou expression)**
- **Réalisation d'une seule librairie (limite des couts / temps technique) → Utilisation de TNA (à tester versus extraction ADN et ARN et ratio ADN / ARN contrôlé)**
- **Parfaite détection des SNV :**
 - Non dépendante exclusivement de l'ARN (pas de FN pour gènes peu exprimés)
 - Capture > amplicon
- **Parfaite détection des amplifs +/- expression**
 - Le plus compliqué (possible surexpression sans amplif)
 - Demande à pouvoir détecter quelles reads proviennent d'une matrice ARN d'une matrice ADN !
 - Impossible pour le moment (Archer et SG) !

Au global : Réflexion actuellement pour réaliser un custom de la solution ROS de SG (projet à plusieurs? => partage des couts du custom : 20k€ minimum!)



MERCI DE VOTRE ATTENTION

merci à mon équipe et G.Tachon pour son travail



Patiente: 2122053 : mutation BRAF loupée sur Archer

- Prélèvement poumon LSD récent (CLB)
- 50% cellules tum
- Bonne qualité => RAS sur le prélèvement

Total Fragments	Fragments with Complete Adapter	Number of Reads After Trimming Adapters
2,826,620	2,737,323	2,219,050

istics

Total Fragments (# / %)	Mapped (# / %)	Pass Alignment Filter (%)	On Target (%)
2,219,050 / 100.0	2,215,161 / 99.8	99.8	97.8
842,080 / 37.9	839,766 / 99.7	99.7	95.3

Statistics

	DNA Reads (# / %)	RNA Reads (# / %)	Ambiguous Reads (# / %)
	113,132 / 5.2	1,469,831 / 67.9	582,634 / 26.9
	48,182 / 6.0	562,771 / 70.3	189,714 / 23.7
Bins per GSP2	131.64	1,537.63	518.34
	21,446 / 34.7	37,939 / 61.5	10,436 / 16.9
Start Sites per GSP2	61.31	158.81	35.28
Start Sites per GSP2 Control	87.12	343.62	44.12

tics

Avg. Unique DNA And Ambiguous Start Sites Per GSP2	Avg. Unique RNA Start Sites Per GSP2 Control
96.33	343.62



Patiente: 2122053 : mutation BRAF loupée sur Archer



- Pas de mutation a rapporter dans Archer

RNA Variant - RNA Variant with Outlier - All Results - RNA variant ciblé - Low confidence variant ciblé - Low confidence Depth - Low confidence AF - New

Edit Columns Save

Actions	Classification	Report	Symbol	Trans	Exon	HGVSc	HGVSp	AF	Depth	AO	UAO	UDP	TO	Clinical Significance	Consequence	gnomAD AF	COSMICID	DBSNPID	DAO
			ERBB2	NM_004448.3	23/27	c.2838_2841delinsATGT	p.IleCys946=	0.8571	35	30	3	7	1325		Multiple annotations				0
			ERBB2	NM_004448.3	23/27	c.2847T>C	p.Ile949=	0.8857	35	31	5	8	1349		Multiple annotations				0
			ERBB2	NM_004448.3	23/27	c.2838C>A	p.Ile946=	0.8387	31	26	3	7	1322		Multiple annotations				0
			ERBB2	NM_004448.3	23/27	c.2841C>T	p.Cys947=	0.8529	34	29	3	7	1318		Multiple annotations				0
			FGFR1	NM_015850.3	2/18	c.-87del	Blank	0.0705	2496	176	4	329	178		splice_region_variant&5_prime_UTR_variant				3
			FGFR2	NM_000141.4	6/18	c.696A>G	p.Val232=	0.9994	1601	1600	199	200	1899	Benign	Multiple annotations	0.7813		rs1047100	52
			FGFR2	NM_000141.4	1/18	c.-236G>A		0.4865	1034	503	92	206	1721	Benign	5_prime_UTR_variant			rs1047111	21
			FGFR3	NM_000142.4		c.2275-3C>G		0.1092	174	19	9	73	80		splice_region_variant&intron_variant				0
			FGFR3	NM_000142.4		c.2275-1G>C		0.1086	175	19	9	74	162		splice_acceptor_variant				0
			GNAS	NM_000516.5	5/13	c.393C>T	p.Ile131=	0.9991	2169	2167	104	106	1500	Benign	Multiple annotations	0.5416	COSM3758661	rs7121	0
			HRAS	NM_005343.3	2/6	c.81T>C	p.His27=	0.4734	169	80	31	62	1261	Benign	Multiple annotations	0.3157	COSM3752426	rs12628	2
			IDH1	NM_005896.3	6/10	c.548A>G	p.Tyr183Cys	0.4848	821	398	50	111	29	Not provided	missense_variant	0.009861		rs34599179	0
			KIT	NM_000222.2	10/21	c.1621A>C	p.Met541Leu	0.4812	1891	910	234	477	415	Benign	missense_variant	0.07723	COSM28026	rs3822214	37
			KRAS	NM_004985.4	Blank	c.451-5617G>A	Blank	0.9907	107	106	38	39	1766	Benign,Benign	intron_variant	0.9996		rs4362222	6
			MET	NM_000245.3	Blank	Blank		1.0000	24	24	12	12	933	Uncertain significance	Multiple annotations			rs1858830	0
	Likely Benign		NTRK2	NM_006180.4	8/21	c.500C>A	p.Ser167Tyr	0.2240	125	28	18	51	2		missense_variant	0.0009787			1
			POLE	NM_006231.3	8/49	c.755C>T	p.Ala252Val	0.5960	99	59	22	40	277		missense_variant	0.08577			0
			ROS1	NM_002944.2		c.5778-1del		0.8975	5649	5070	280	446	1154		splice_acceptor_variant				871
			ROS1	NM_002944.2	5/43	c.433A>C	p.Thr145Pro	0.5045	773	390	71	141	239		missense_variant	0.1615	COSM4003668		1
			STK11	NM_000455.4	1/10	c.-107dup		0.2091	263	55	27	80	1539	Uncertain significance	5_prime_UTR_variant			rs886054212	0
			STK11	NM_000455.4	1/10	c.-107del		0.1630	362	59	23	104	1735		5_prime_UTR_variant				2
			TP53	NM_000546.5	4/11	c.215C>G	p.Pro72Arg	0.9955	9795	9751	459	490	2187	Benign,Benign	missense_variant	0.6686	COSM250061	rs1042522	1217
			TP53	NM_000546.5	Blank	c.376-91G>A		1.0000	116	116	51	51	2134		intron_variant				16



Patiente: 2122053 : mutation BRAF loupée sur Archer

- Mais mutation retrouvée dans SophiaDDM: 18% de VAF

OncoPortal Variants

SAMPLE #200251858 BM21004073 < 27/37 > RUN 26/11/2021 Run_CTL_225_231121 BM21004073 527 --

Low Coverage Patient Pathology (1) non-small cell lung carcinoma REPORTED 1/1 BRAF

SNVs/INDELS CNVs FUSIONS WARNINGS

Variant List - sorted by: Prediction>Pathogenicity class>Gene

IP	P...	S...	Actionability	C...	T...	Gene	Exon ID	Transcript	Coding cons...	c.DNA	Protein	D...	VF%	ref	alt	GnomAD	Filter	Processed ClinVar rat
A	★	⚠	⚠	7	SNP	BRAF	15	NM_004333.4	missense	c.1742A>G	p.(Asn581Ser)	442	18.2	T	C	.	.	Likely_pathogenic
C	1			11	SNP	CCND1	4	NM_053056.2	synonymous	c.723G>A	p.(Pro241=)	3411	47.7	G	A	0.4466	.	risk_factor
C	1			7	SNP	EGFR	20	NM_005228.4	synonymous	c.2361G>A	p.(Gln787=)	15165	99.9	G	A	0.5214	.	Benign
C	1	⚠		4	SNP	FGFR3	7	NM_000142.4	synonymous	c.882T>C	p.(Asn294=)	168	51.6	T	C	0.1639	.	Benign
C	1	⚠		11	SNP	HRAS	2	NM_005343.3	synonymous	c.81T>C	p.(His27=)	349	47.5	A	G	0.3188	.	Benign
C	1			7	SNP	MET	20	NM_001127500.2	synonymous	c.3912C>T	p.(Asp1304=)	5492	99.9	C	T	0.4225	.	Benign
C	1			10	SNP	RET	13	NM_020975.4	synonymous	c.2307G>T	p.(Leu769=)	1106	100.0	G	T	0.7437	.	Benign

Run_CTL_225_231121 / BM21004073_527_R1_001-

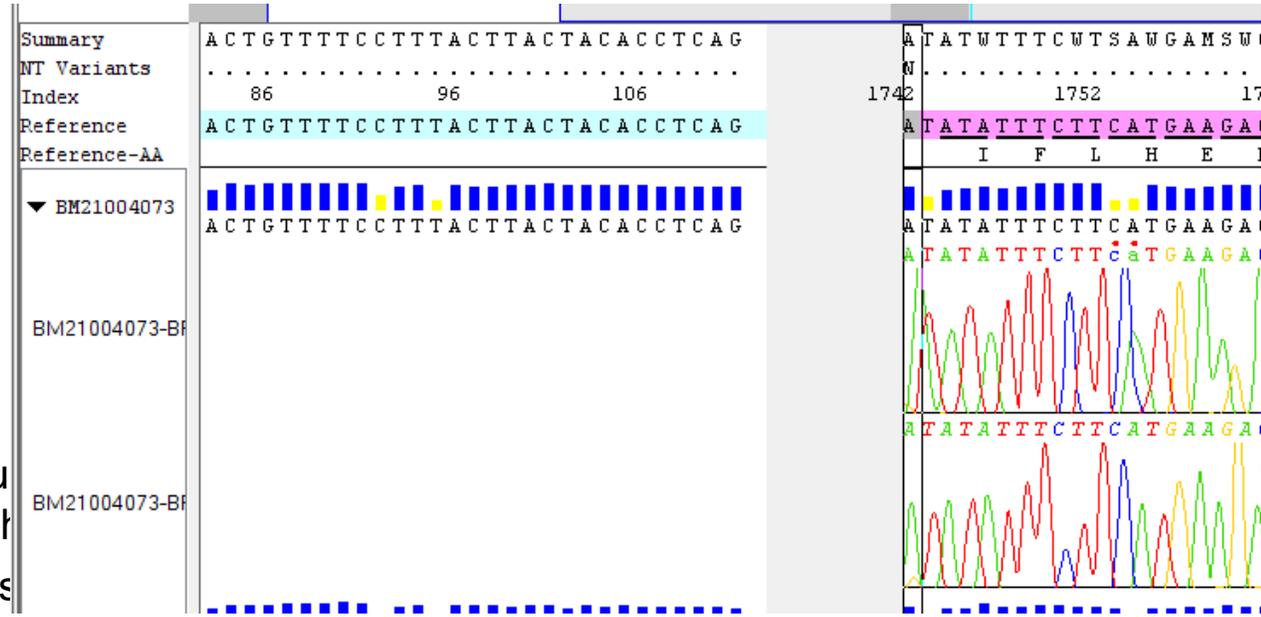
Search: BRAF

Actions	Classification	Report	AltFac	Symbol	HGVSp	HGVSc	Depth	AD	AF	Quality Score	TO	Rept	Alt	CTO	C Rept	C Alt	Has Sample Strand Bias	Primer Alt Reads +	Primer Alt Reads -	Primer Re
		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	BRAF	p.Asn581Ser	c.1742A>G	118	2	0.0159	83.2459	292	2	0	0	0	0	No	2	0	115
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	BRAF	p.Ser535Pro	c.1603T>C	243	2	0.0082	68.0	14	0	0	0	0	0	No	0	2	49
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	BRAF	p.Phe595Leu	c.1793T>C	173	1	0.0058	36.0	349	0	0	0	0	0	No	1	0	171
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	BRAF	p.Lys601Arg	c.1802A>G	175	1	0.0057	36.0	957	0	0	0	0	0	No	1	0	173
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	BRAF	p.Val600Met	c.1798G>A	174	1	0.0057	33.5549	152	1	0	0	0	0	No	1	0	173
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	BRAF	p.Ala598Val	c.1793C>T	175	1	0.0057	36.0	537	0	0	0	0	0	Yes	0	1	174
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	BRAF	p.Gly469Arg	c.1405G>C	4962	4	0.0008	164.0	401	0	0	0	0	0	No	2	2	2060
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	BRAF	p.Gly466Arg	c.1396G>A	5160	4	0.0008	134.0	645	1	0	0	0	0	No	2	2	2733
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	BRAF	p.Tyr472Cys	c.1415A>G	4465	3	0.0007	108.0	837	0	0	0	0	0	No	2	1	2915
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	BRAF	p.Arg350Gln	c.1051G>A	4316	3	0.0007	141.482	1033	0	0	0	0	0	No	2	1	2079

- Mutation à 1% sur Archer (en allant la chercher spécifiquement dans la barre de recherche) => non retenue

Patiente: 2122053 : mutation BRAF loupée sur Archer

- Pour enlever le doute: Sanger demandé sur BRAF exon 15: mutation retrouvée!

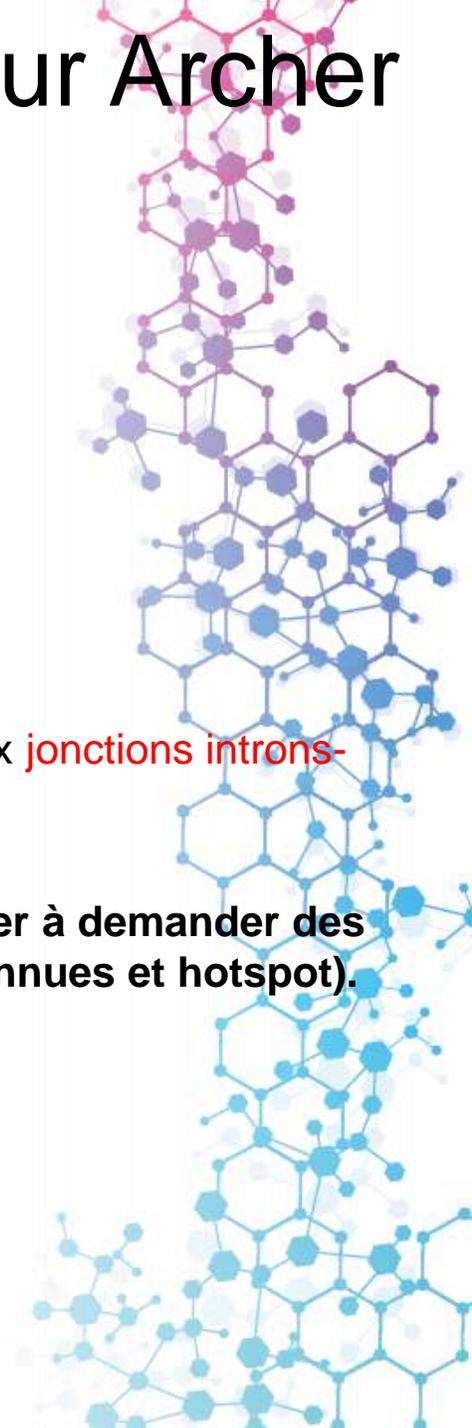


- Explications ?

- Certainement un pb du **exons** (pb connu d'Arch)
- Sophia n' a pas de pb s

- **Conclusion: FAIRE ATTENTION aux variants situés dans les jonctions introns-exons. Ne pas hésiter à demander des confirmations. Être alerte sur les discordances avec Sophia (essentiellement sur les mutations connues et hotspot).**

trouvées aux **jonctions introns-**



CNV intra-génique et « novel Isoform » dans Archer

- Dossier 2112122 : Kc poumon
 - Analyse circulant en 1^{er}:

Renseignements cliniques :

Analyse demandée le 20/04/2021 par le Dr Lebon, CH, Villefranche
 Situation clinique : Recherche de mutations du gène EGFR + autres
 Motif de prescription : Biopsie impossible à réaliser
 Stade avancé ou métastatique : Oui

Mutations connues du gène EGFR : Non

Traitement : Non
 Evénement : Diagnostic
 Prélèvement réalisé : Avant traitement

Prélèvement :

- Date de prélèvement : 20/04/2021
 - Heure de prélèvement : 14:30
 - Date de congélation : 21/04/2021
 - Heure de congélation : 12:00
 - Délai avant congélation : > 4 heures

Extraction :

- ADN extrait à partir de : 8 ml de plasma (tubes Streck)
 - Référence de l'ADN extrait : ADN n°1369
 - Quantité d'ADN extrait : 6.75 ng/ml
 - % d'ADN circulant : 49%

P	A	S...	Actionability	C...	T...	Gene	Exon ID	Transcript	Coding cons...	c.DNA	Protein	D...	VF%	ref
A	5	★	T1 T2 T3 T4 D P 7	SNP	EGFR	18	NM_005228.4	missense	c.2155G>T	p.(Gly719Cys)	9603	9.8 G	T	
A	5	★	T1 T2 T3 T4 D P 7	SNP	EGFR	20	NM_005228.4	missense	c.2303G>T	p.(Ser768Ile)	10168	9.4 G	T	
A	5	★		INDEL	TP53	7	NM_000546.5	splice_donor_...	c.672+215_919+27del	p.(?)	7975	11.0 TCCA...	T	
C	4			SNP	CDKN2A	2	NM_000077.4	missense	c.442G>A	p.(Ala148Thr)	7955	42.8 C	T	

Conclusion :

Biomarqueurs poumon sur ADN circulant par technique NGS : **sous réserve d'une quantité d'ADN extrait inférieure à la quantité optimale requise :**

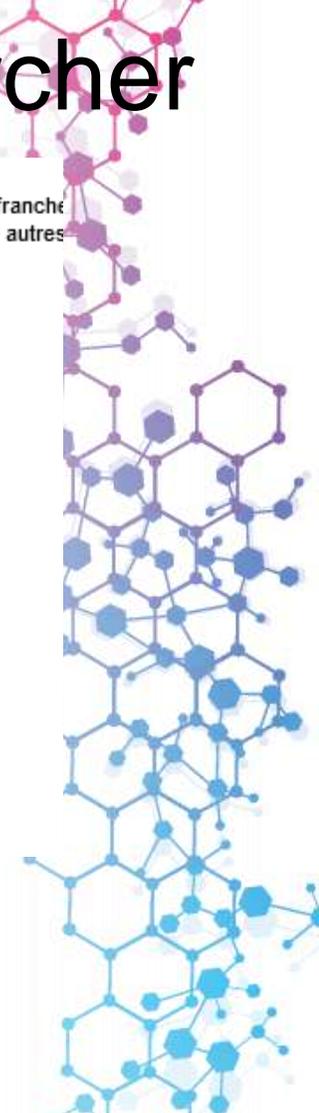
- Présence de la mutation p.(G719C) dans l'exon 18 du gène EGFR (fréquence allélique : 9.8%). Mutant sensible aux inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR.

- Présence de la mutation p.(S768I) dans l'exon 20 du gène EGFR (fréquence allélique : 9.4%). Mutant sensible aux inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR. L'intérêt clinique de cette co-mutation de moindre sensibilité (notamment aux inhibiteurs de 3ème génération) du gène EGFR est à discuter en RCP moléculaire.

- Présence de la mutation c.672+215_919+27del correspondant à la délétion des exons 7 et 8 du gène TP53 (fréquence allélique : 11%). Cette mutation a été décrite comme délétère, dans l'état actuel des connaissances.

- Absence de détection de mutation dans les autres exons analysés des gènes EGFR et TP53 et dans ceux analysés des gènes KRAS, BRAF, ERBB2, PIK3CA et MET, dans la limite du prélèvement analysé et des techniques utilisées.

Ces résultats doivent être interprétés avec précaution compte tenu de la faible proportion d'ADNct (49%).



- Suite sur Tumeur, analyse car échappement au tagrisso
 - On retrouve bien en ARN, dans la partie « novel Isoform », le transcrit particulier avec le saut des exons 7 et 8 dans le gène TP53 (délétère), mais la mutation TP53 est bien entendu non retrouvé dans l'analyse CTL !!!!!

- **Conclusion:** la catégorie Novel Isoform peut contenir des informations très intéressantes, le problème est la confirmation (ici le Sanger n'aurait pas trouvé la délétion des exons 7 et 8) et l'appréhension d'isoformes qui peuvent aussi se confondent avec des isoformes physiologiques (+ gène

Run_CTL_237_150222 / BM22000510_S20_R1_001-

Strong Fusions & Oncogenic Isoforms | Low Confidence Fusions | All Results | Novel Isoform | ERBB2 dup | ERBB2 dup c.2313 | Exon skipped | New

Search: (Grid Changed) | Edit Columns | Save Grid | Reset Grid

Actions	Classification	Report	Artifact	Series	SS	Reads	%Reads	Strong	Break	Chrom	Start	End	Type	InFrame	ITD Length	TO	Rept	Artif	Tier I	Tier II	Tier III	Tier IV	Germ	
				TP53	102	344	11.88	True		chr17:7578177,chr17:7576926			Novel Isoform	Exon(s) Skipped	False	N/A	2	0	0	0	0	0	0	0
GSP2s													Filters		Reads (#/%)		Start Sites							
TP53_chr17_7578184_20_-A1_GSP2 TP53_chr17_7576376_21_-A1_GSP2 TP53_chr17_7574002_21_-A1_GSP2 TP53_chr17_7572972_21_-A1_GSP2													<input checked="" type="checkbox"/>		344 / 11.88		102							
				TP53	27	59	75.64	True		chr17:7577963,chr17:7576991			Novel Isoform	Intronic	False	N/A	2	0	0	0	0	0	0	0
				TP53	12	18	20.69	True		chr17:7577967,chr17:7576995			Novel Isoform	Intronic	False	N/A	2	0	0	0	0	0	0	0
				AXL	3	4	10.53	True		chr19:41765824,chr19:41765879			Novel Isoform	Intra-Exon Gap	Unknown	N/A	434	0	0	0	0	0	0	0

PIK3CA: échantillon qualité moyenne mais avec exon 9 peu couvert: mutation retrouvée en low conf et forte en PCR...



- BM21000421: BM colorectal (bloc ancien = 3 ans)
- Qualité moyenne

Total Fragments	Fragments with Complete Adapter	Number of Reads After Trimming Adapters
4,664,864	4,545,677	3,538,998

Read Statistics

Type	Total Fragments (# / %)	Mapped (# / %)	Pass Alignment Filter (%)	On Target (%)
All Fragments	3,538,998 / 100.0	3,533,790 / 99.9	99.9	98.0
Unique Fragments	266,263 / 7.5	265,524 / 99.7	99.7	88.4

DNA/RNA Statistics

Type	DNA Reads (# / %)	RNA Reads (# / %)	Ambiguous Reads (# / %)
All Fragments	1,709,833 / 49.4	804,555 / 23.2	947,728 / 27.4
Molecular Bins	109,579 / 46.7	57,600 / 24.6	67,402 / 28.7
Average Molecular Bins per GSP2	299.40 ⓘ	157.38 ⓘ	184.16 ⓘ
Unique Start Sites	20,746 / 58.5	8,681 / 24.5	7,402 / 20.9
Average Unique Start Sites per GSP2	57.48 ⓘ	26.42 ⓘ	22.22 ⓘ
Average Unique Start Sites per GSP2 Control	52.62	56 ⓘ	30.50

QC Statistics

Avg. Unique DNA And Ambiguous Start Sites Per GSP2	Avg. Unique RNA Start Sites Per GSP2 Control
79.68	56.0 ✓

Mutation pik3ca bien séquencée



- Nombre de read total (1398= exon 9):

PIK3CA_chr3_178936993_32_n_GSP2

1398 / 0.596

146 / 0.411

PIK3CA_chr3_178952093_29_n_GSP2

510 / 0.217

109 / 0.307

- Mutation PIK3CA retrouvée avec profondeur = 13 mais avec seulement 6 reads portant la mutation!

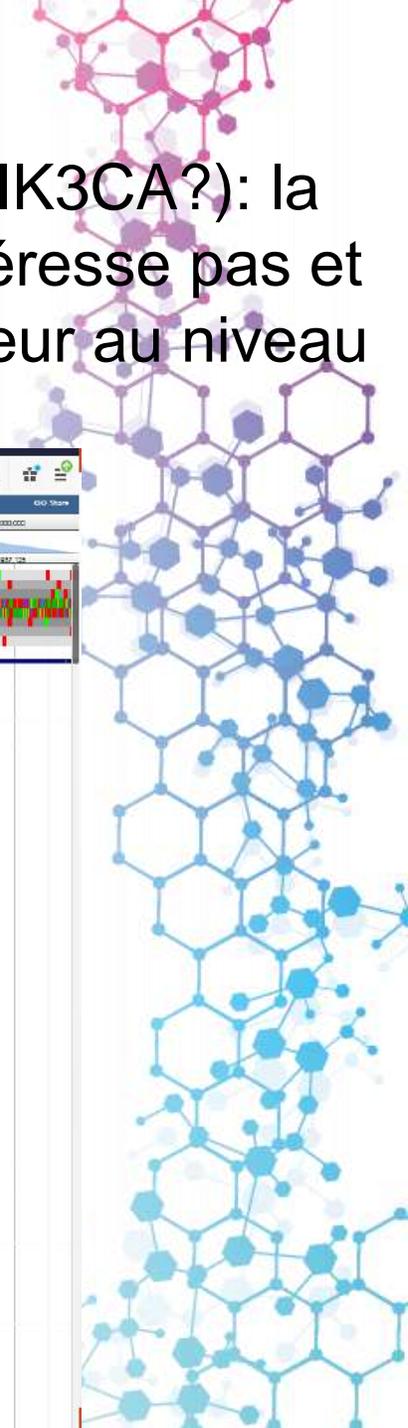
Run_CTL_185_160221 / BM21000421_S2_R1_001 -

RNA Variant - RNA Variant with Outlier - All Results - RNA variant ciblé - Low confidence variant ciblé - Low confidence Depth - Low confidence AF - New

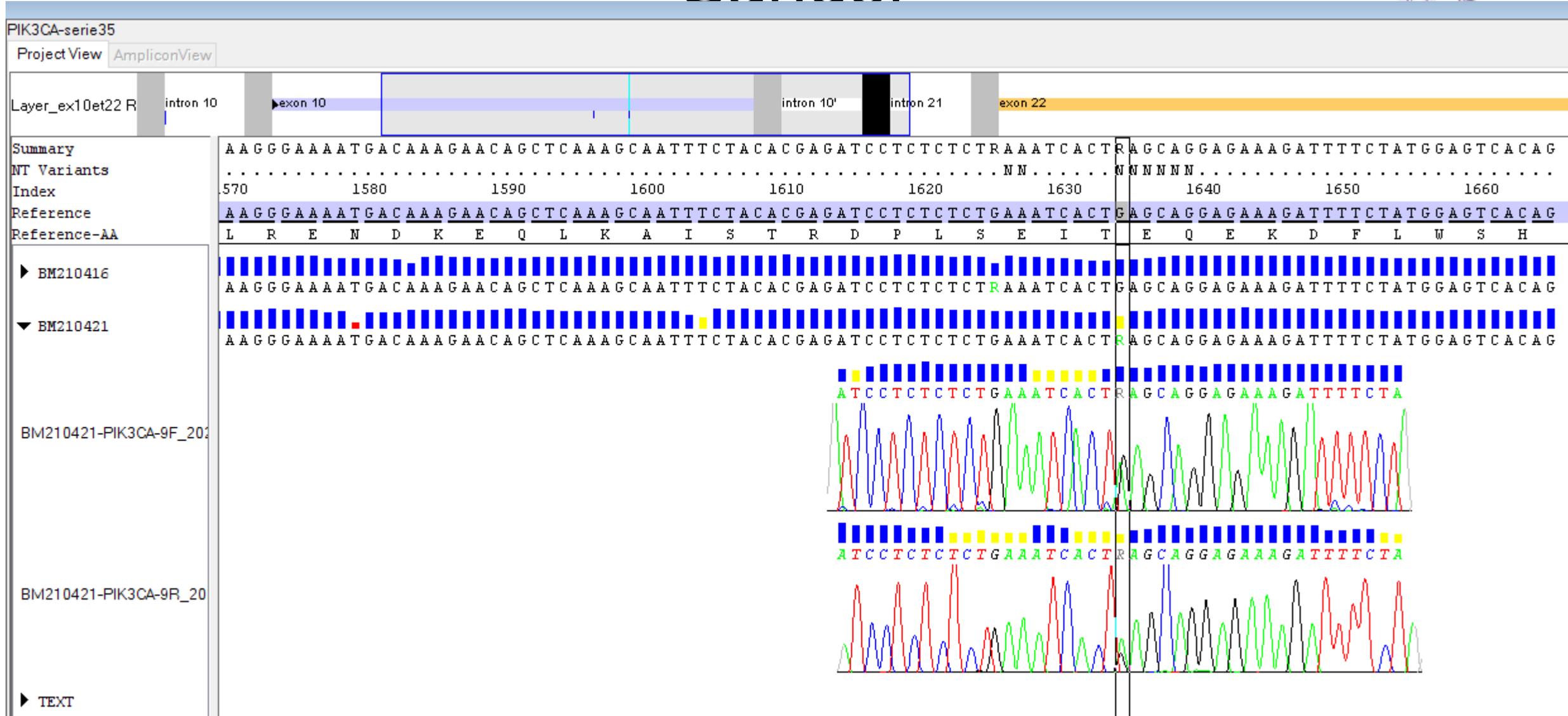
Actions	Report	Symbol	Trans	Exon	HGVSc	HGVSp	AF	Depth	AO	UAO	UDP	gnomAD AF	COSMICID	DBSNPID	Clinical Significance
	<input type="checkbox"/>	ALK	NM_004304.4	23/29	c.3604G>A	p.Gly1202Arg	0.0105	856	9	2	125		COSM144250		
	<input type="checkbox"/>	BRAF	NM_004333.4	15/18	c.1796C>T	p.Thr599Ile	0.0154	779	12	4	87		COSM472	rs121913375	Pathogenic,Pathogenic
	<input type="checkbox"/>	BRAF	NM_004333.4	15/18	c.1793C>T	p.Ala598Val	0.0116	778	9	4	88		COSM21549		
	<input type="checkbox"/>	EGFR	NM_005228.4	19/28	c.2243G>A	p.Arg748Lys	0.0195	461	9	2	91		COSM133198		
	<input type="checkbox"/>	EGFR	NM_005228.4	20/28	c.2326C>T	p.Arg776Cys	0.0164	1161	19	4	144		COSM6226		
	<input type="checkbox"/>	EGFR	NM_005228.4	20/28	c.2353A>G	p.Thr785Ala	0.0143	349	5	1	76		COSM53103		
	<input type="checkbox"/>	EGFR	NM_005228.4	20/28	c.2369C>T	p.Thr790Met	0.0152	462	7	3	84	0.00002843	COSM6240	rs121434569	Other
	<input type="checkbox"/>	EGFR	NM_005228.4	20/28	c.2392C>T	p.Leu798Phe	0.0125	562	7	5	93		COSM13191		
	<input type="checkbox"/>	KIT	NM_000222.2	11/21	c.1652C>T	p.Pro551Leu	0.0161	124	2	1	45		COSM33965		
	<input type="checkbox"/>	KIT	NM_000222.2	11/21	c.1681G>A	p.Glu561Lys	0.0351	114	4	2	42		COSM1264		
	<input type="checkbox"/>	KIT	NM_000222.2	11/21	c.1727T>C	p.Leu576Pro	0.0133	75	1	1	35		COSM1290		
	<input type="checkbox"/>	KIT	NM_000222.2	13/21	c.1901G>A	p.Arg634Gln	0.0291	103	3	1	30	0.000008129			
	<input type="checkbox"/>	KIT	NM_000222.2	17/21	c.2458G>A	p.Asp820Asn	0.0113	444	5	2	70		COSM17947		
	<input checked="" type="checkbox"/>	KRAS	NM_004985.4	2/5	c.34G>T	p.Gly12Cys	0.0354	1414	50	26	157	0	COSM516	rs121913530	Pathogenic
	<input checked="" type="checkbox"/>	PIK3CA	NM_006218.3	10/21	c.1633G>A	p.Glu545Lys	0.4615	13	6	2	4	0.000004085	COSM125370	rs104886003	Pathogenic
	<input type="checkbox"/>	PIK3CA	NM_006218.3	21/21	c.3142C>T	p.His1048Tyr	0.0101	497	5	1	84		COSM249875		
	<input type="checkbox"/>	RET	NM_020630.4	16/19	c.2734C>T	p.Arg912Trp	0.0116	173	2	1	43		COSM3415039		
	<input type="checkbox"/>	TP53	NM_000546.5	8/11	c.833C>T	p.Pro278Leu	0.0141	919	13	9	132		COSM3378341	rs876659802	Pathogenic



Problème design panel: GSP2 dans l'exon 11 (à cause du pseudogène PIK3CA?): la métrique de profondeur prend en compte le début de l'exon 11, qui ne nous intéresse pas et pas la zone d'analyse intéressante de l'exon 10, d'où des chutes de profondeur au niveau des mutations hotspots



Mutation bien retrouvée à environ 50% en Sanger



Mutation BRAF V600E à 6% en ddPCR

Non retenue en Archer (1 seul AO sur 47x => 2,1%)



Run_CTL_278_291122 / BM22004410_S2_R1_001-

RNA Variant - RNA Variant with Outlier - All Results - RNA variant ciblé - **Low confidence variant ciblé** - Low confidence Depth - Low confidence AF - Filtre général - Filtre ciblé - Poumon - Colon - Melanome - Endometre - Cholangiocarcinome - Uro - Estomac - Thyroïde - Histiocytose - Pancreas - New

Actions	Classification	Report	Symbol	Trans	Exon	HGV5c	HGV5p	AF	Depth	AO	UAO	UDP	TO	gnomAD AF	COSMICID	DBSNPID	Clinical Significance
		<input type="checkbox"/>	BRAF	NM_004333.4	15/18	c.1799T>A	p.Val600Glu	0.0213	47	1	1	34	411		COSM476	rs113488022	Pathogenic
		<input type="checkbox"/>	KRAS	NM_004985.4	2/5	c.66G>A	p.Gln22=	0.0139	72	1	1	28	371		COSM1360867		
		<input type="checkbox"/>	MET	NM_000245.3	14/21	c.2932C>T	p.Pro978Ser	0.1000	10	1	1	9	1066		COSM1666979		
		<input type="checkbox"/>	RET	NM_020630.4	15/19	c.2656C>T	p.Arg886Trp	0.0286	35	1	1	21	269	0.000004069		rs146838520	Uncertain significance
		<input type="checkbox"/>	TP53	NM_000546.5	5/11	c.526T>C	p.Cys176Arg	0.0118	765	9	9	139	2659		COSM1172483		

Showing 1 to 5 of 5 entries



Alignement des reads chimériques: attention !

- **Pas toujours simple:**
 - Surtout si séquences homologues au niveau de la jonction 5' - 3'
 - Surtout si séquence « intermédiaire » : type sandwich

ATP1B1-NRG1 fusion

chr1:169080719,chr8:31496931 => For Archer analysis

chr1: 169080736, chr8: 32453346 => For me (more likely)



Vision de résultat d'un WTS Auragen

- Fastidieux ++++ (Read-through, GOF vs LOF)
- Noyé sous la data ++++
- Trouver des règles d'interprétation complexe ++++

Gene1 Gene2	TranscriptId1 TranscriptId2	Exon1 Exon2	Breakpoint1 Breakpoint2	Type Distance	WhiteList PinkList	Mitelman Cosmic	BlackList Readthrough	Reciprocal	mean Split Span	Score	Tools	ReadingFrame	Split	Span	Strand1	Strand2	Site1	Site2
<input type="checkbox"/> RNF38 ZBTB5	ENST00000259605.11 ENST00000307750.5	e3 e2	chr9:36375934 chr9:37442555	intra 1086821					103 148	3	Arriba StarFusion FusionCatcher	in-frame	140 142 27	15 15 408	- - -	- - -	CDS/splice-site CDS/splice-site CDS(truncated)	5'UTR/splice-site UTR
<input type="checkbox"/> DLX6-AS1 SEM1	ENST00000430027.3 ENST00000240506.3	e1 e2	chr7:97013925 chr7:96694891	intra 319034			readthrough	reciprocal	21.87 24.33	3	Arriba StarFusion FusionCatcher		23 23 19	0 0 73	- - -	- - -	exon/splice-site exon(splice-site) exonic(no-known-CDS)	CDS/splice-site CDS(truncated)
<input type="checkbox"/> GRHRP ACO1	ENST00000310158.11 ENST00000309951.8	e8 e2	chr9:37432138 chr9:32405485	intra 5026653					3.67 4	3	Arriba StarFusion FusionCatcher	out-of-frame	3 3 5	0 0 12	- + +	- + +	CDS/splice-site CDS/splice-site CDS(truncated)	5'UTR/splice-site UTR
<input type="checkbox"/> AC004774.2 SEM1	ENST00000614213.1 ENST00000248566.3	e1 e2	chr7:97013925 chr7:96694891	intra 319034			readthrough		23 0	2	Arriba StarFusion		23 23	0 0	- -	- -	exon/splice-site	CDS/splice-site
<input type="checkbox"/> LINC01812 AC007422.1			chr2:87623874 chr2:87684077	intra 139797			readthrough		16 21	2	StarFusion FusionCatcher		24 12	7 35	- -	- -	exonic(no-known-CDS)	exonic(no-known-CDS)
<input type="checkbox"/> AL039530.1 AL091520.1			chr1:68820003 chr1:69013503	intra 131500			readthrough		7.5 11	2	StarFusion FusionCatcher		6 9	0 22	- +	- +	exonic(no-known-CDS)	exonic(no-known-CDS)
<input type="checkbox"/> ADAMTS8 CENPK	ENST00000301055.8 ENST00000242072.7	e14 e1	chr5:65280600 chr5:6554946	intra 294346					6 0	2	Arriba StarFusion	out-of-frame	5 7	0 0	- -	- -	CDS/splice-site	5'UTR/splice-site
<input type="checkbox"/> NLGN4X AC116995.1			chrX:5844434 chrX:5719872	intra 124562			readthrough		5.5 13	2	StarFusion FusionCatcher		5 6	2 24	- -	- -	UTR	exonic(no-known-CDS)
<input type="checkbox"/> CASC17 AC007423.1	ENST00000609074.1 ENST00000609009.1	e2 e1	chr17:71185996 chr17:70779229	intra 406367					9 0	2	Arriba StarFusion		7 3	0 0	- -	- -	exon/splice-site	exon/splice-site
<input type="checkbox"/> EEF1AK2WMT DNM3			chr17:171814023 chr17:171821748	intra 107725		mitelman	readthrough		4.5 7.5	2	StarFusion FusionCatcher		4 5	1 14	- +	- +	UTR	CDS(truncated)
<input type="checkbox"/> AC062021.1 AC013265.1	ENST00000429008.1 ENST00000661894.1	e3 e3	chr2:139368494 chr2:13939254	intra 28230					4.5 2	2	Arriba StarFusion		5 4	2 2	- +	- +	exon/splice-site	exon/splice-site
<input type="checkbox"/> LINC00032 EQTN			chr9:27277551 chr9:27286362	intra 8811					4 0	2	Arriba StarFusion		4 4	0 0	- -	- -	intron	CDS/splice-site
<input type="checkbox"/> AL513550.1 TSTD3			chr8:99425880 chr8:99520064	intra 100186			readthrough		3.5 7.5	2	StarFusion FusionCatcher		5 4	1 14	- +	- +	exonic(no-known-CDS)	UTR
<input type="checkbox"/> LINC02699			chr11:115659724	intra					3	2	StarFusion		2	0	- +	- +		



Paris, 10 décembre 2022



Analyse ciblée des fusions par RNA seq dans le cancer pulmonaire non à petites cellules

Expérience d'un laboratoire (LPCE, Nice)

Paul Hofman

Laboratoire de Pathologie Clinique et Expérimentale, Université
Côte d'Azur, Nice (www.oncoage.org)

Liens d'intérêt

Advisory Boards: Janssen, BMS, AstraZeneca, Amgen, Abbvie, Roche, Pfizer, Lilly, Biocartis, Guardant Health, Novartis

Honoraria: Janssen, BMS, AstraZeneca, Amgen Abbvie, Guardant Health, Pierre Fabre, Illumina, Thermo Fisher Scientific, Lilly, Biocartis, Roche, Pfizer, Bayer, MSD, Novartis

Financial research support: BMS, Thermo Fisher Scientific, Amgen, Roche, Biocartis, AstraZeneca

Outline



The growing set of targetable biomarkers in NSCLC



The sample quality is still a major challenge



RNA sequencing as a key tool in today's NSCLC care



Examples in routine clinical practice



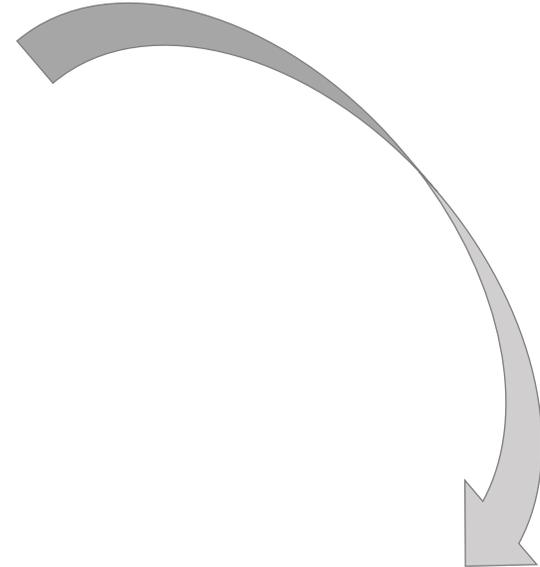
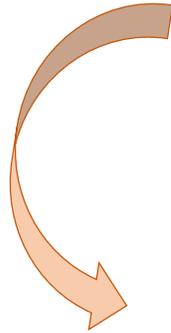
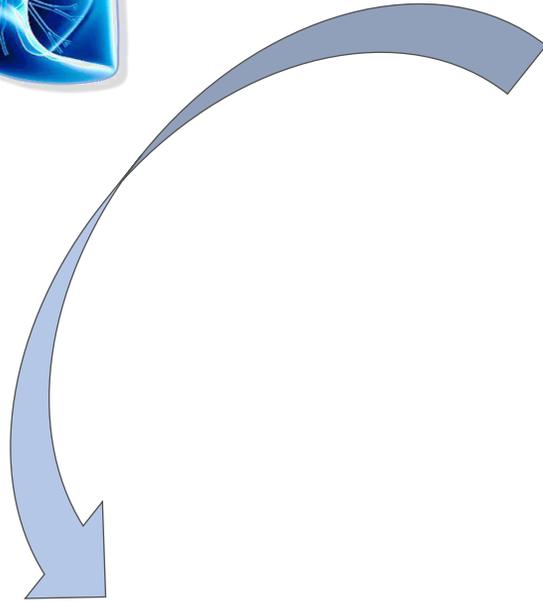


**Molecular
biomarkers**

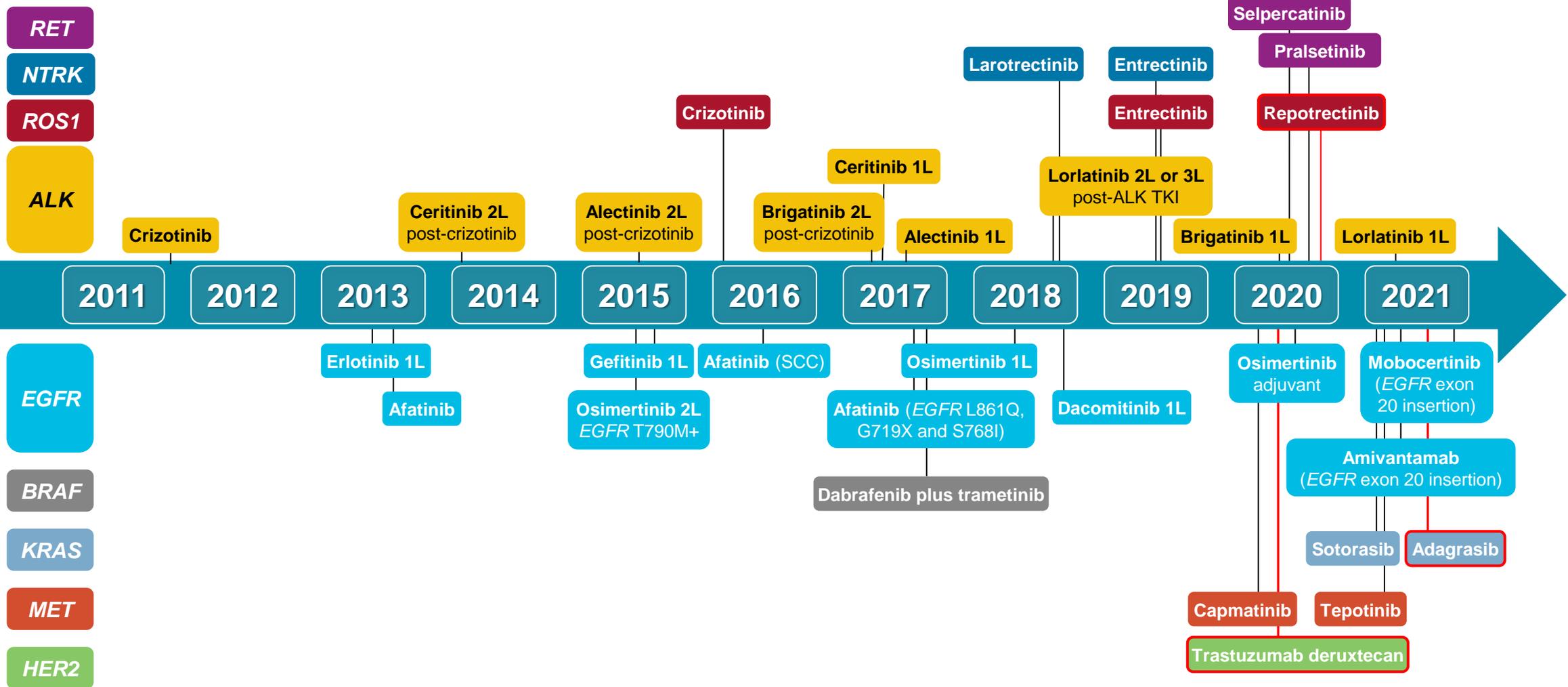
Diagnosis

Prognosis

Predictive



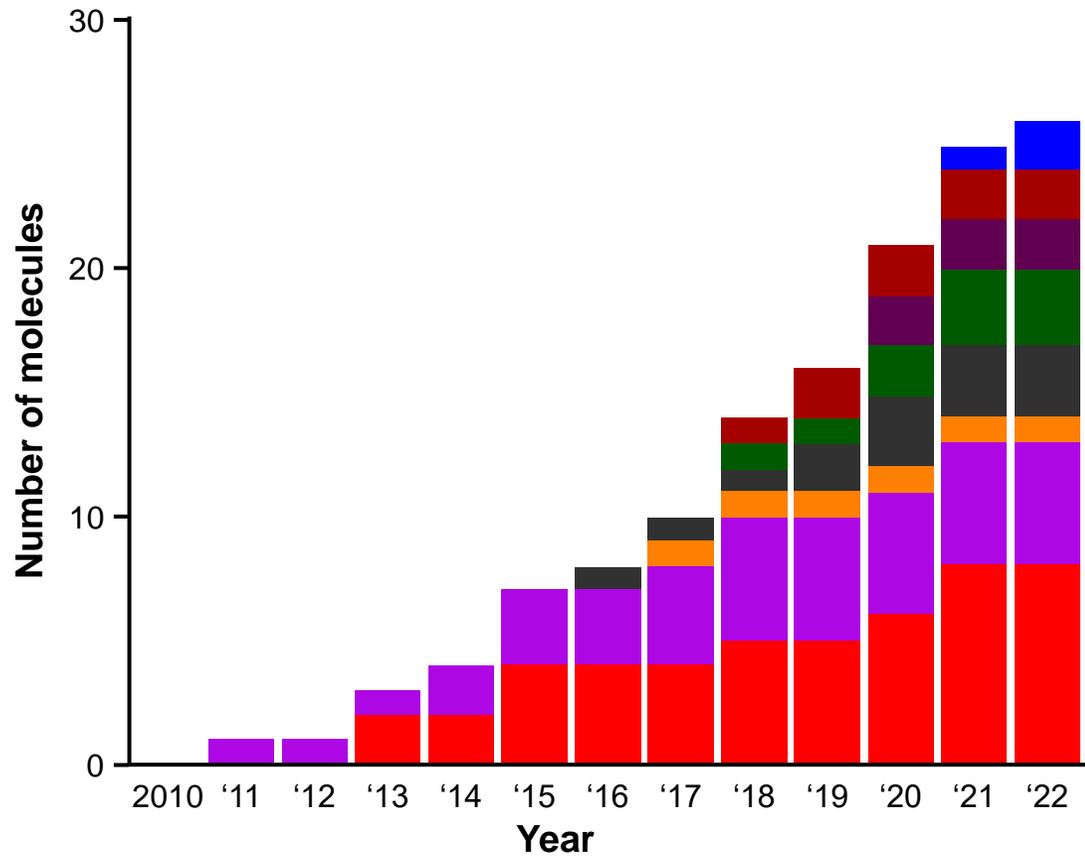
Timeline of FDA-approved targeted therapies for oncogene-driven NSCLC



Currently available targeted therapies in NSCLC



FDA-approved targeted therapies



Target	Molecule name (year of FDA approval)
KRAS	Sotorasib (2020), adagrasib* (2021)
EGFR	Erlotinib, afatinib (2013), gefitinib; osimertinib (2015), dacomitinib (2018), erlotinib + ramucirumab (2020), amivantamab, mobocertinib* (2021)
ALK	Crizotinib (2011), ceritinib (2014), alectinib (2015), brigatinib (2017), lorlatinib (2018)
BRAF	Debrafenib + trametinib (2017)
ROS1	Crizotinib (2016), entrectinib (2019), repotrectinib* (2020)
MET	Crizotinib (2018), capmatinib (2020), tepotinib (2021)
RET	Selpercatinib, pralsetinib (2020)
NTRK	Larotrectinib (2018), entrectinib (2019)

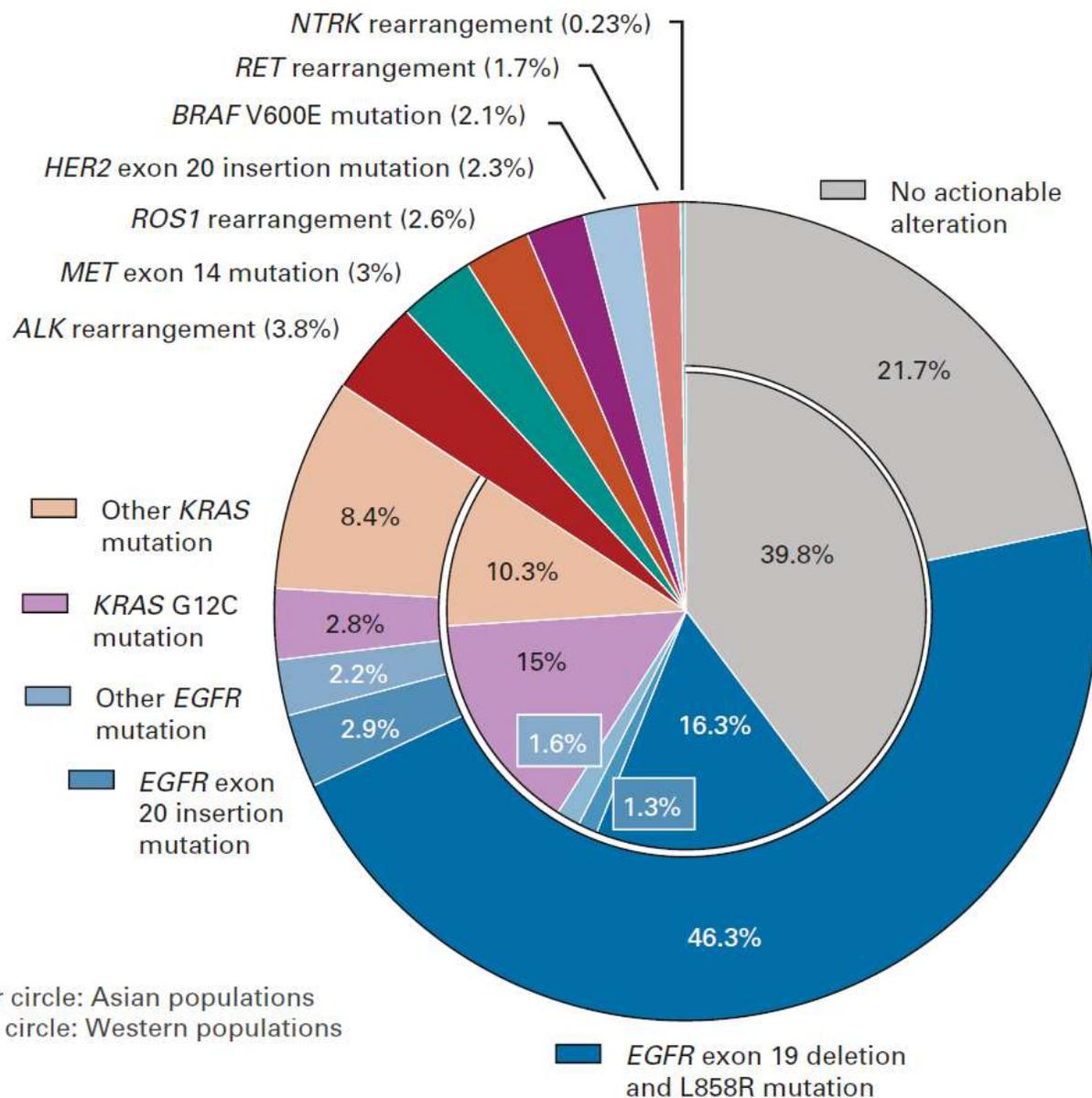
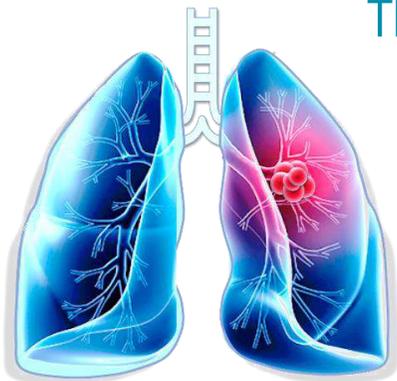


Genomic alterations level I/II/III according to « ESCAT* » in advanced non-squamous NSCLC

(*ESMO Scale of Clinical Actionability for Molecular Targets)

Gene	Alteration	Prevalence	ESCAT
EGFR	Common mutations (Del19, L858R)	15% (50–60% Asian)	IA
	Acquired T790M ex20	60% of EGFR mutant	IA
	Uncommon EGFR mutations (G719X in exon 18, L861Q in exon 21, S768I in exon 20)	NSCLC, 10%	IB
	Exon20ins	2%	IIB
ALK	Fusions (mutations as mechanism of resistance)	5%	IA
MET	Mutations ex14 skipping	3%	IB
	Focal amplifications (acquired resistance on EGFR TKI in EGFR-mutant tumours)	3%	IIB
BRAF ^{V600E}	Mutations	2%	IB
ROS1	Fusions (mutations as mechanism of resistance)	1–2%	IB
NTRK	Fusions	0.23–3%	IC
RET	Fusions	1–2%	IC
KRAS ^{G12C}	Mutations	12%	IIB
ERBB2	Hotspot mutations	2–5%	IIB
	Amplifications	2–5%	IIB
BRCA 1/2	Mutations	1.2%	IIIA
PIK3CA	Hotspot mutations	1.2–7%	IIIA
NRG1	Fusions	1.7%	IIIB

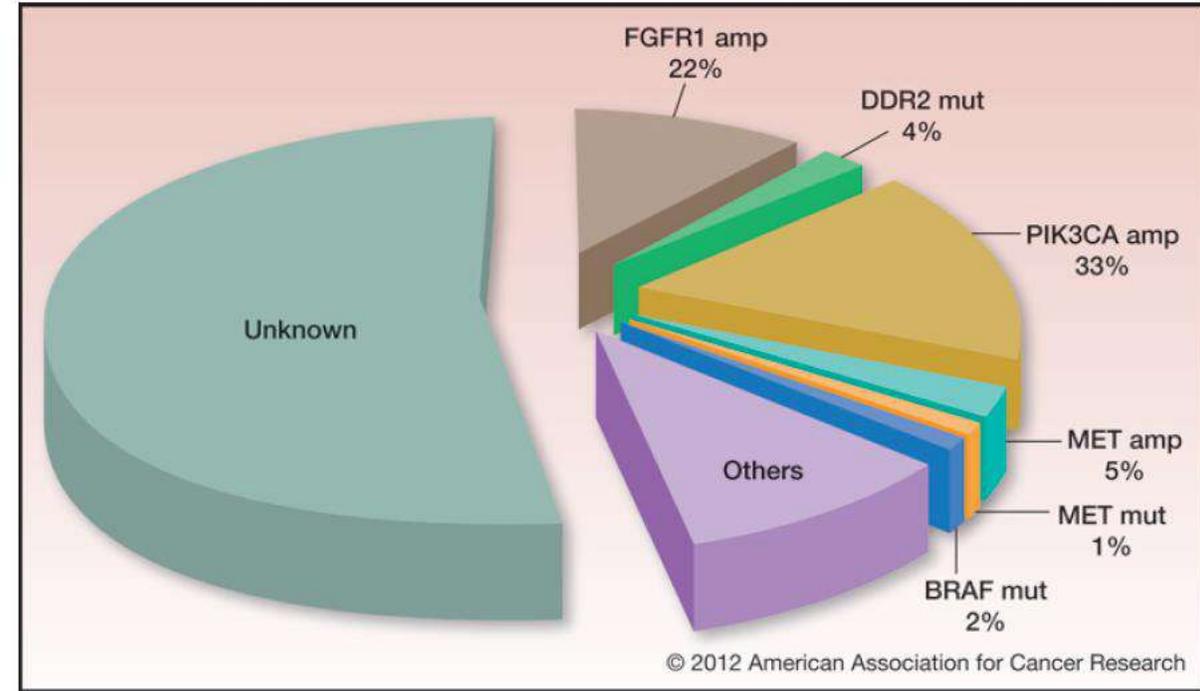
The landscape of actionable genomic alterations in non squamous non-small cell lung carcinoma



Any actionable genomic alterations in squamous non-small cell lung carcinoma ?

Table 1. Frequency of selected genetic abnormalities in NSCLC

Genetic abnormality (references)	Gene location	SCC	Adenocarcinoma
TP53 (36, 71)	17p13.1	51%	36%
PI3KCA amplification (51, 52, 54)	3q26.3	33%	6%
SOX2 amplification (23, 24)	3q26.3-q27	23%	Very rare
FGFR1 amplification (24, 25)	8p12	22%	1%
PTEN mutation (36, 61)	10q23.3	10%	2%
MET amplification (34, 35)	7q31.1	3%–21%	3%–21%
PTEN loss (59, 62)	10q23.3	8%–20%	8%–20%
KRAS mutation (36)	12p12.1	6%	21%
Variant III mutation (36)	7p12	5%	Very rare
LKB1 mutation (70)	19p13.3	5%	23%
DDR2 mutation (30)	1q23.3	4%	1%
HER2 overexpression (39–42)	17q11.2-q12, 17q21	3%–5%	5%–9%
PI3KCA mutation (50–52)	3q26.3	3%	3%
BRAF mutation (36, 64)	7p34	2%	1%–3%
EGFR mutation (36)	7p12	<5%	10%–15%
AKT1 mutation (56)	14q32.32	1%	Very rare
MET mutation (36)	7q31.1	1%	2%
HER2 mutation (46, 48, 49)	17q11.2-q12, 17q21	1%	2%
EML4-ALK fusion (66, 67)	2p21, 2p23	1%	2%–7%



Review

Clinical
Cancer
Research

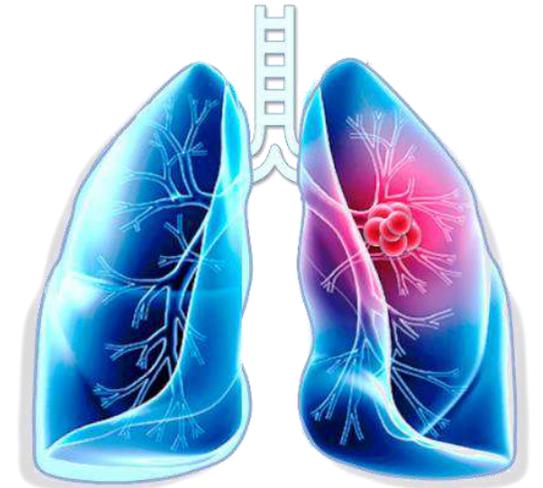
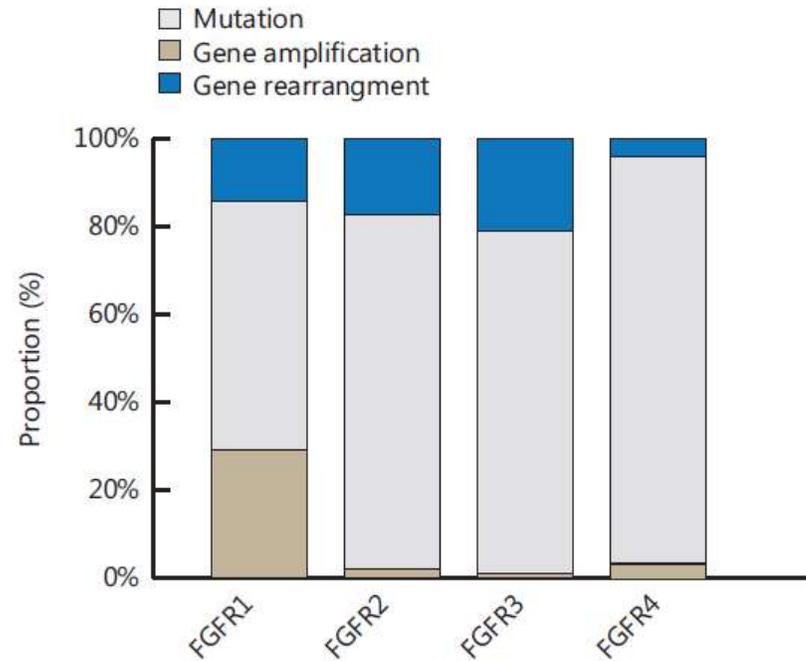
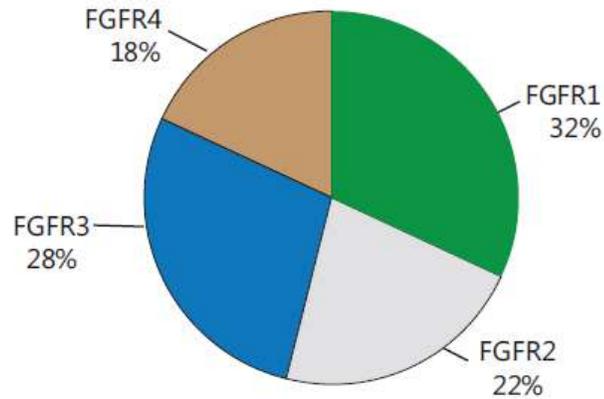
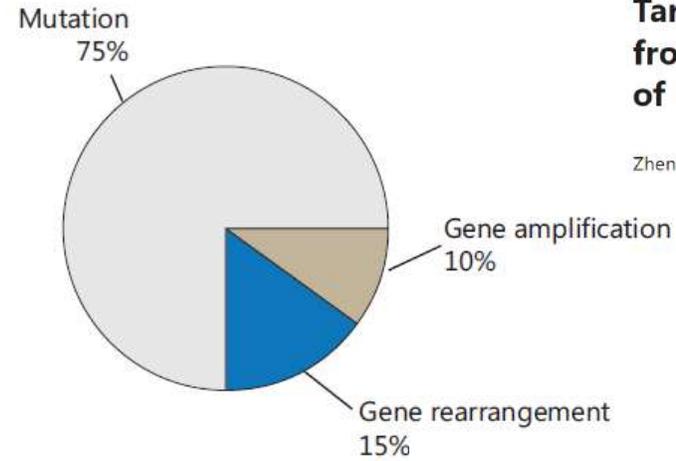
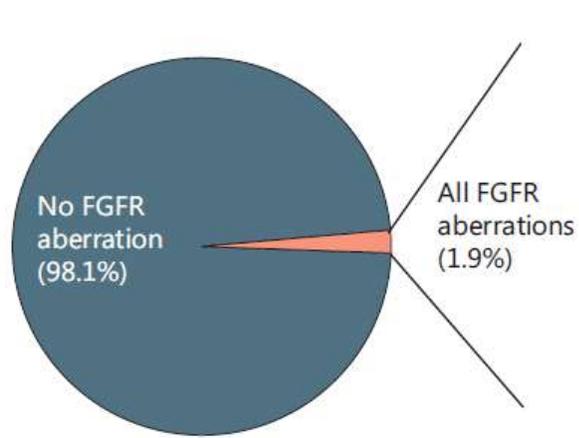
Squamous Cell Carcinoma of the Lung: Molecular Subtypes and Therapeutic Opportunities

Pablo Perez-Moreno^{1,2}, Elisabeth Brambilla^{3,4}, Roman Thomas⁵⁻⁹, and Jean-Charles Soria^{1,2}

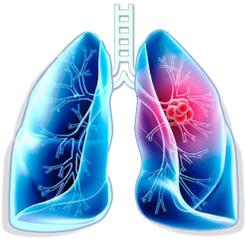
ORIGINAL ARTICLE

Targeting FGFR in non-small cell lung cancer: implications from the landscape of clinically actionable aberrations of FGFR kinases

Zhen Zhou^{1*}, Zichuan Liu^{2*}, Qiuxiang Ou³, Xue Wu³, Xiaonan Wang⁴, Yang Shao^{3,5}, Hongyan Liu^{6*}, Yu Yang^{7*}



Fusions of interest in NSCLC



SCENARIOS

	A: Current Practice	B: In development	C: Future Horizons
EGFR 18,19,21	✓	✓	✓
BRAF	✓	✓	✓
PD-L1	✓	✓	✓
→ ALK	✓	✓	✓
→ ROS-1	✓	✓	✓
→ PANTRK	✓	✓	✓
→ RET	✓	✓	✓
MET exon 14 skip	✓	✓	✓
MET amplification	✓	✓	✓
EGFR ex 20		✓	✓
KRAS		✓	✓
HER2		✓	✓
→ NRG1			✓
HRAS			✓
NRAS			✓
AKT			✓
TMB/CGP/HRD			?
STK11			✓
KEAP1			✓
TP53			✓
JAK2/3			✓
BRCA 1,2			✓
→ FGFR			✓



Others ...!

Outline



The growing set of targetable biomarkers in NSCLC



The sample quality is still a major challenge



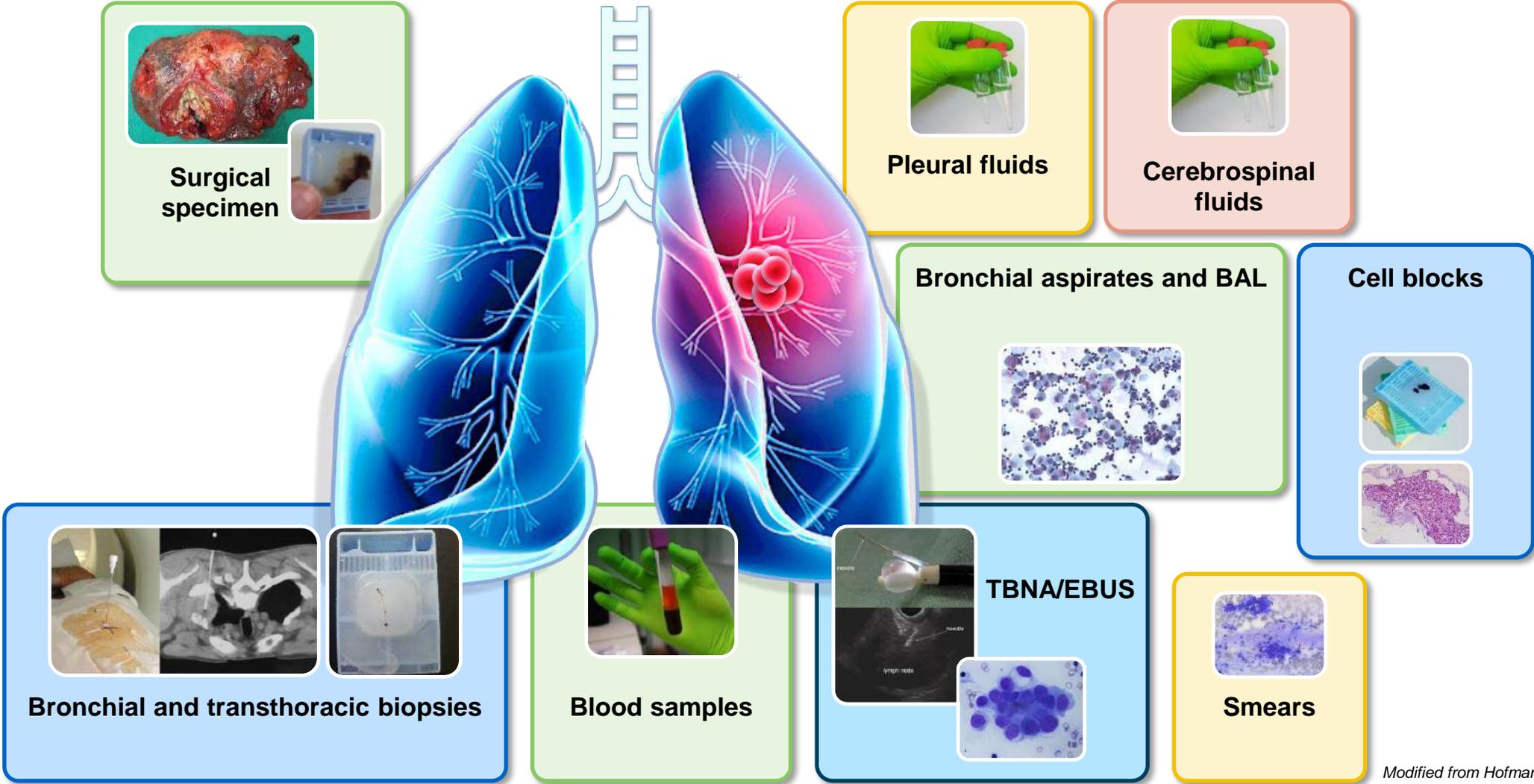
RNA sequencing as a key tool in today's NSCLC care



Examples in routine clinical practice



Bioresources for predictive biomarker assessment in advanced non-squamous NSCLC at diagnosis and/or at progression^{1,2}

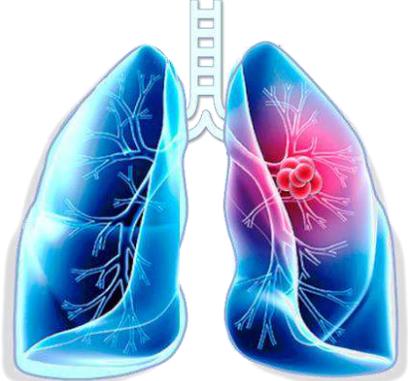


Modified from Hofman P, 2021.

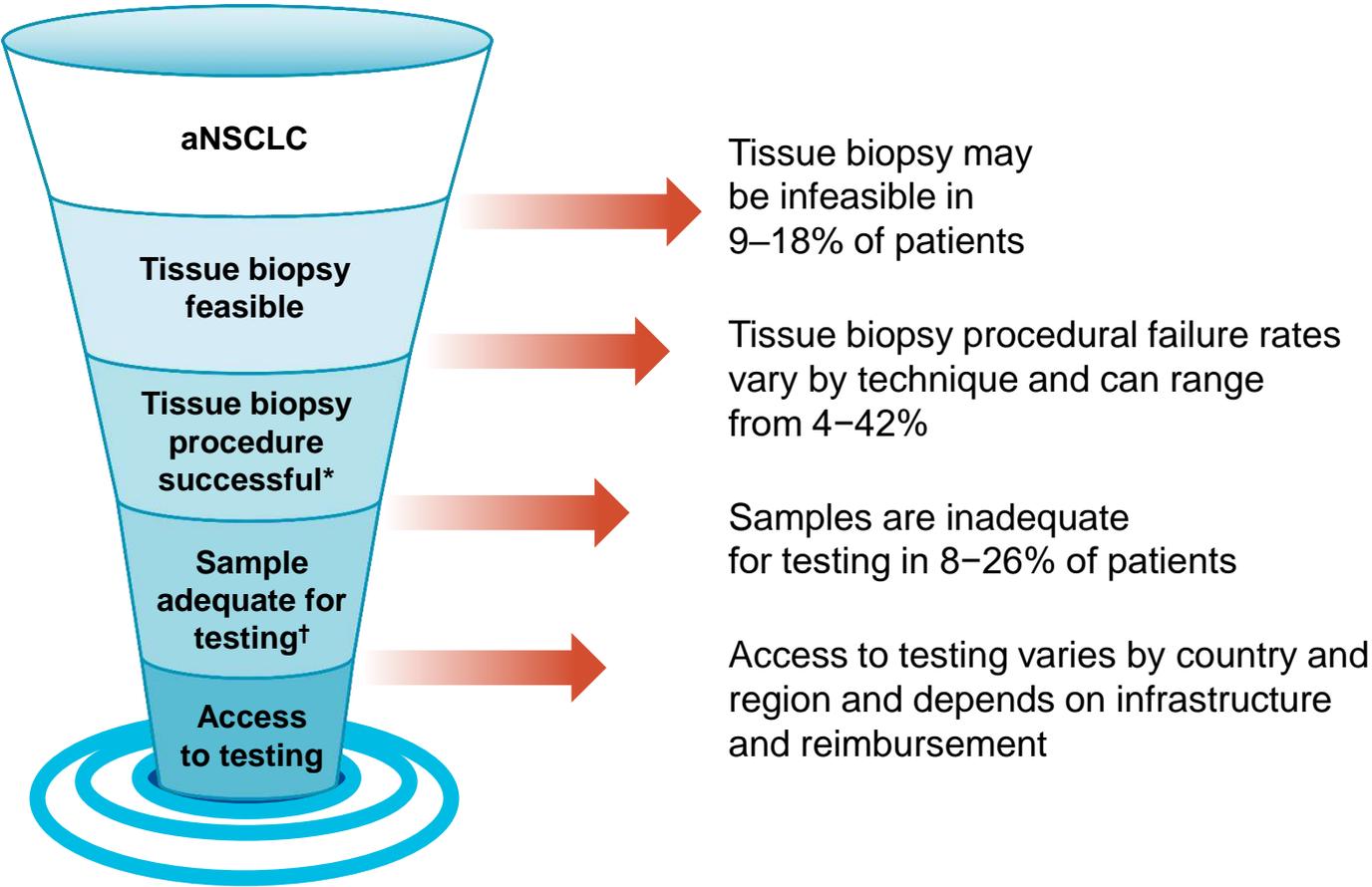
1. Hofman P. *Cells*. 2021;10:2157.

BAL, bronchoalveolar lavage; TBNA/EBUS, endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration.

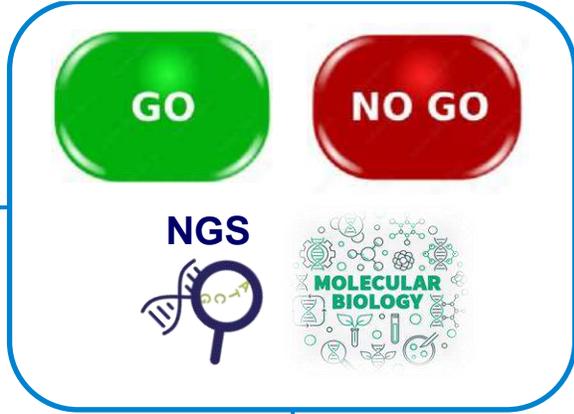
Reasons why patients miss out on biomarker testing from tissue biopsy



The overall tissue biopsy failure rate may be up to 45%



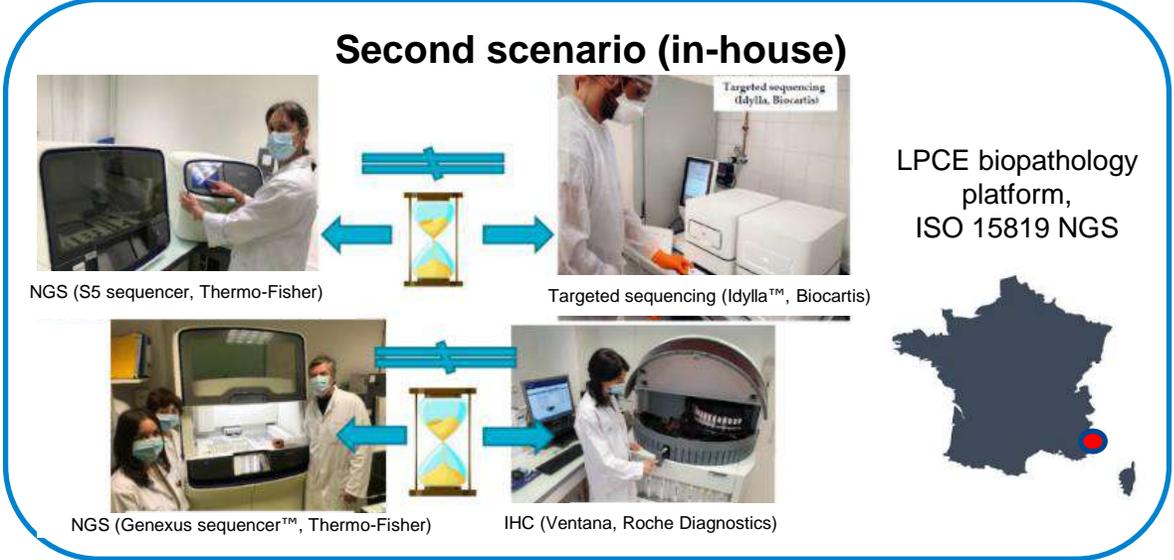
THE CLINICAL PATHOLOGIST'S RESPONSIBILITY: OVERCOMING PITFALLS ON THE JOURNEY TO NGS



One major challenge:
Quality and quantity of RNA in lung pathology

Diagnosis ?
Percentage of tumor cells
Sample size
Necrotic area

Beware 
True vs false negative
molecular biology results
↓
Risk of missing an effective
targeted therapy



Outline



The growing set of targetable biomarkers in NSCLC



The sample quality is still a major challenge



RNA sequencing as a key tool in today's NSCLC care



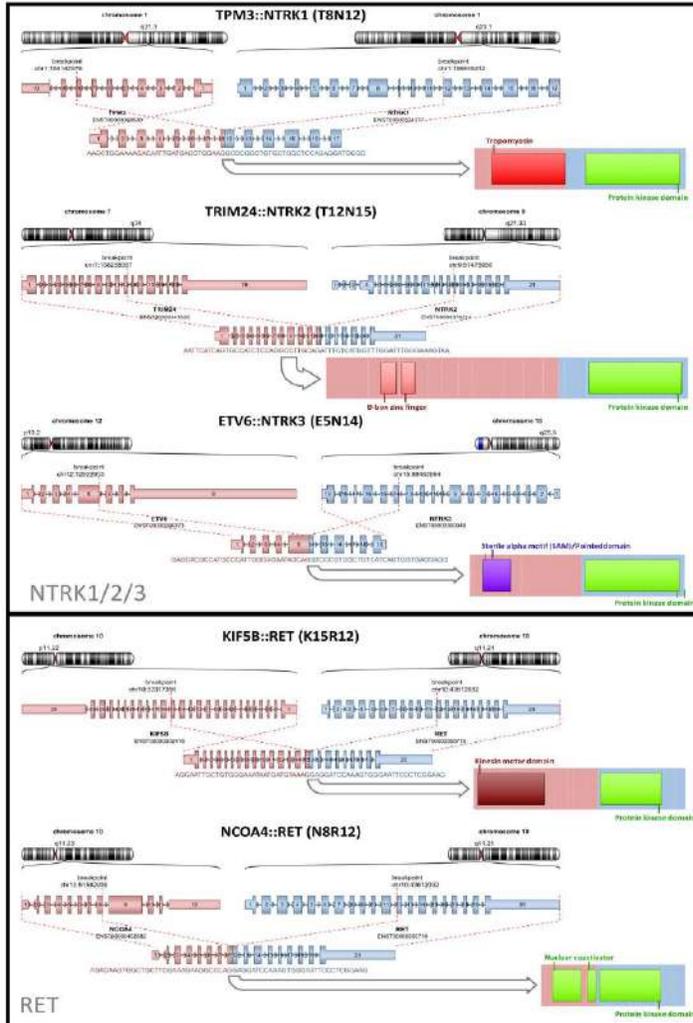
Examples in routine clinical practice



Fusion-positive non-small cell lung carcinoma: Biological principles, clinical practice, and diagnostic implications

Daniel Kazdal^{1,2,3} | Véronique Hofman^{4,5,6} | Petros Christopoulos^{2,3,7} |
Marius Ilić^{4,5,6} | Albrecht Stenzinger^{1,3,8} | Paul Hofman^{4,5,6}

Genes Chromosomes Cancer. 2022;1-17.



Fusions visualized using Arriba

TABLE 1 Current challenges concerning assessment of gene fusions in non-small cell lung carcinoma

- To obtain a sufficient quantity and quality of extracted RNA/DNA from formalin fixed tissue biopsies, cytological samples, or liquid biopsies
- To select the best approach among a multitude of molecular biology methods (IHC, FISH, RT-PCR, DNA NGS, RNA NGS, in situ multiplex assays such as nanostring technology)
- To identify all fusion partners
- To integrate divers genomic alterations associated with rearrangements
- To provide immune treatment at baseline
- To deal with possible tumor heterogeneity when analyzing fusions (according to the size of the sample)
- To assess gene fusions in non-adenocarcinoma lung carcinoma
- To handle liquid biopsies at baseline and at progression in daily practice
- To select an optimal gene panel (for rearrangements, mutations, and amplifications assessment)
- To master the turnaround time required to obtain all molecular biology results
- To integrate the costs and the reimbursement according to the panel used
- To obtain accreditation according to the ISO 15189 norm for gene fusion assessment
- To deal with the next IVDR in Europe
- To be able to look for mutations of resistance at progression
- To detect the resistance mechanisms

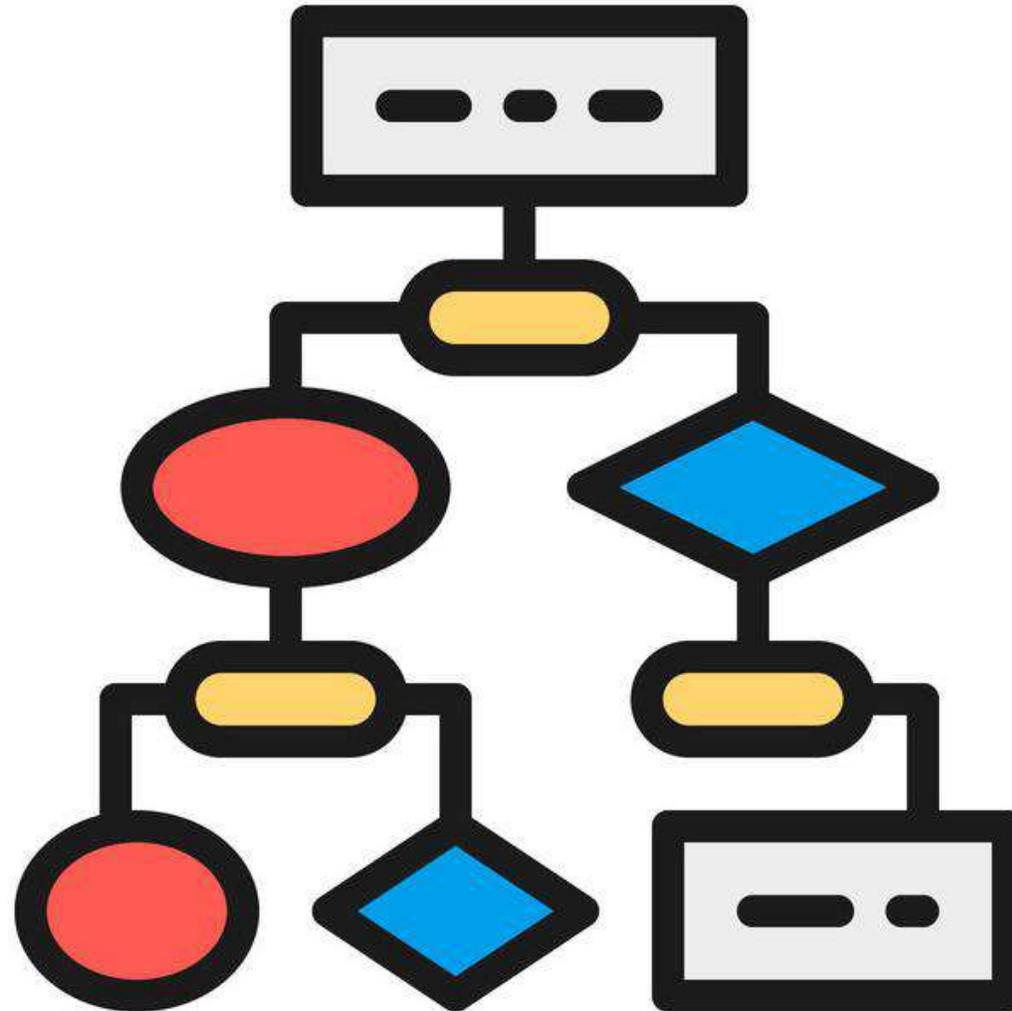
RNA Seq en pathologie thoracique

Est ce qu'un algorithme est envisageable?

LPCE

99% OPA RNA SEQ

1% FoundationOne HEME/other platform



Ultra-fast gene fusion assays (UFGFA)

OPA panel on **GENEXUS** System
(ThermoFisher)

Fully integrated sequencing device assessing
50 genes alterations from both DNA and
RNA, including mutations and gene fusions in
ALK, ROS1, RET, MET, NTRK1/2/3

+ ***5'-3' imbalance analysis***



IDYLLA Platform (Biocartis)

Fully automated cartridge based qPCR
system assessing gene fusions in ***ALK,***
ROS1, RET, MET Δ ex14 and NTRK1/2/3

+ ***5'-3' imbalance analysis***



Gene rearrangements detected by Idylla™ GeneFusion Assay

ALK fusions

EML4-ALK : EML4 exon 2; ALK exon 20
EML4 exon 6a; ALK exon 20
EML4 exon 6b; ALK exon 20
EML4 exon 13; ALK exon 20
EML4 exon 15; ALK exon 20
EML4 exon 17; ALK exon 20
EML4 exon 18; ALK exon 20
EML4 exon 20; ALK exon 20

KIF5B-ALK : KIF5B exon 15; ALK exon 20
KIF5B exon 17; ALK exon 20
KIF5B exon 24; ALK exon 20

HIP1-ALK : HIP1 exon 28; ALK exon 20
HIP1 exon 30; ALK exon 20

KLC1-ALK : KLC1 exon 9; ALK exon 20

TPR-ALK : TPR exon 15; ALK exon 20

TFG-ALK : TFG exon 4; ALK exon 20
TFG exon 6; ALK exon 20

RET fusions

KIF5B-RET : KIF5B exon 15; RET exon 11
KIF5B exon 15; RET exon 12
KIF5B exon 16; RET exon 12
KIF5B exon 22; RET exon 12
KIF5B exon 23; RET exon 12
KIF5B exon 24; RET exon 11

CCDC6-RET : CCDC6 exon 1; RET exon 12

MET exon 14 skipping

MET-MET : MET exon 13; MET exon 15

ROS1 fusions

CD74-ROS1 : CD74 exon 6; ROS1 exon 32
CD74 exon 6; ROS1 exon 34

SDC4-ROS1 : SDC4 exon 2; ROS1 exon 32
SDC4 exon 4; ROS1 exon 32
SDC4 exon 4; ROS1 exon 34

SLC34A2-ROS1 : SLC34A2 exon 4; ROS1 exon 32
SLC34A2 exon 4; ROS1 exon 34
SLC34A2 exon 13; ROS1 exon 32

EZR-ROS1 : EZR exon 10; ROS1 exon 34

TPM3-ROS1 : TPM3 exon 8; ROS1 exon 35

GOPC-ROS1 : GOPC exon 4; ROS1 exon 36
GOPC exon 8; ROS1 exon 35

LRIG3-ROS1 : LRIG3 exon 16; ROS1 exon 35

Gene rearrangements detected by the OPA RNA Assay

981 fusions détectées

Inter-genetic fusions		Intra-genetic fusions
ALK	NTRK2	AR
BRAF	NTRK3	EGFR
ESR1	NUTM1	MET
FGFR1	RET	
FGFR2	ROS1	
FGFR3	RSPO2	
MET	RSPO3	
NRG1		
NTRK1		

(imbalances pour les gènes *ALK*, *RET*, *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *FGFR1*, *FGFR2* et *FGFR3*)

<i>ABI1</i>	<i>ABL1</i>	<i>ABL2</i>	<i>ACSL6</i>	<i>AFF1</i>	<i>AFF4</i>	<i>ALK</i>	<i>ARHGAP26 (GRAF)</i>		
<i>ARHGEF12</i>	<i>ARID1A</i>	<i>ARNT</i>	<i>ASXL1</i>	<i>ATF1</i>	<i>ATG5</i>	<i>ATIC</i>	<i>BCL10</i>	<i>BCL11A</i>	
<i>BCL11B</i>	<i>BCL2</i>	<i>BCL3</i>	<i>BCL6</i>	<i>BCL7A</i>	<i>BCL9</i>	<i>BCOR</i>	<i>BCR</i>	<i>BIRC3</i>	
<i>BRAF</i>	<i>BTG1</i>	<i>CAMTA1</i>	<i>CARS</i>	<i>CBFA2T3</i>	<i>CBFB</i>	<i>CBL</i>	<i>CCND1</i>	<i>CCND2</i>	
<i>CCND3</i>	<i>CD274 (PD-L1)</i>	<i>CDK6</i>	<i>CDX2</i>	<i>CHIC2</i>	<i>CHN1</i>	<i>CIC</i>	<i>CIITA</i>	<i>CLP1</i>	
<i>CLTC</i>	<i>CLTCL1</i>	<i>CNTRL (CEP110)</i>	<i>COL1A1</i>	<i>CREB3L1</i>	<i>CREB3L2</i>	<i>CREBBP</i>	<i>CRLF2</i>	<i>CSF1</i>	
<i>CTNNB1</i>	<i>DDIT3</i>	<i>DDX10</i>	<i>DDX6</i>	<i>DEK</i>	<i>DUSP22</i>	<i>EGFR</i>	<i>EIF4A2</i>	<i>ELF4</i>	
<i>ELL</i>	<i>ELN</i>	<i>EML4</i>	<i>EP300</i>	<i>EPOR</i>	<i>EPS15</i>	<i>ERBB2</i>	<i>ERG</i>	<i>ETS1</i>	
<i>ETV1</i>	<i>ETV4</i>	<i>ETV5</i>	<i>ETV6</i>	<i>EWSR1</i>	<i>FCGR2B</i>	<i>FCRL4</i>	<i>FEV</i>	<i>FGFR1</i>	
<i>FGFR1OP</i>	<i>FGFR2</i>	<i>FGFR3</i>	<i>FLI1</i>	<i>FNBP1</i>	<i>FOXO1</i>	<i>FOXO3</i>	<i>FOXO4</i>	<i>FOXP1</i>	
<i>FSTL3</i>	<i>FUS</i>	<i>GAS7</i>	<i>GLI1</i>	<i>GMPS</i>	<i>GPHN</i>	<i>HERPUD1</i>	<i>HEY1</i>	<i>HIP1</i>	
<i>HIST1H4I</i>	<i>HLF</i>	<i>HMGA1</i>	<i>HMGA2</i>	<i>HOXA11</i>	<i>HOXA13</i>	<i>HOXA3</i>	<i>HOXA9</i>	<i>HOXC11</i>	
<i>HOXC13</i>	<i>HOXD11</i>	<i>HOXD13</i>	<i>HSP90AA1</i>	<i>HSP90AB1</i>	<i>IGH</i>	<i>IGK</i>	<i>IGL</i>	<i>IKZF1</i>	
<i>IL21R</i>	<i>IL3</i>	<i>IRF4</i>	<i>ITK</i>	<i>JAK1</i>	<i>JAK2</i>	<i>JAK3</i>	<i>JAZF1</i>	<i>KAT6A (MYST3)</i>	
<i>KDSR</i>	<i>KIF5B</i>	<i>KMT2A (MLL)</i>	<i>LASP1</i>	<i>LCP1</i>	<i>LMO1</i>	<i>LMO2</i>	<i>LPP</i>	<i>LYL1</i>	
<i>MAF</i>	<i>MAFB</i>	<i>MALT1</i>	<i>MDS2</i>	<i>MECOM</i>	<i>MKL1</i>	<i>MLF1</i>	<i>MLLT1 (ENL)</i>	<i>MLLT10 (AF10)</i>	
<i>MLLT3</i>	<i>MLLT4 (AF6)</i>	<i>MLLT6</i>	<i>MN1</i>	<i>MXN1</i>	<i>MSI2</i>	<i>MSN</i>	<i>MUC1</i>	<i>MYB</i>	
<i>MYC</i>	<i>MYH11</i>	<i>MYH9</i>	<i>NACA</i>	<i>NBEAP1 (BCL8)</i>	<i>NCOA2</i>	<i>NDRG1</i>	<i>NF1</i>	<i>NF2</i>	
<i>NFKB2</i>	<i>NIN</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>NPM1</i>	<i>NR4A3</i>	<i>NSD1</i>	<i>NTRK1</i>	<i>NTRK2</i>	<i>NTRK3</i>	
<i>NUMA1</i>	<i>NUP214</i>	<i>NUP98</i>	<i>NUTM2A</i>	<i>OMD</i>	<i>P2RY8</i>	<i>PAFAH1B2</i>	<i>PAX3</i>	<i>PAX5</i>	
<i>PAX7</i>	<i>PBX1</i>	<i>PCM1</i>	<i>PCSK7</i>	<i>PDCD1LG2 (PD-L2)</i>	<i>PDE4DIP</i>	<i>PDGFB</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>PDGFRB</i>	
<i>PER1</i>	<i>PHF1</i>	<i>PICALM</i>	<i>PIM1</i>	<i>PLAG1</i>	<i>PML</i>	<i>POU2AF1</i>	<i>PPP1CB</i>	<i>PRDM1</i>	
<i>PRDM16</i>	<i>PRRX1</i>	<i>PSIP1</i>	<i>PTCH1</i>	<i>PTK7</i>	<i>RABEP1</i>	<i>RAF1</i>	<i>RALGDS</i>	<i>RAP1GDS1</i>	
<i>RARA</i>	<i>RBM15</i>	<i>RET</i>	<i>RHOH</i>	<i>RNF213</i>	<i>ROS1</i>	<i>RPL22</i>	<i>RPN1</i>	<i>RUNX1</i>	
<i>RUNX1T1 (ETO)</i>	<i>RUNX2</i>	<i>SEC31A</i>	<i>SEPT5</i>	<i>SEPT6</i>	<i>SEPT9</i>	<i>SET</i>	<i>SH3GL1</i>	<i>SLC1A2</i>	
<i>SNX29 (RUNDC2A)</i>	<i>SRSF3</i>	<i>SS18</i>	<i>SSX1</i>	<i>SSX2</i>	<i>SSX4</i>	<i>STAT6</i>	<i>STL</i>	<i>SYK</i>	
<i>TAF15</i>	<i>TAL1</i>	<i>TAL2</i>	<i>TBL1XR1</i>	<i>TCF3 (E2A)</i>	<i>TCL1A (TCL1)</i>	<i>TEC</i>	<i>TET1</i>	<i>TFE3</i>	
<i>TFG</i>	<i>TFPT</i>	<i>TFRC</i>	<i>TLX1</i>	<i>TLX3</i>	<i>TMPRSS2</i>	<i>TNFRSF11A</i>	<i>TOP1</i>	<i>TP63</i>	
<i>TPM3</i>	<i>TPM4</i>	<i>TRIM24</i>	<i>TRIP11</i>	<i>TTL</i>	<i>TYK2</i>	<i>USP6</i>	<i>WHSC1 (MMSET or NSD2)</i>		
<i>WHSC1L1</i>	<i>YPEL5</i>	<i>ZBTB16</i>	<i>ZMYM2</i>	<i>ZNF384</i>	<i>ZNF521</i>				

Gènes inclus pour lesquels l'ARN est séquencé

TYPES D'ÉCHANTILLONS BLOC FFPE **OU** 16 COUPES DE 5µm D'ÉPAISSEUR NON COLOREES (+ 1 LAME H&E)

- 1 Le tissu doit être fixé au formol et inclus en bloc de paraffine. Utiliser une **méthode de fixation standard** avec du formol neutre tamponné à 10% pendant **6 à 72h**. Ne pas utiliser d'autres fixateurs (AZF, B5, Bouin, Holland).

En cas d'envoi de lames, envoyer **16 coupes non colorées de 5µm d'épaisseur** sur des lames chargées positivement (silanisées), **non chauffées préalablement + 1 lame H&E** (Hématoxyline & Eosine)

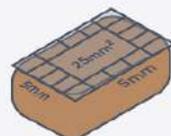


SURFACE

- 2 **OPTIMAL : 25 mm²**

Le tissu doit avoir une surface minimale de 25 mm²

Optimale : 5 x 5 mm²
ou 2,5 x 10 mm²



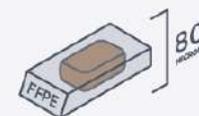
OU



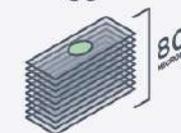
VOLUME

- 3 **OPTIMAL : 2 mm³**

Pour un volume d'échantillon optimal, vous pouvez envoyer un échantillon dont la surface est de 25 mm² avec une épaisseur ≥ 80 microns. Pour une surface tissulaire sous-optimale, une épaisseur plus importante est requise.



OU

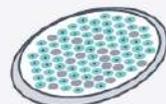


CELLULARITE TUMORALE

- 4

L'ADN est extrait de cellules nucléées.

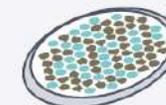
Les échantillons à faible taux de cellules nucléées (ex : ceux contenant un nombre important d'érythrocytes matures, de cellules lésionnelles avec un contenu excessif en cytoplasme ou encore les tissus avec un excès de fibrose) peuvent nécessiter un plus grand volume de tissu pour obtenir suffisamment d'ADN à l'extraction.



CONTENU TUMORAL

- 5 **OPTIMAL ≥ 30% (MINIMUM : ≥ 20%)**

Si le rapport entre cellules tumorales et cellules non-tumorales est trop faible, la sensibilité de détection de certaines classes d'altérations génomiques peut être réduite. Une teneur importante en cellules tumorales est préférable.



Remarque pour les échantillons hépatiques : La polyploïdie étant une caractéristique commune des hépatocytes, un contenu tumoral 2 fois plus élevé que pour les cellules somatiques peut être nécessaire pour avoir suffisamment d'ADN à analyser.



200 patients retrospectively included
(2005-2022 from 5 academic hospitals)

fusion-positive NS-NSCLC
(n=113 ; 62 ALK,
24 ROS, 12 RET, 2 NTRK,
13 MET Δ ex14)

RT-PCR screening (n=113)
NGS screening (n=102)

Successful RT-PCR (n=111)
Successful NGS (n=102)

**NTRK-positive
extrapulmonary tumors (n=5)**

RT-PCR screening (n=5)
NGS screening (n=4)

Successful RT-PCR (n=5)
Successful NGS (n=4)

WT NS-NSCLC
(n=82)

RT-PCR screening (n=82)
NGS screening (n=82)

Successful RT-PCR (n=80)
Successful NGS (n=82)

	Idylla	Idylla (no Imbalance)	Genexus	Genexus (no Imbalance)
Accuracy (95%CI)	0.923 (0.88 – 0.96)	0.867 (0.81 – 0.91)	0.931 (0.89 – 0.96)	0.931 (0.89 – 0.96)
Sensitivity (95% CI)	0.914 (0.86 – 0.97)	0.793 (0.72 – 0.87)	0.934 (0.89 – 0.98)	0.877 (0.82 – 0.94)
<i>ALK</i>	0.87	0.72	0.88	0.80
<i>ROS1</i>	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>MET</i>	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>RET</i>	1.00	0.92	1.00	1.00
<i>NTRK</i>	0.67	0.00	1.00	0.67
Specificity (95% CI)	0.951 (0.91 – 1.0)	0.988 (0.96 – 1.0)	0.927 (0.87 – 0.98)	1.0 (1.0 – 1.0)
<i>ALK</i>	0.99	1.00	0.95	1.00
<i>ROS1</i>	0.99	0.99	1.00	1.00
<i>MET</i>	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>RET</i>	0.99	0.99	1.00	1.00
<i>NTRK</i>	0.99	1.00	1.00	1.00
NPV*				
<i>ALK (4%)</i>	0.99	0.99	0.99	0.99
<i>ROS1 (2%)</i>	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>MET (3%)</i>	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>RET (2%)</i>	1.00	0.77	1.00	1.00
<i>NTRK (0.2%)</i>	1.00	1.00	1.00	1.00
PPV*				
<i>ALK (4%)</i>	0.71	1.00	0.45	1.0
<i>ROS1 (2%)</i>	0.78	0.78	1.00	1.0
<i>MET (3%)</i>	1.00	1.00	1.00	1.0
<i>RET (2%)</i>	0.79	0.77	1.00	1.0
<i>NTRK (0.2%)</i>	0.20	NA	1.00	1.0

- **Performance parameters** were slightly higher for the Genexus NGS assay versus the Idylla qPCR assay
- **5'3' imbalance analysis** increased the sensitivity and decreased the specificity (FP) for both system
- Idylla qPCR system had a **low sensitivity for *NTRK* fusions** (67%) vs NGS (100%)

***ALK* fusion** detection was low for both methods

Outline



The growing set of targetable biomarkers in NSCLC



The sample quality is still a major challenge



RNA sequencing as a key tool in today's NSCLC care

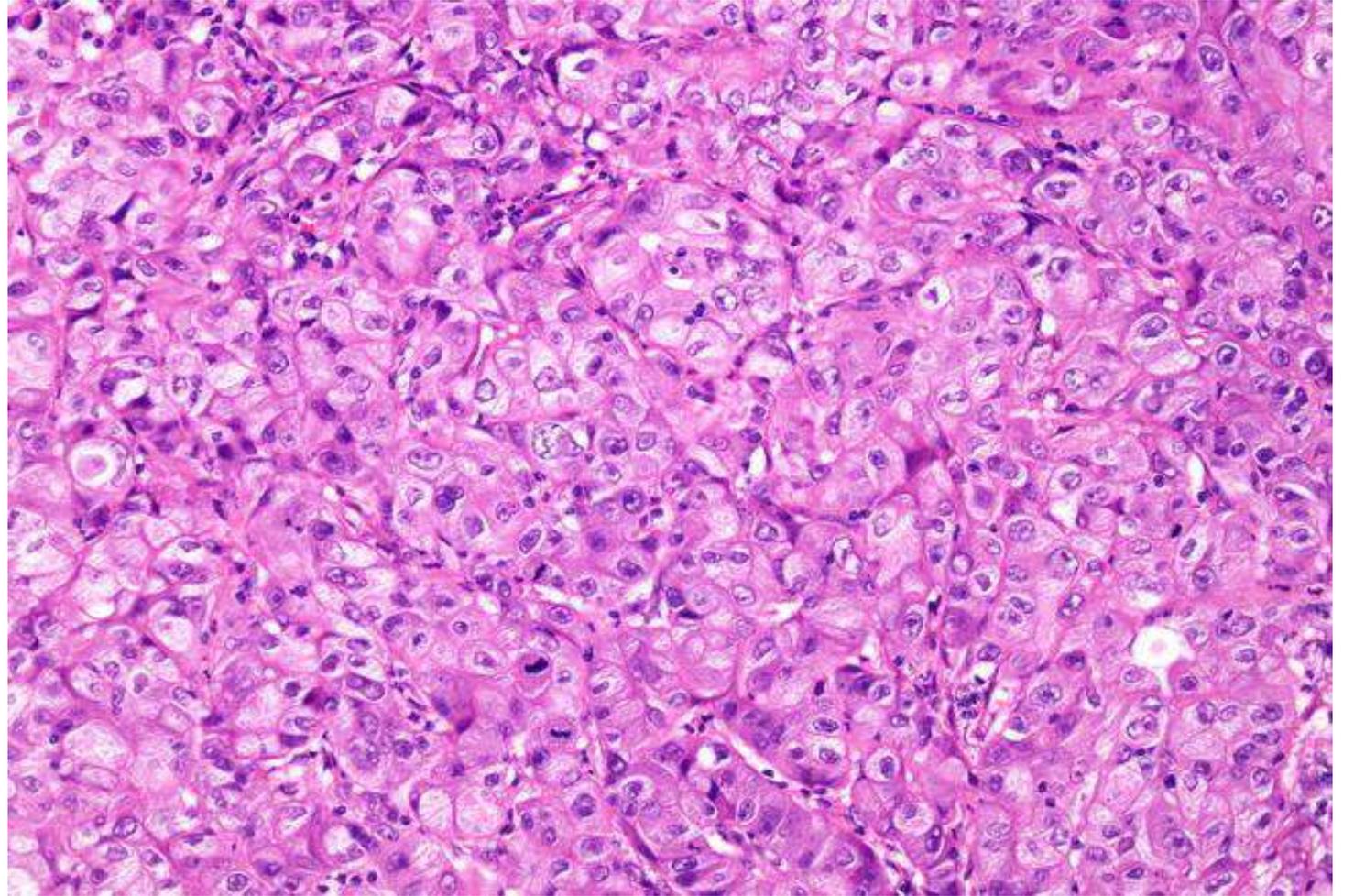


Examples in routine clinical practice



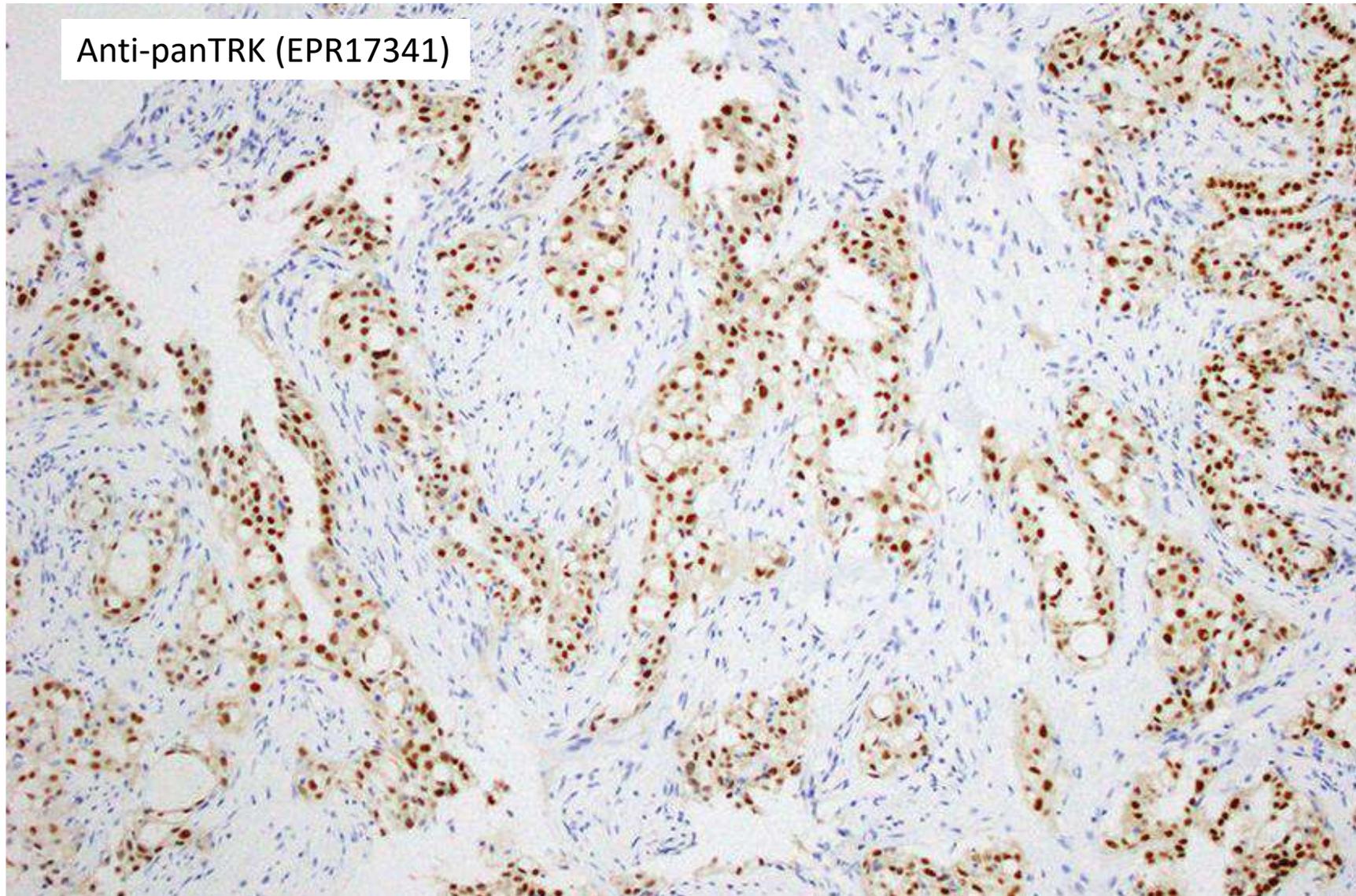
Case N°1

- 62 years old woman, non smoker
- No past medical history
- Lung tumor with mediastinum and sus clavicular lymph nodes metastases
- Transthoracic biopsies: solid adenocarcinoma
- IHC: TTF1 positivity (100%)
- 90% of tumor cells
- Nucleic acids extraction without macrodissection
- DNA and RNA 50 gene NGS panel



DNA and RNA 50 gene NGS panel results

- DNA: no genomic alterations detectable
- RNA: Fusion: **ETV6-NTRK3**



Staining pattern for ETV6-NTRK3 fusion positive case [pan-TRK IHC (pan-Trk IHC clone EPR17341, 100x original magnification, Abcam, Cambridge, MA)].

Treatment and outcome

- First line: NTRK inhibitor (entrectinib) = total regression

Review

The Challenge and Opportunity of NTRK Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer

Haixia Qin and Manish R. Patel *

Department of Hematology, Oncology and Bone Marrow Transplant, University of Minnesota,
Minneapolis, MN 55455, USA

* Correspondence: patel069@umn.edu

Table 1. NTRK fusion gene partners in lung cancer.

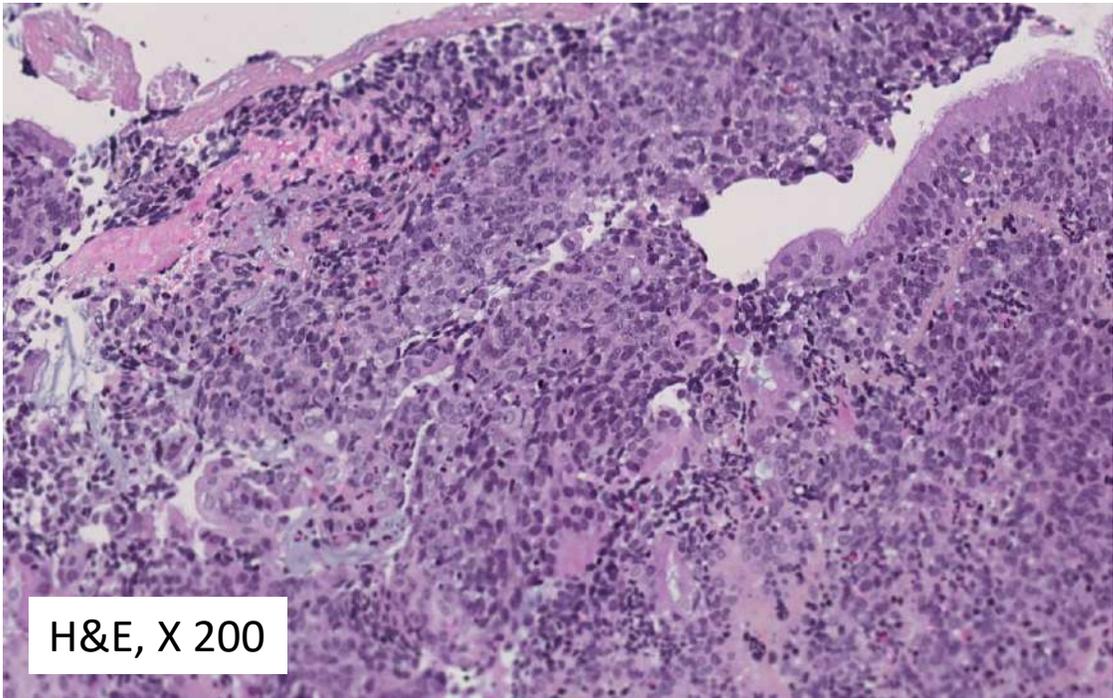
NTRK Gene	Fusion Partners	Cancer Type/References
NTRK1	TPM3	Adenocarcinoma [19]
	MPRIP	Lung cancer [20]
	CD74	Lung cancer [20]
	SQSTM1	Non-small cell lung cancer [21]
	IRF2BP2	Adenocarcinoma [22]
	TPR	Adenocarcinoma/neuroendocrine tumor [22]
	NCOR2	Adenocarcinoma [23]
	EPS15	Adenocarcinoma [13]
	TFC	Non-small cell lung cancer [22]
NTRK2	F11R	Non-small cell lung cancer [22]
	SQSTM1	Adenocarcinoma [19]
NTRK3	STRN	Non-small cell lung cancer [22]
	ETV6	Adenocarcinoma/squamous cell carcinoma [22]
	SQSTM1	Neuroendocrine tumor [22]
	RBPMS	Adenocarcinoma [13]
	EML4	Non-small cell lung cancer [22]

Table 2. NTRK inhibitors activity and side effects.

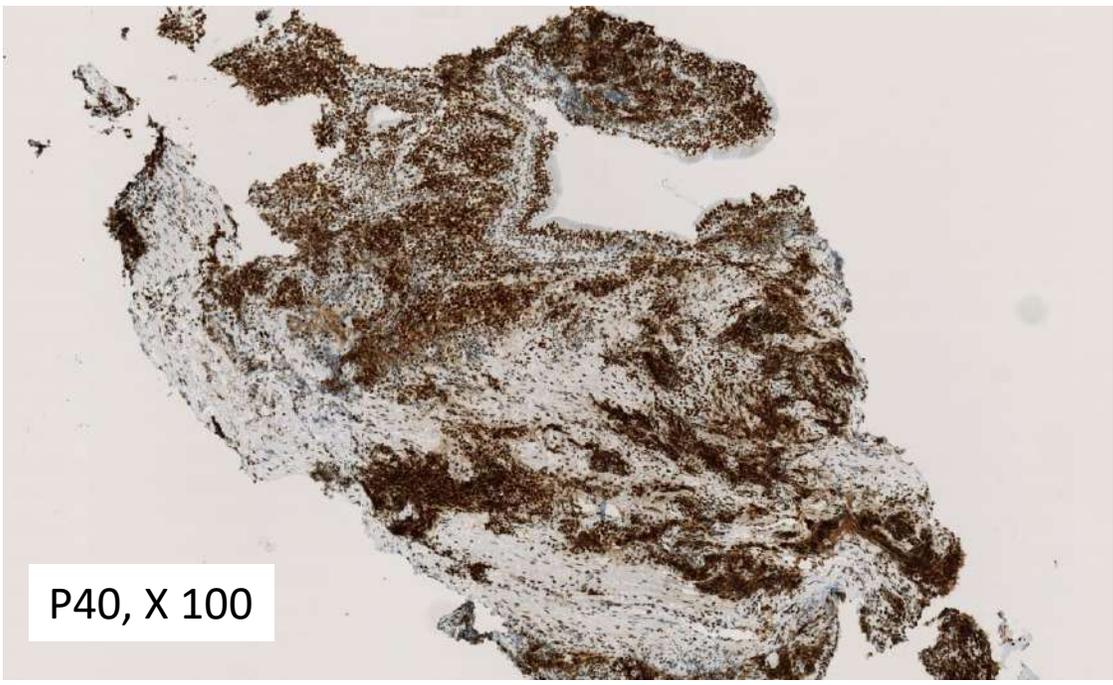
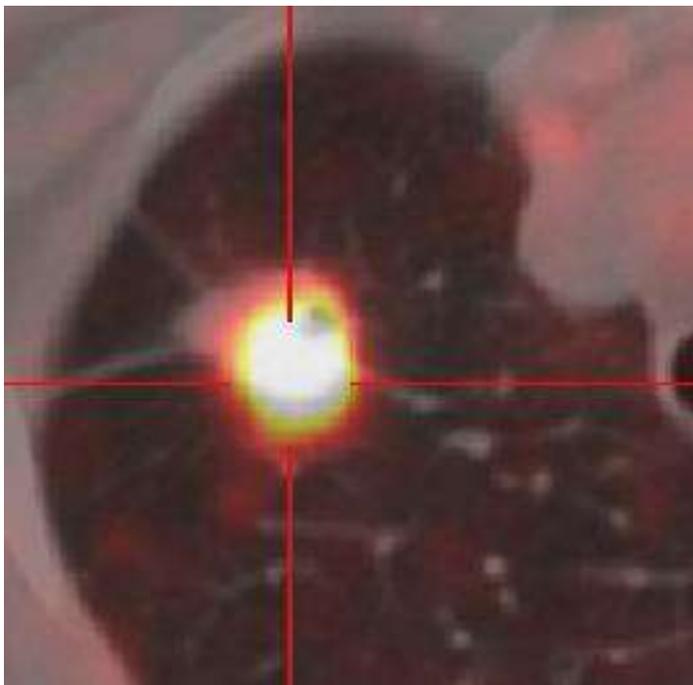
Medication	Larotrectinib [24]	Entrectinib [10]	Selitrectinib	Repotrectinib [36]	Taletrectinib
Generation	1	1	2	2	2
Target genes	TRKA/B/C	TRKA/B/C ROS1 ALK	TRKA/B/C	TRKA/B/C ROS1 ALK	TRKA/B/C ALK
Clinical trials	NCT02576431 NCT02122913 NCT02637687	ALKA-372-001 STARTRK-1 STARTRK-2	NCT03215511 NCT03206931	NCT03093116 (TRIDENT-1)	NCT04395677
Intracranial activity	Y	Y	Y	Y	N/A
Sample size (N)	206/218 eligible for efficacy evaluation	54	N/A	40	N/A
Cancer types	21	10			
Age (years)	38.0 (range 0.1–84.0)	58 (48–67)			
ORR	75% (95% CI 68–81)	31 (57%)	N/A	41–62%	
CR	45 (22%)	4 (7%)			
PR	109 (53%)	27 (50%)			
Stable	33 (16%)	9 (17%)			
PD	13 (6%)	4 (7%)			
Median duration of response (months)	49.3 (95% CI 27.3–NE)	10.4 (7.1–NE)			
Disease free progression time (months)	35.4 (95% CI 23.4–55.7) with a median follow up of 20.3 months	11.2 (8.0–14.9)			
Side effects	18% Grade 3–4 TRAEs.	10%-increased weight; 12%-anemia; 4%-nervous system disorders			
Brain metastasis result	N = 19 with 15 evaluable for efficacy: PR = 11 (73%); SD = 2 (13%); PD = 2 (13%)	N = 12 (22%); PR = 6 (50%); SD = 4 (33%)			

Case N°2

- 33 years old smoker woman
- No past medical history
- Multiples bone marrow lesions associated with a lung tumor
- Lung biopsies: undifferentiated malignant cells
- AE1-AE2, P40, P63, and INI1 positive cells
- TTF1, PD-L1, CD5, C117, C20, TdT, and HMB45 negative cells
- 30% of tumor cells
- Nucleic acids extraction after macrodissection
- DNA and RNA 50 gene NGS panel



H&E, X 200



P40, X 100

DNA and RNA 50 gene NGS panel results

- **DNA:** no genomic alterations detectable
- **RNA:** Fusion: WHSC1L1 (7)-NUTM1 (2)

NUT fusions detectable on the RNA OPA panel

AFF1(17) - NUTM1(3)

BCORL1(1) - NUTM1(2)

BRD3(10) - NUTM1(2)

BRD3(10) - NUTM1(5)

BRD3(9) - NUTM1(4)

BRD4(11) - NUTM1(2)

BRD4(14) - NUTM1(2)

BRD4(15) - NUTM1(2)

CIC(16) - NUTM1(4)

CIC(17) - NUTM1(5)

CIC(18) - NUTM1(2)

CIC(18) - NUTM1(5)

CIC(20) - NUTM1(5)

MXD1(5) - NUTM1(2)

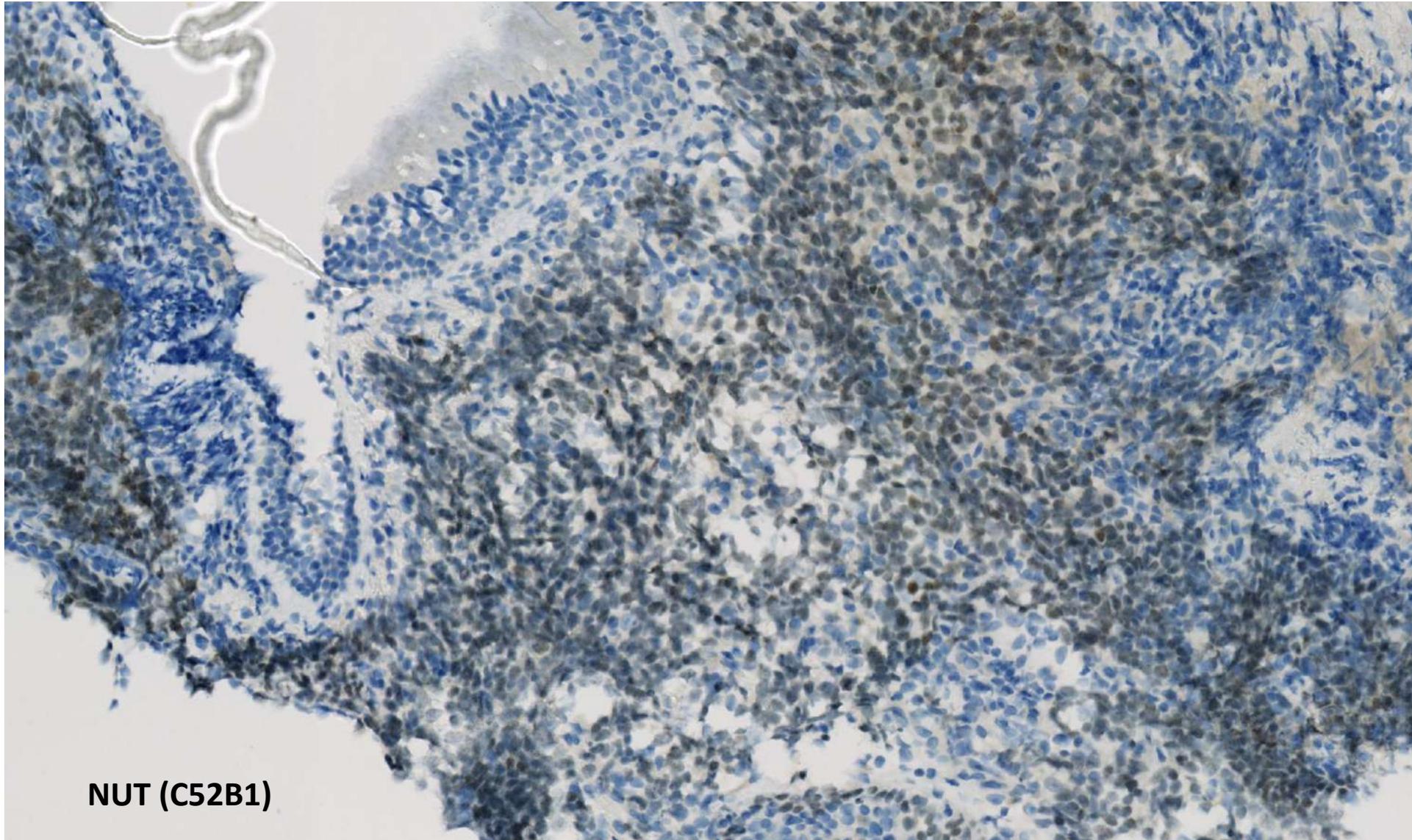
WHSC1L1(7) - NUTM1(2)

ZNF618(12) - NUTM1(2)



NUT Immunohistochemistry (clone C52B1; Cell Signalling)

Nuclear tumor cells staining



Treatment and outcome

- First line: chemotherapy and ICI (pembro) first line, then tumor progression
- Second line : inclusion in a phase 1 clinical trial (HDAC) : stable for three months until now

BET Proteins as Targets for Anticancer

Cancer Discov; 8(1); 24–36. ©2017 AACR.

Treatment



BET inhibitors in clinical trials, from ClinicalTrials.gov (<https://clinicaltrials.gov/>)

Anastasios Stathis¹ and Francesco Bertoni^{1,2}

NUT Carcinoma

NUT carcinoma represents a disease prototype for the clinical testing of BET inhibitors due to the strong preclinical rationale, as reported above, and to the need for novel therapeutic approaches. Indeed, NUT carcinoma is one of the most lethal solid tumors, characterized by a very aggressive course, lack of benefit from chemotherapy or radiotherapy, and an overall survival of 6 to 9 months (26).

MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS | SMALL MOLECULE THERAPEUTICS

Combined Targeting of the BRD4–NUT–p300 Axis in NUT Midline Carcinoma by Dual Selective Bromodomain Inhibitor, NEO2734

Chevaun D. Morrison-Smith¹, Tatiana M. Knox¹, Ivona Filic¹, Kara M. Soroko², Benjamin K. Eschle², Margaret K. Wilkens², Prafulla C. Gokhale², Francis Giles³, Andrew Griffin⁴, Bill Brown⁵, Geoffrey I. Shapiro⁶, Beth E. Zucconi⁷, Philip A. Cole⁷, Madeleine E. Lemieux⁸, and Christopher A. French¹



Chemical screen identifies diverse and novel histone deacetylase (HDAC) inhibitors as repressors of NUT function: implications for NUT carcinoma pathogenesis and treatment

Hitoshi Shiota¹, Artyom A. Alekseyenko^{2,3}, Zhipeng A. Wang^{2,4}, Ivona Filic¹, Tatiana M. Knox¹, Nhi M. Luong¹, Yeying Huang¹, David A. Scott^{5,6}, Kristen L. Jones⁷, Prafulla C. Gokhale⁷, Madeleine E. Lemieux⁸, Philip A. Cole^{2,4}, Mitzi I. Kuroda^{2,3}, Christopher A. French¹

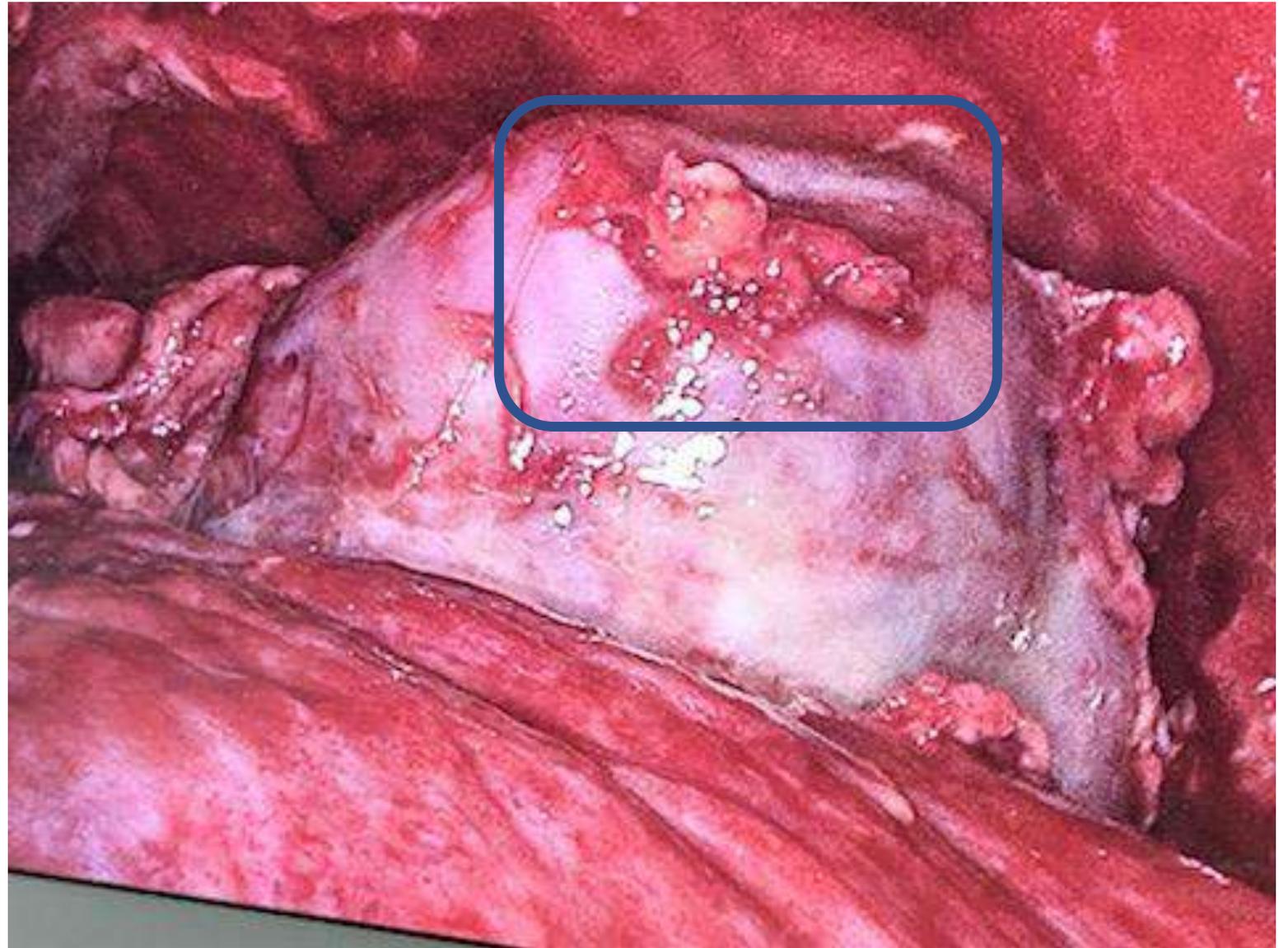
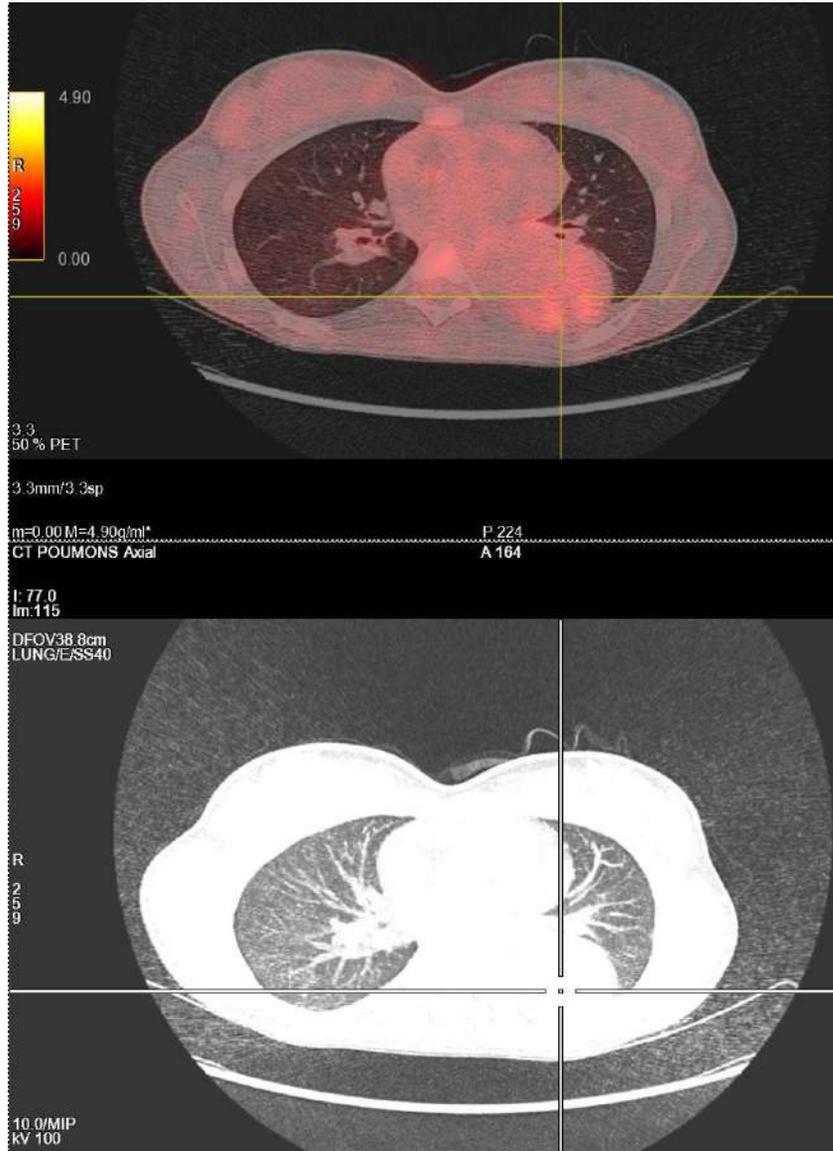
Mol Cancer Ther 2020;19:1406–14

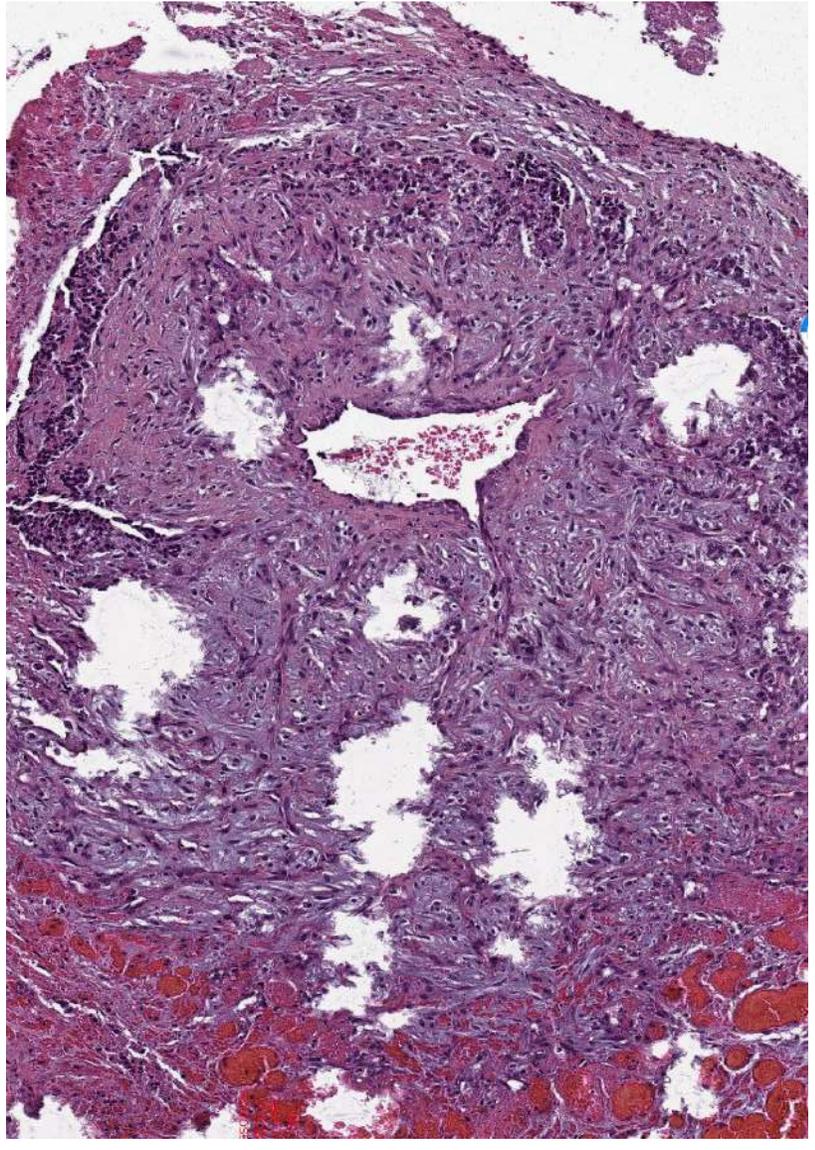
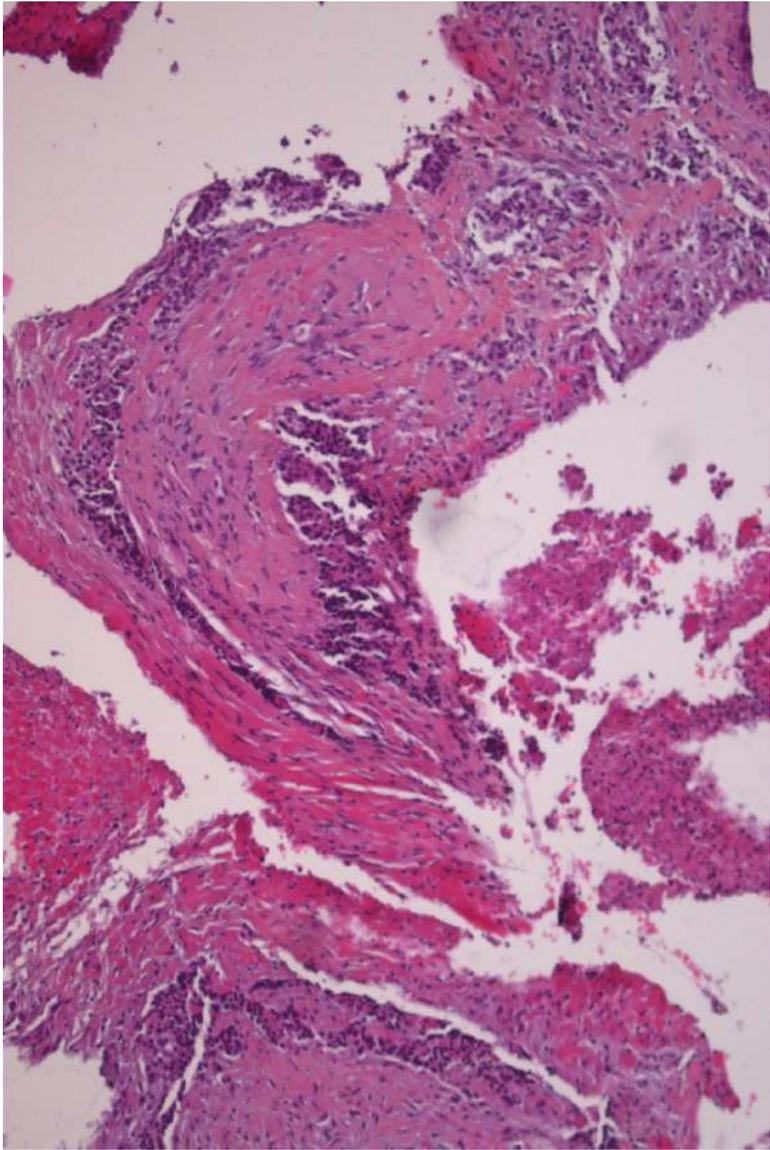
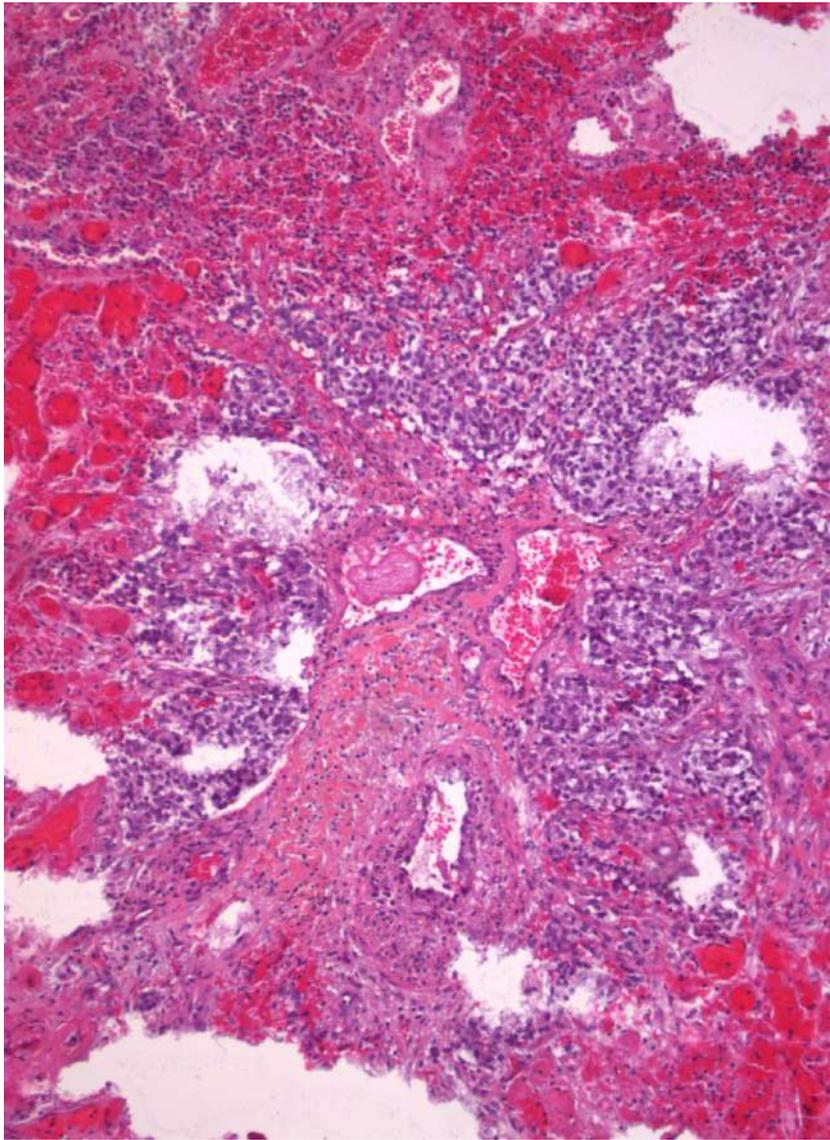
doi: 10.1158/1535-7163.MCT-20-0087

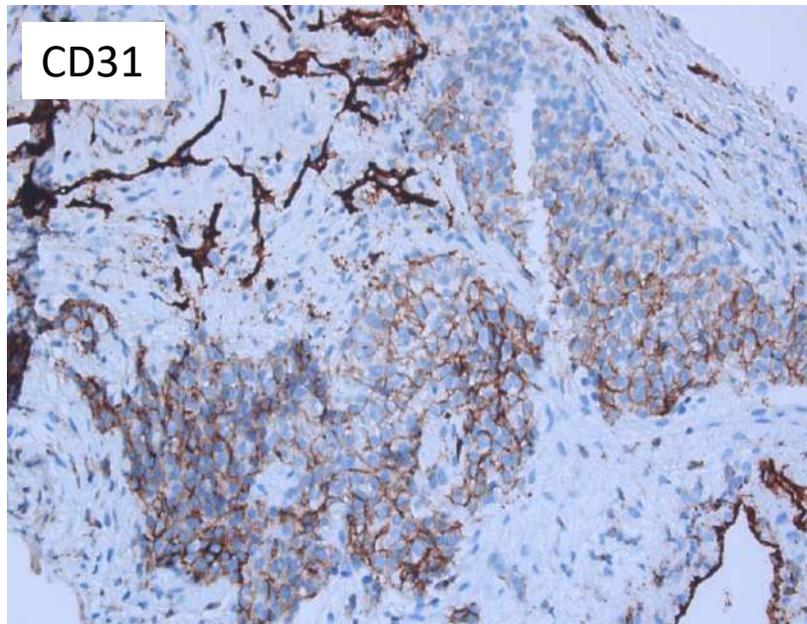
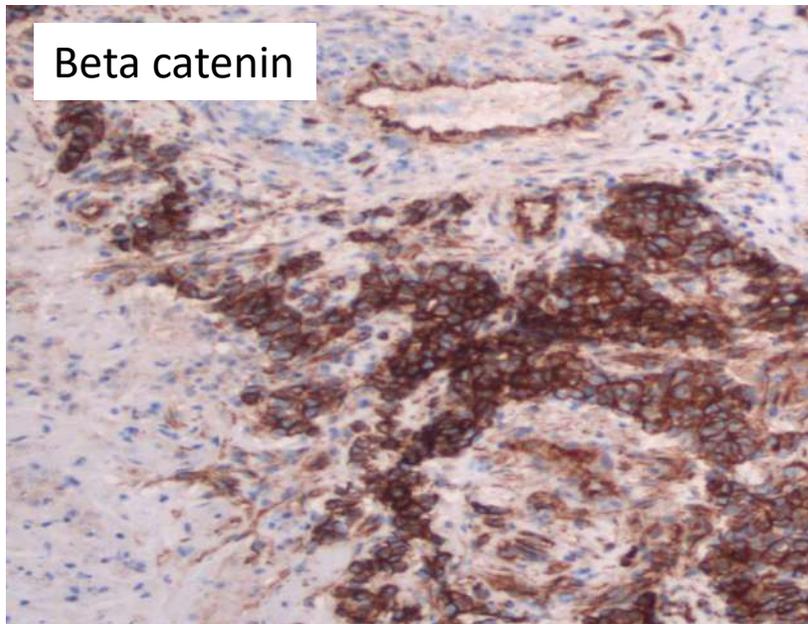
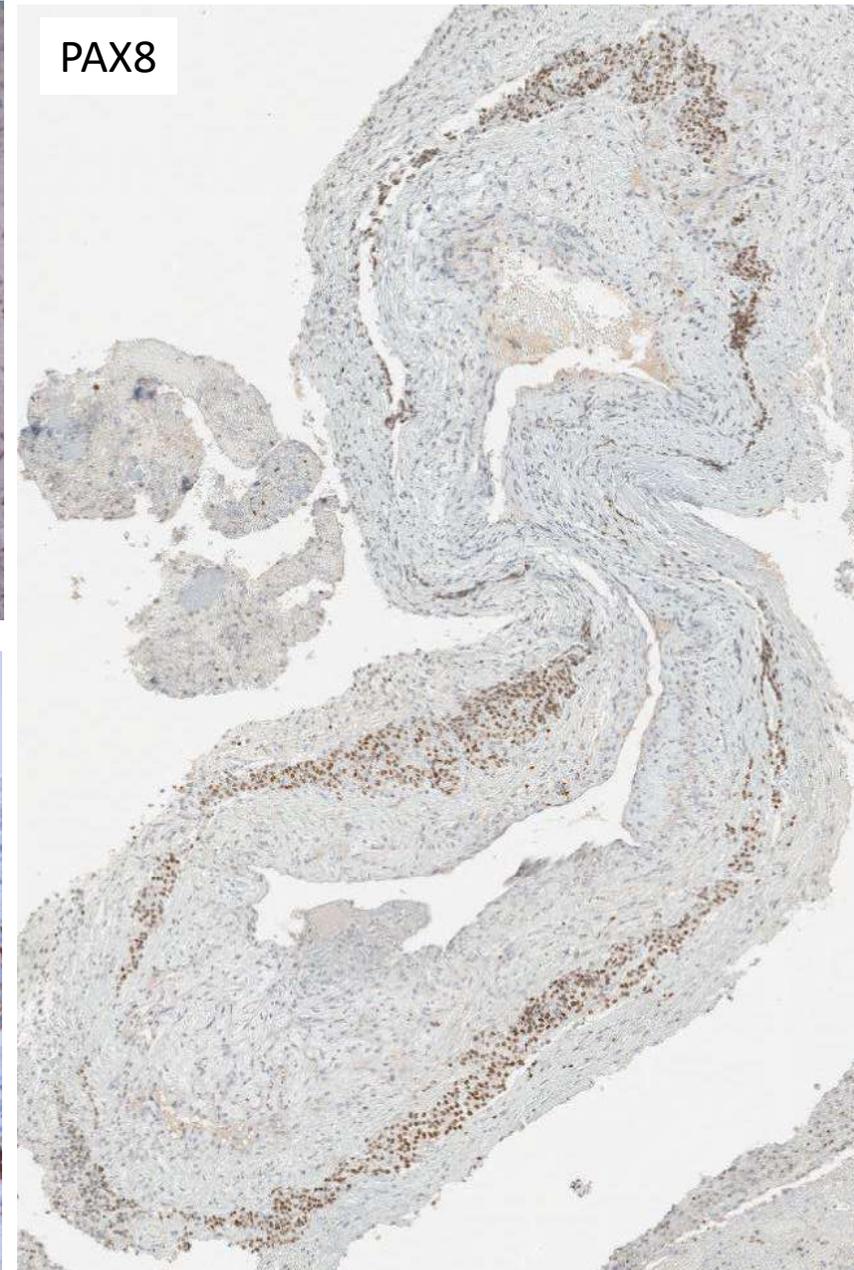
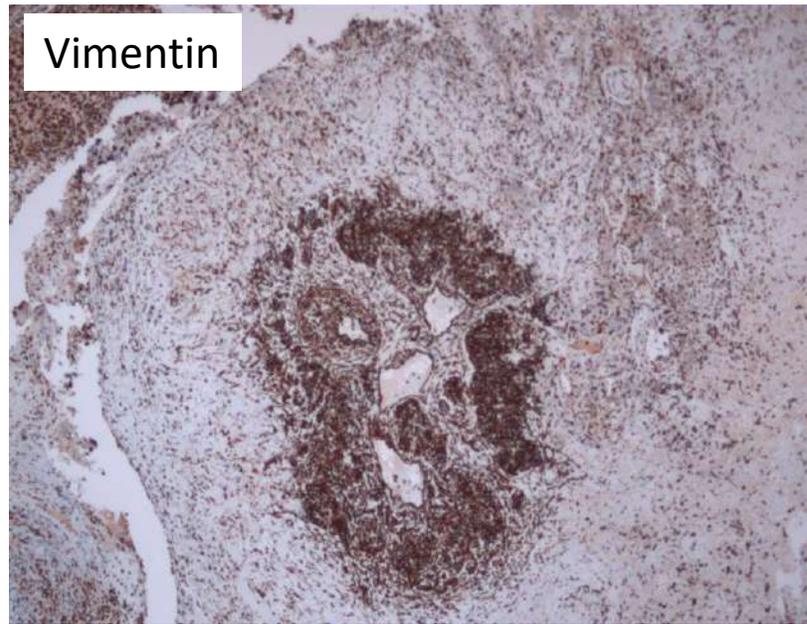
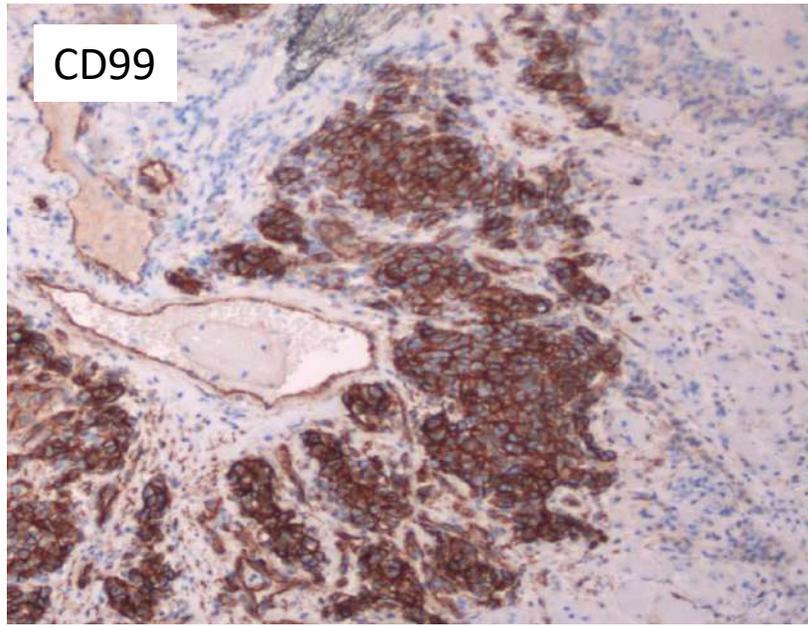
©2020 American Association for Cancer Research.

Case N°3

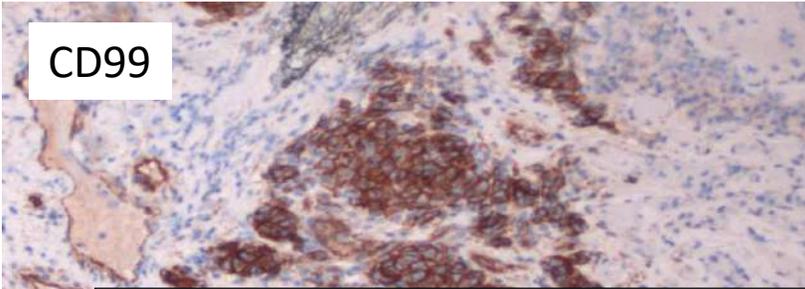
- 16 years old girl, with no past medical history
- Massive left hemothorax during scuba diving activity
- During draining, presence of a mass of the left lower inferior lobe (biopsy)
- CT scan after complete liquid evacuation: tumor or tumor-like process of the lower inferior lobe of the left lung



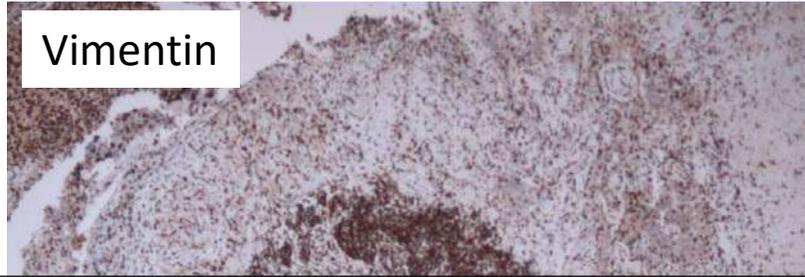




CD99



Vimentin



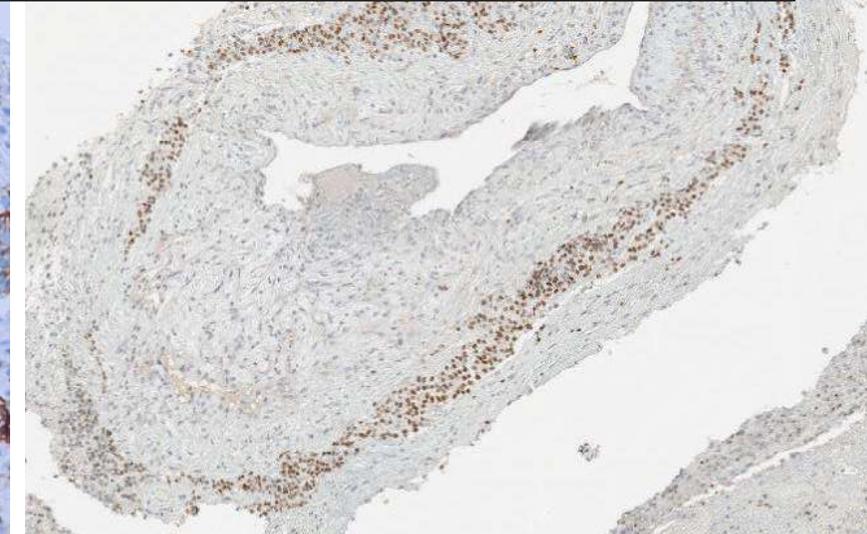
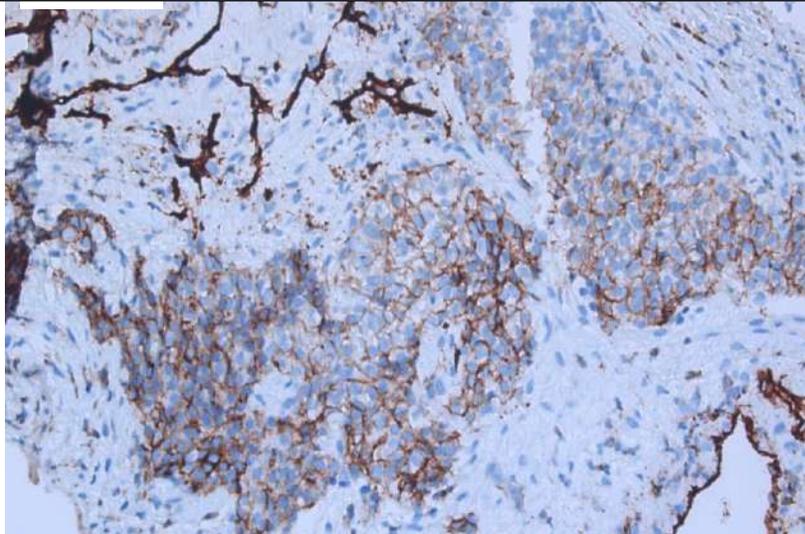
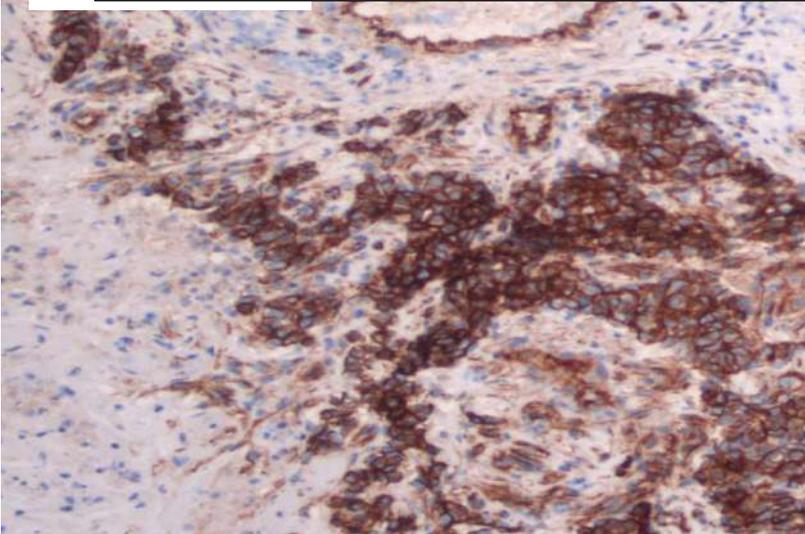
PAX8



EWSR1-FL11 [EWSR1_ENST00000397938_(e7)—FL11_ENST00000527786_(e6), in frame]
Overexpression of *KL*, *VEGFA*, *BCL6* and *JAK1*

Primary Ewing sarcoma of the lung

Be



Pulmonary tumors **other than** adenocarcinoma,
squamous carcinoma & neuroendocrine neoplasms?

Any targetable fusions?

Mesenchymal tumors of the thorax

Adipocytic tumors

- Lipoma of the thorax
- Thymolipoma of the thorax
- liposarcoma of the thorax

Fibroblastic and myofibroblastic tumors

- Desmoid fibromatosis of the thorax
- Solitary fibrous tumor of the thorax
- Calcifying fibrous tumor of the thorax
- Inflammatory myofibroblastic tumor of the thorax
- Myxofibrosarcoma of the thorax

Vascular tumors

- Haemangioma of the thorax
- Lymphangioma of the thorax
- Epithelioid haemangioendothelioma of the thorax
- Angiosarcoma of the thorax

Skeletal muscle tumors

- Rhabdomyosarcoma of the thorax

Peripheral nerve sheath and neural tumors

- Paranglioma of the thorax
- Granular cell tumor of the thorax
- Schwannoma of the thorax
- Malignant peripheral nerve sheath tumor of the thorax
- Peripheral neuroblastic tumor of the thorax

Tumors of uncertain differentiation

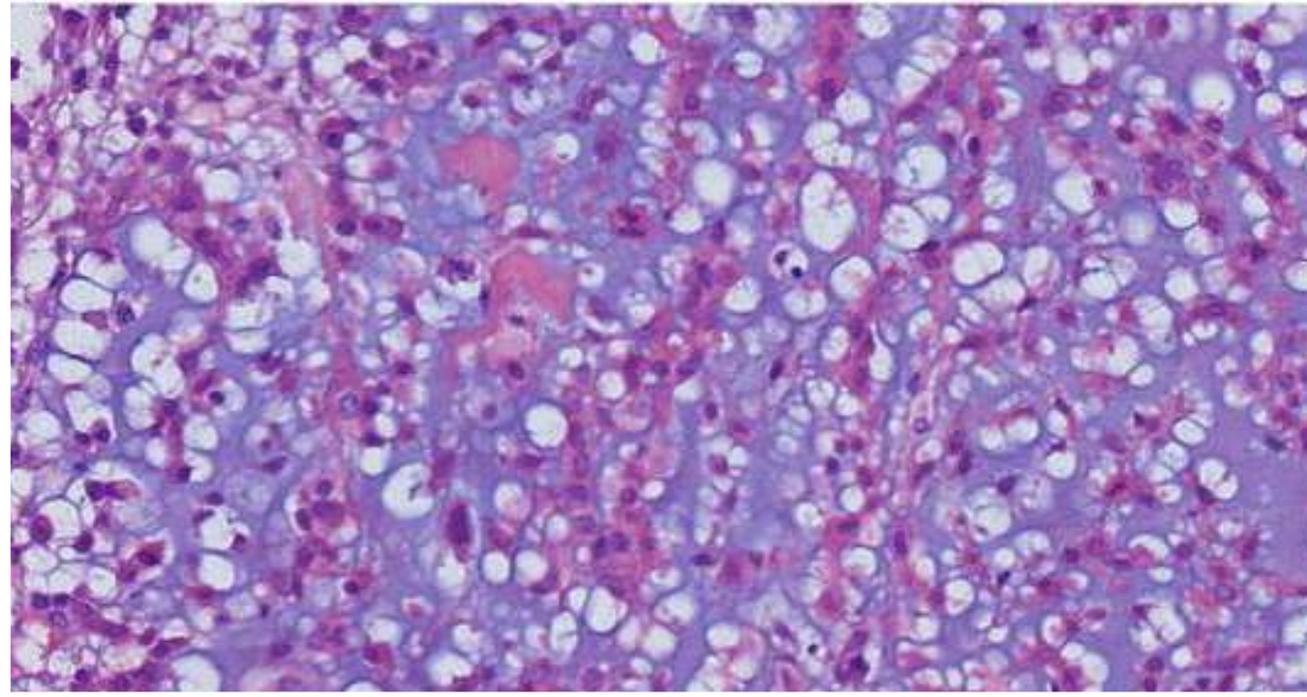
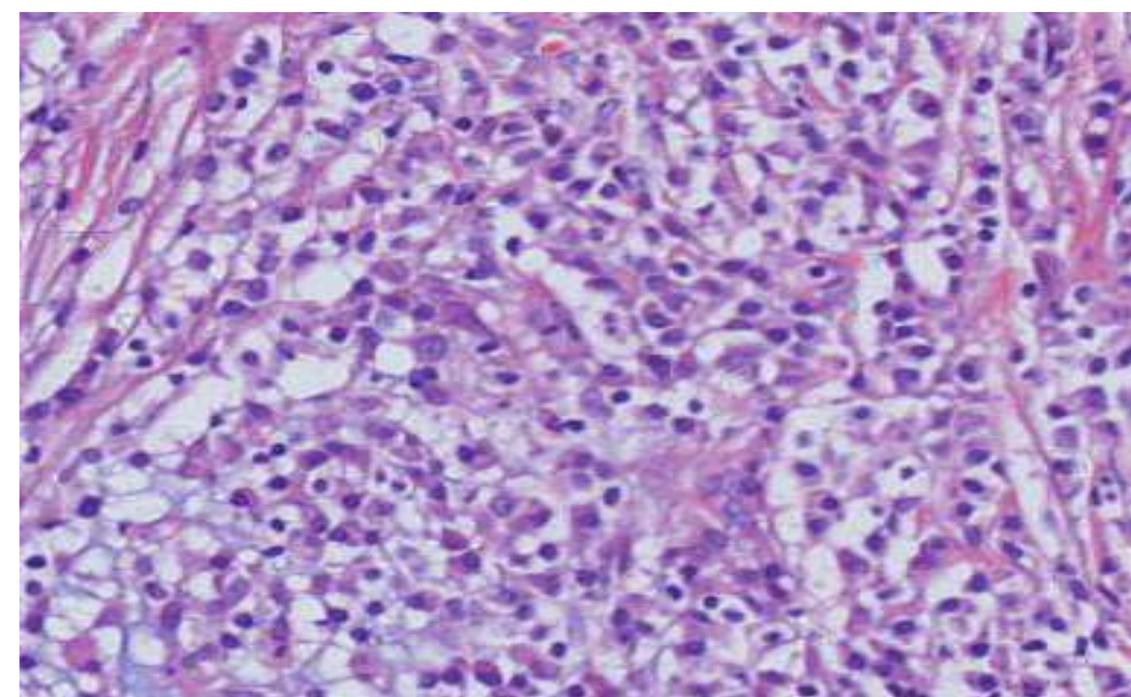
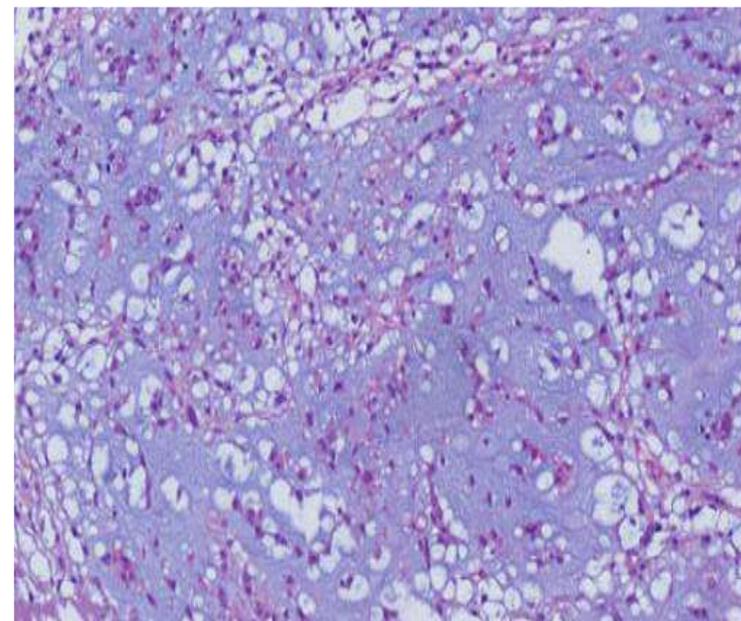
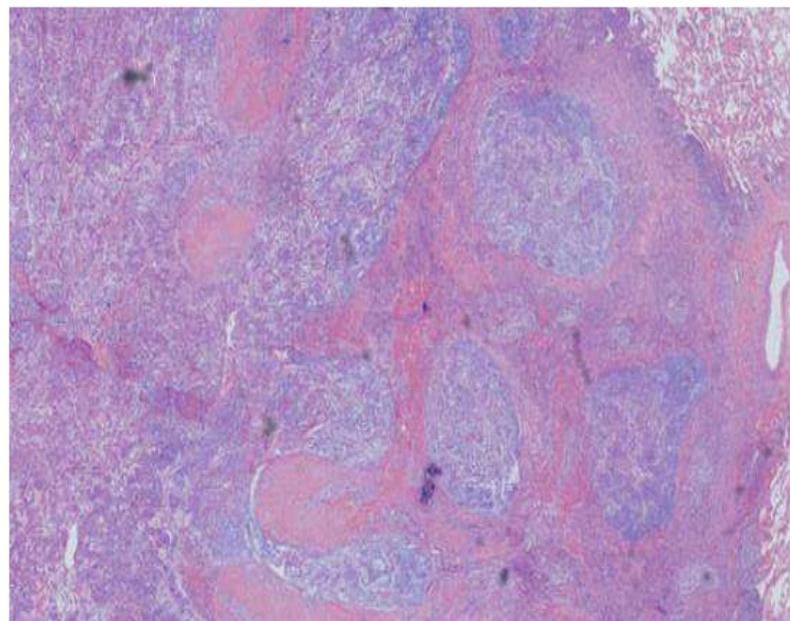
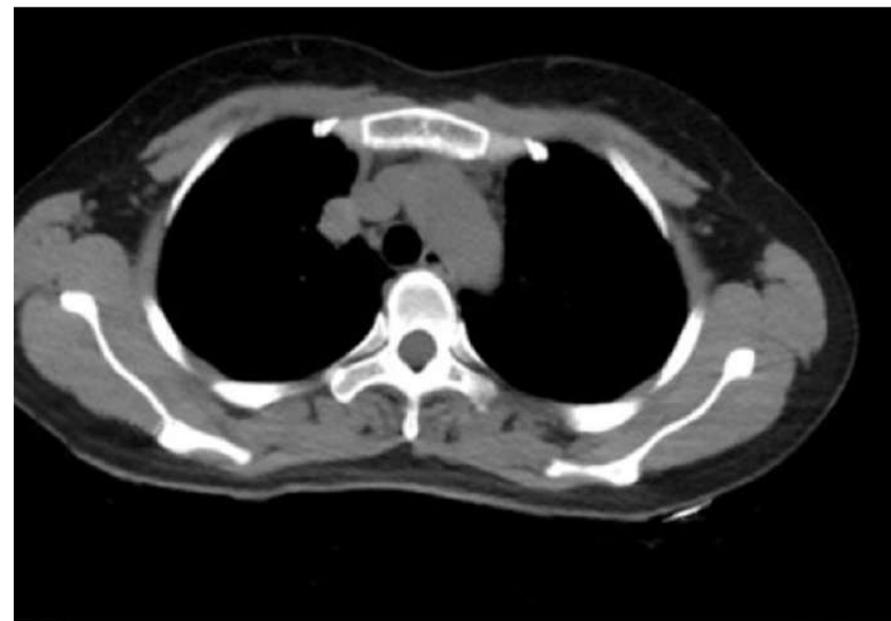
- Synovial sarcoma of the thorax
- Undifferentiated small round cell sarcoma of the thorax

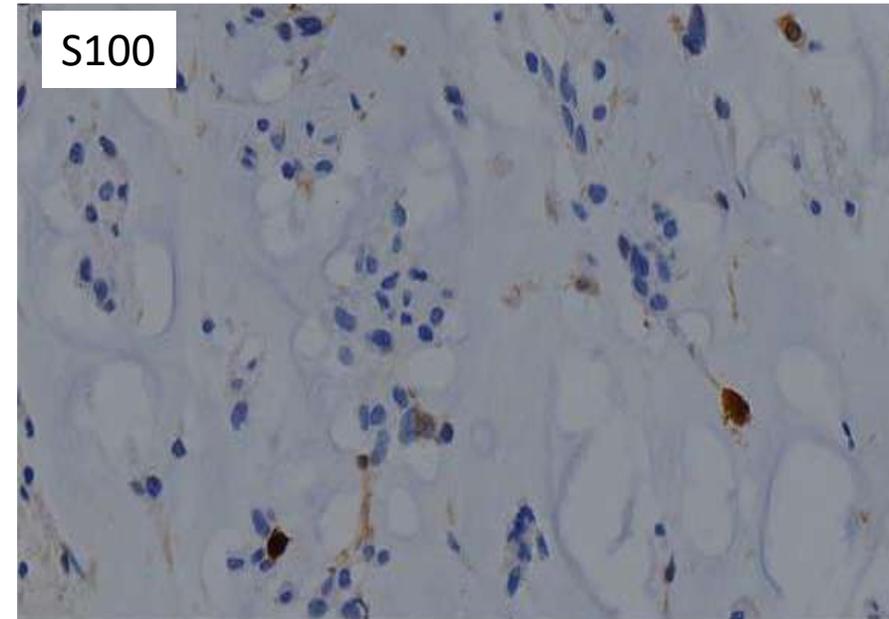
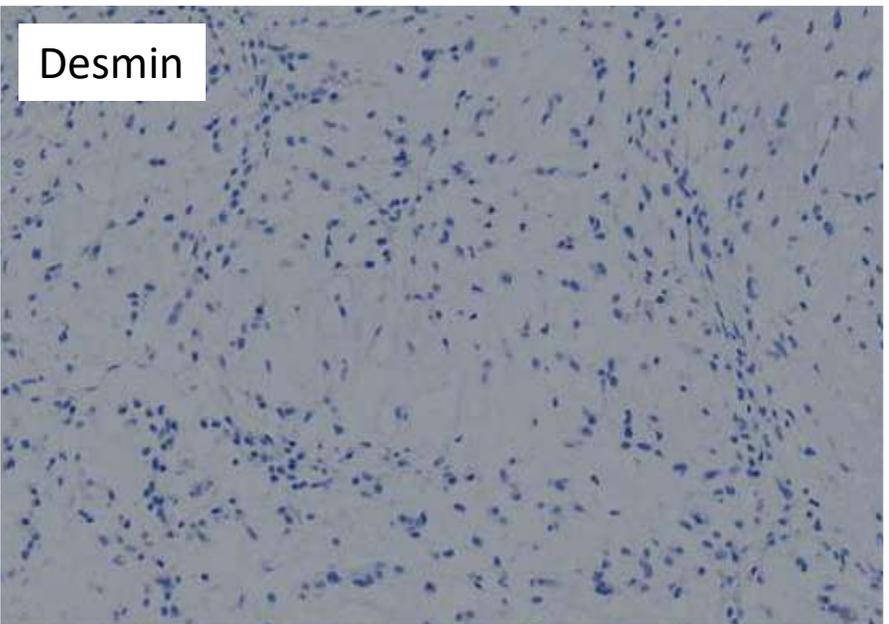
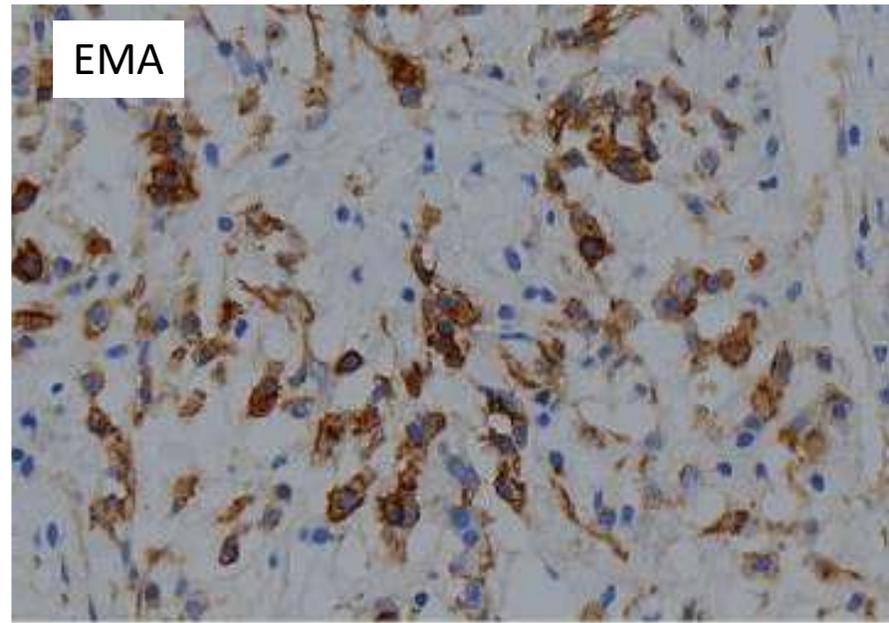
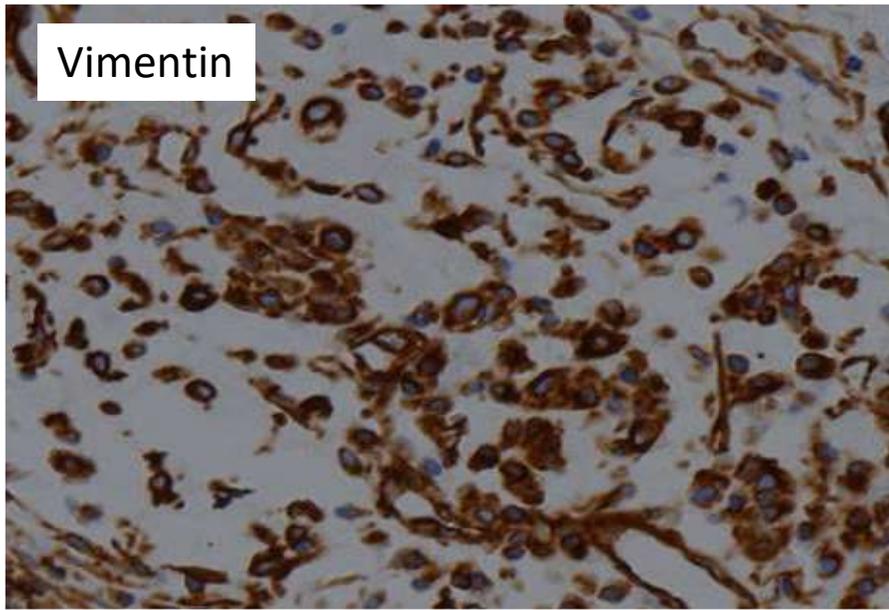


WHO 2020/2021

Mesenchymal tumors specific to the lung

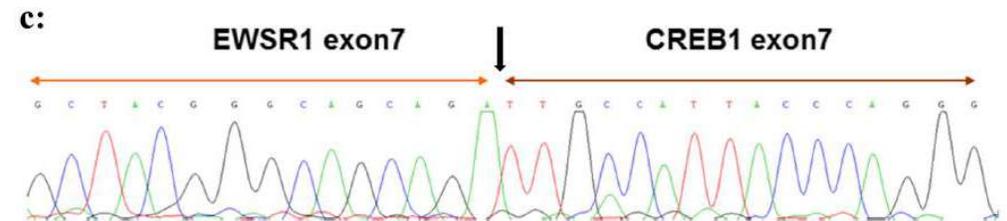
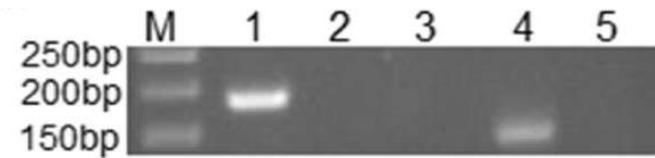
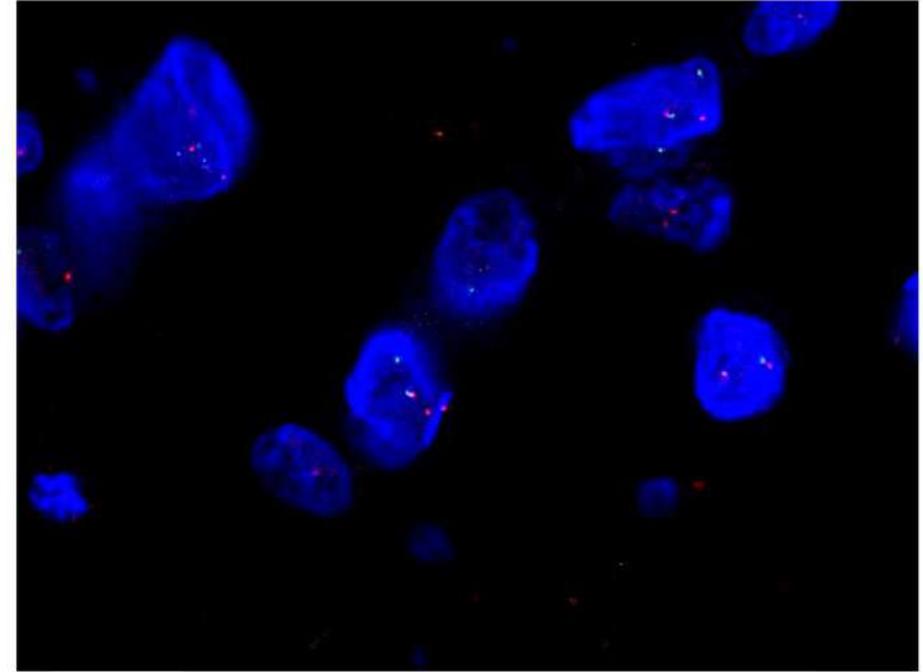
- Pulmonary hamartoma
- Pulmonary chondroma
- Diffuse pulmonary lymphangiomatosis
- Pleuropulmonary blastoma
- Pulmonary artery intimal sarcoma
- Primary pulmonary myxoid sarcoma with *EWSR1-CREB1* fusion





EWSR1-CREB1 fusion

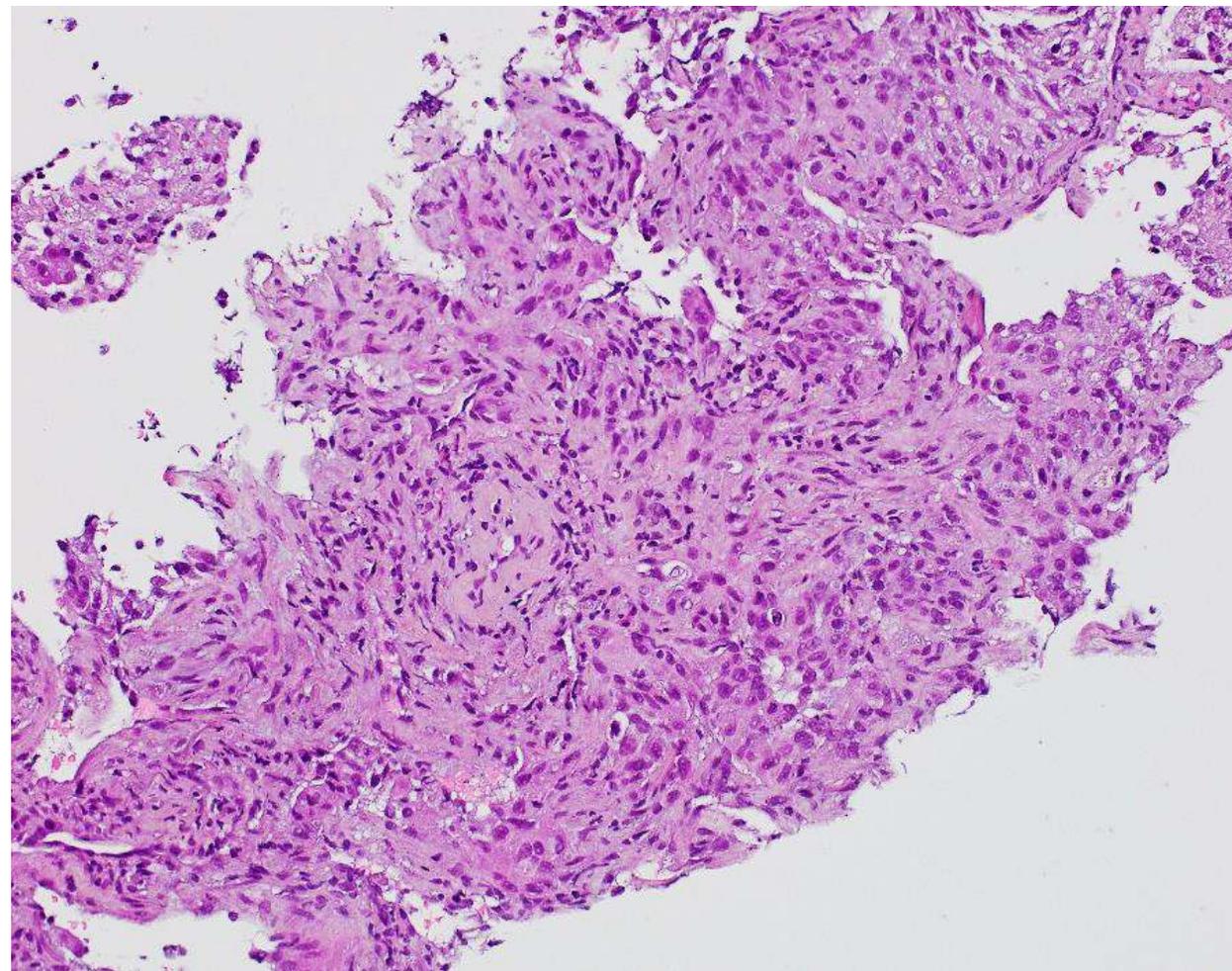
ABI1	ABL1	ABL2	ACSL6	AFF1	AFF4	ALK	ARHGAP26 (GRAF)		
ARHGEF12	ARID1A	ARNT	ASXL1	ATF1	ATG5	ATIC	BCL10	BCL11A	
BCL11B	BCL2	BCL3	BCL6	BCL7A	BCL9	BCOR	BCR	BIRC3	
BRAF	BTG1	CAMTA1	CARS	CBFA2T3	CBFB	CBL	CCND1	CCND2	
CCND3	CD274 (PD-L1)	CDK6	CDX2	CHIC2	CHN1	CIC	CIITA	CLP1	
CLTC	CLTCL1	CNTRL (CEP110)	COL1A1	CREB3L1	CREB3L2	CREBBP	CRLF2	CSF1	
CTNNB1	DDIT3	DDX10	DDX6	DEK	DUSP22	EGFR	EIF4A2	ELF4	
ELL	ELN	EML4	EP300	EPOR	EPS15	ERBB2	ERG	ETS1	
ETV1	ETV4	ETV5	ETV6	EWSR1	FCGR2B	FCRL4	FEV	FGFR1	
FGFR1OP	FGFR2	FGFR3	FLI1	FNBP1	FOXO1	FOXO3	FOXO4	FOXP1	
FSTL3	FUS	GAS7	GLI1	GMPS	GPHN	HERPUD1	HEY1	HIP1	
HIST1H4I	HLF	HMGA1	HMGA2	HOXA11	HOXA13	HOXA3	HOXA9	HOXC11	
HOXC13	HOXD11	HOXD13	HSP90AA1	HSP90AB1	IGH	IGK	IGL	IKZF1	
IL21R	IL3	IRF4	ITK	JAK1	JAK2	JAK3	JAZF1	KAT6A (MYST3)	
KDSR	KIF5B	KMT2A (MLL)	LASP1	LCP1	LMO1	LMO2	LPP	LYL1	
MAF	MAFB	MALT1	MDS2	MECOM	MKL1	MLF1	MLLT1 (ENL)	MLLT10 (AF10)	
MLLT3	MLLT4 (AF6)	MLLT6	MN1	MNX1	MSI2	MSN	MUC1	MYB	
MYC	MYH11	MYH9	NACA	NBEAP1 (BCL8)	NCOA2	NDRG1	NF1	NF2	
NFKB2	NIN	NOTCH1	NPM1	NR4A3	NSD1	NTRK1	NTRK2	NTRK3	
NUMA1	NUP214	NUP98	NUTM2A	OMD	P2RY8	PAFAH1B2	PAX3	PAX5	
PAX7	PBX1	PCM1	PCSK7	PDCD1LG2 (PD-L2)	PDE4DIP	PDGFB	PDGFRA	PDGFRB	
PER1	PHF1	PICALM	PIM1	PLAG1	PML	POU2AF1	PPP1CB	PRDM1	
PRDM16	PRRX1	PSIP1	PTCH1	PTK7	RABEP1	RAF1	RALGDS	RAP1GDS1	
RARA	RBM15	RET	RHOH	RNF213	ROS1	RPL22	RPN1	RUNX1	
RUNX1T1 (ETO)	RUNX2	SEC31A	SEPT5	SEPT6	SEPT9	SET	SH3GL1	SLC1A2	
SNX29 (RUNDC2A)	SRSF3	SS18	SSX1	SSX2	SSX4	STAT6	STL	SYK	
TAF15	TAL1	TAL2	TBL1XR1	TCF3 (E2A)	TCL1A (TCL1)	TEC	TET1	TFE3	
TFG	TFPT	TFRC	TLX1	TLX3	TPRSS2	TNFRSF11A	TOP1	TP63	
TPM3	TPM4	TRIM24	TRIP11	TTL	TYK2	USP6	WHSC1 (MMSET or NSD2)		
WHSC1L1	YPEL5	ZBTB16	ZMYM2	ZNF384	ZNF521				



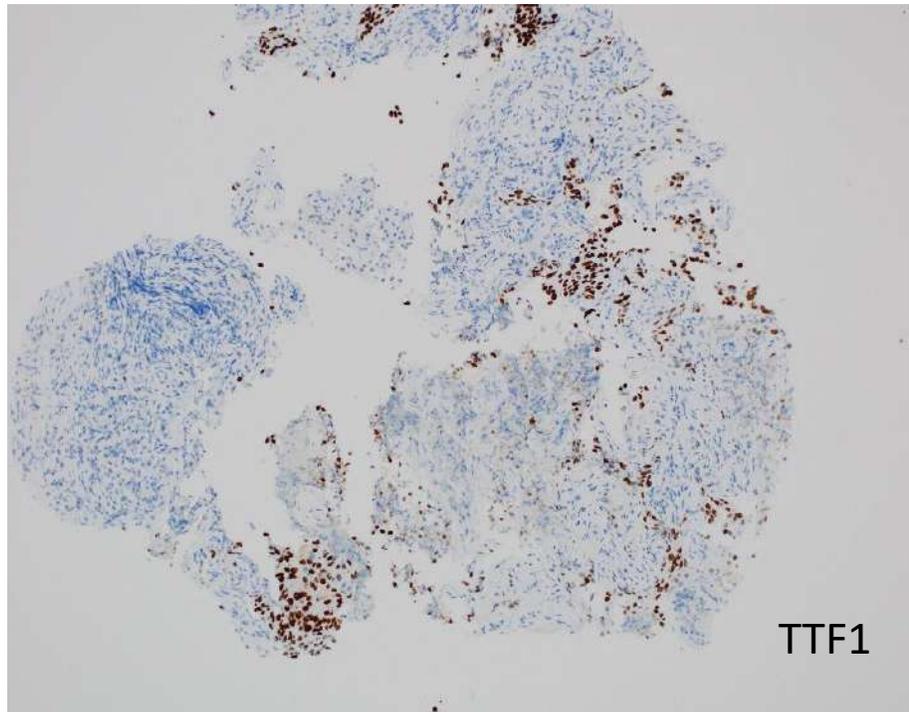
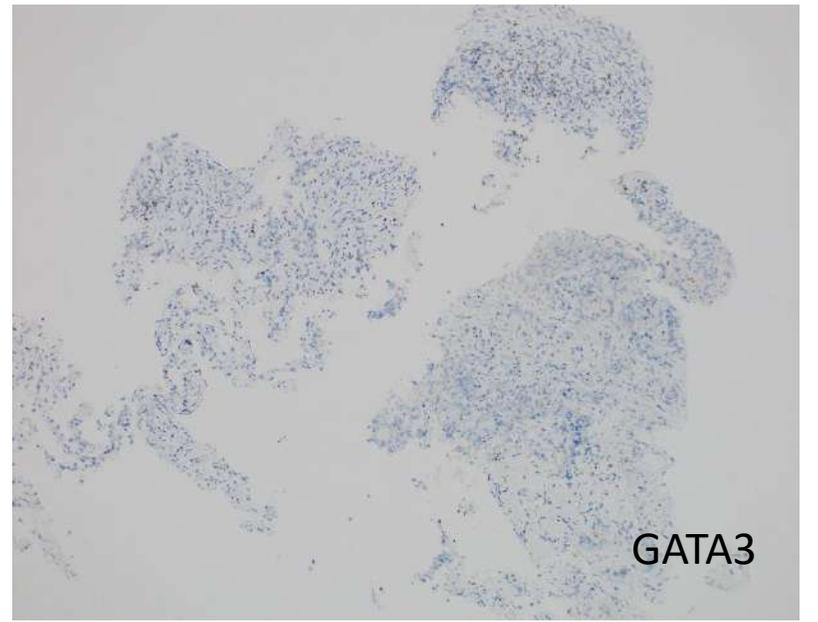
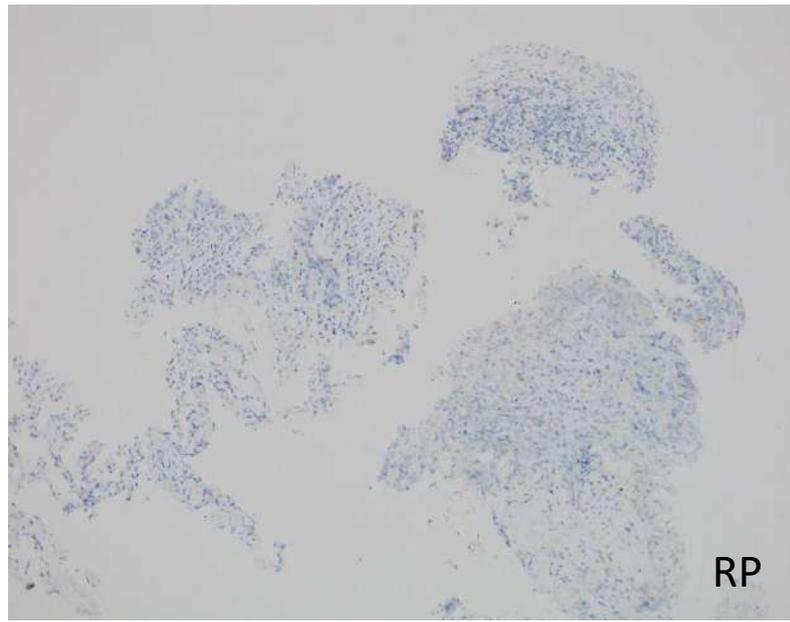
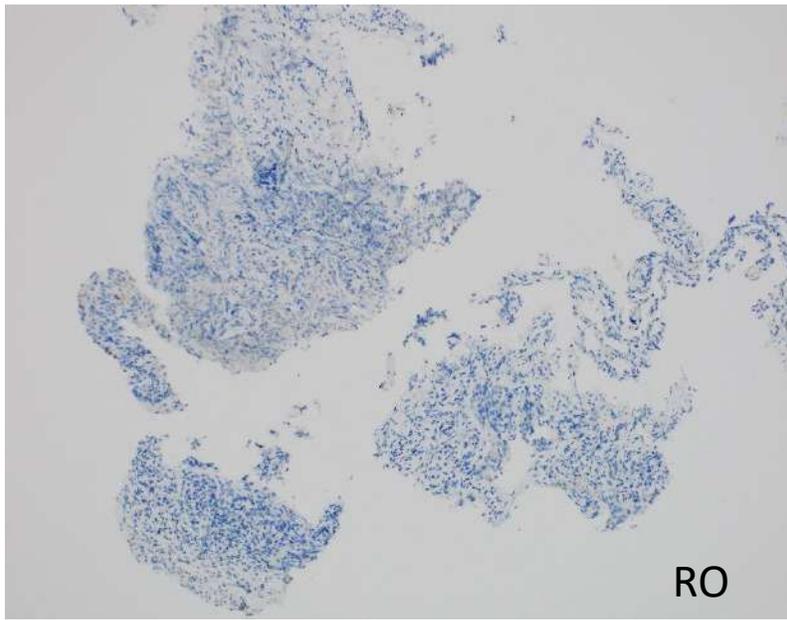
Primary pulmonary myxoid sarcoma

FISH & different sequencing approaches

Patiente 55 ans
Métastases pulmonaires ?



LM/LH/LB	FUSION	READS Counts	3'/5' imbalance	Mapped reads (>150000)	COSF	Contrôle (au moins 5/7)	Concentration ng/ μ l
LM22-1673_LH22-3138	ESR1(2) - CCDC170(2)	21	/	415644	/	7/7	0



LM/LH/LB	FUSION	READS Counts	3'/5' imbalance	Mapped reads (>150000)	COSF	Contrôle (au moins 5/7)	Concentration ng/μl
LM22-1673_LH22-3138	ESR1(2) - CCDC170(2)	21	/	415644	/	7/7	0
LM22-1673_LH22-3138 seconde analyse	WT	/	/	329 965	/	7/7	0

- **Faible concentration d'ARN et ARN fragmenté**
- reads trop élevés dans le 1^{er} run avec bruit de fond

The screenshot displays the Genexus Assay Development software interface. The main content area shows a table of fusion variants. The first variant, ESR1-CCDC170, is highlighted in blue and has a read count of 21. The table includes columns for User Classification, Variant ID, Key Variant, Locus, Genes (Exons), Read Counts, Type, Call, and Gene Isoform. The interface also features a navigation bar at the top with options like Dashboard, Samples, Runs, Results, Assays, and a search bar. The bottom of the screen shows the Ion Torrent logo and copyright information.

User Classification	Variant ID	Key Variant	Locus	Genes (Exons)	Read Counts	Type	Call	Gene Isoform
Classification *	ESR1-CCDC170.L2C2	Yes	chr6:152023140 - chr6:151857453	ESR1(2) - CCDC170(2)	21	Fusion	PRESENT	ESR1-CCDC170.L
Classification *	A2M-ALK.A22A19	No	chr12:9241796 - chr2:29448431	A2M(2) - ALK(19)	0	Fusion	ABSENT	A2M-ALK.A22A19
Classification *	ACTG2-ALK.A1A17	No	chr2:74120178 - chr2:29450538	ACTG2(1) - ALK(17)	0	Fusion	ABSENT	ACTG2-ALK.A1A17
Classification *	ACTG2-ALK.A1A19	No	chr2:74120178 - chr2:29448431	ACTG2(1) - ALK(19)	0	Fusion	ABSENT	ACTG2-ALK.A1A19
Classification *	ACTG2-ALK.A2A18	No	chr2:74128564 - chr2:29449940	ACTG2(2) - ALK(18)	0	Fusion	ABSENT	ACTG2-ALK.A2A18
Classification *	AGAP1-ALK.A6A18	No	chr2:236659132 - chr2:29449940	AGAP1(6) - ALK(18)	0	Fusion	ABSENT	AGAP1-ALK.A6A18
Classification *	ATG16L1-ALK.A2A20	No	chr2:2234164941 - chr2:29446384	ATG16L1(2) - ALK(20)	0	Fusion	ABSENT	ATG16L1-ALK.A2A20
Classification *	ATG16L1-ALK.A2ms25rs67A20	No	chr2:2234165185 - chr2:29446481	ATG16L1(2) - ALK(20)	0	Fusion	ABSENT	ATG16L1-ALK.A2ms25rs67A20
Classification *	AT1C-ALK.A7A20.COSF444	No	chr2:218191701 - chr2:29446384	AT1C(7) - ALK(20)	0	Fusion	ABSENT	AT1C-ALK.A7A20.COSF444
Classification *	ATRNL1-ALK.A19A20	No	chr10:117093929 - chr2:29446394	ATRNL1(19) - ALK(20)	0	Fusion	ABSENT	ATRNL1-ALK.A19A20
Classification *	BCL11A-ALK.B4A20	No	chr2:30689388 - chr2:29446408	BCL11A(4) - ALK(20)	0	Fusion	ABSENT	BCL11A-ALK.B4A20

Paris, 10 décembre 2022



Analyse ciblée des fusions par RNA seq dans le cancer pulmonaire non à petites cellules

Expérience d'un laboratoire (LPCE, Nice)

Paul Hofman

Laboratoire de Pathologie Clinique et Expérimentale, Université
Côte d'Azur, Nice