

## AcSé Moléculaire: Modalités pratiques pour le criblage moléculaire

### I- Récapitulatif des tests moléculaires à effectuer

Type de cancer	Transloc. <i>ALK</i>	Amp. <i>ALK</i>	Amp. <i>MET</i>	Transloc. <i>ROS</i>	Mut. <i>ALK</i>	Mut. <i>MET</i>	Mut. <i>BRAF</i>
CBNPC non épidermoïde	AMM	X	X	X			X
Cancer colorectal						X	
Cancer gastrique			X				
Cholangiocarcinome				X			X
Cancer du foie			X			X*	
Cancer du rein	X	X				X	
Cancer de la vessie							X
Cancer de l'ovaire			X				X
Cancer de la prostate							X
Cancer de la thyroïde	X				X	X	X
Glioblastome			X				
Neuroblastome		X			X		
Tumeur myofibroblastique inflammatoire	X			X			
Rhabdomyosarcome		X					X
Sarcomes		X					X
GIST							X
Mélanome - tumeur spitzoïde	X			X			AMM
Myélome multiple							X
Lymphome anaplasique à grandes cellules (ALCL)	X						
Leucémie lymphoïde chronique							X
Leucémie à tricholeucocytes							X

\* seulement pour les cancers du foie pédiatriques

### Circuits spécifiques :

- **Lymphomes anaplasiques à grande cellules** : les tests sont déjà réalisés dans le cadre de la procédure diagnostique habituelle.
- **Neuroblastomes** : les analyses seront réalisées par les 3 laboratoires qui effectuent déjà les analyses moléculaires dans le cadre de la procédure diagnostique (IGR, Curie, CLB). Les résultats d'anomalies chromosomiques seront confirmés par CGHarray, et non par FISH.
- **Glioblastomes** : En raison du pronostic de cette pathologie, il est recommandé de prescrire les analyses dès la 1<sup>ère</sup> récurrence. Les modalités d'expression de MET dans les glioblastomes étant différentes des carcinomes, les grilles de lectures proposées pour ces derniers ne s'appliquent pas (voir chap 2.3 p6). Dans le cadre de l'ANOCEF et du RENOP, une centralisation à posteriori des lames immunohistochimiques réalisées par les centres est proposée afin de dégager rapidement des critères de screening immunohistochimiques adaptés. Cette organisation doit aussi permettre d'accompagner la mise en place des tests et la réalisation de comparaisons inter-laboratoires. Ce travail est coordonné par David Meyronet :

Centre de Pathologie et Neuropathologie Est  
Hospices civils de Lyon  
Groupement Hospitalier Est  
Bat A3  
56 Boulevard Pinel, 69667 BRON  
Tél : 04 72 35 76 30

- **Myélome Multiple** : en raison de l'évolution clonale observée dans cette pathologie, il est recommandé de réaliser les analyses à partir d'un prélèvement fait lors de la dernière ou de l'avant dernière rechute. Les analyses de ce type tumoral seront centralisées sur les plateformes de Nantes et de l'APHP.
- **Tests réalisés dans le cadre du programme « biomarqueurs émergents »** : Dans le cancer du poumon, les translocations *ROS1* et les mutations de l'exon 15 de *BRAF* sont aussi recherchées dans le cadre du programme biomarqueur émergent. Les patients avec une altération de ces gènes peuvent être orientés vers les essais AcSé.

## II- Modalités pratiques pour l'étude des remaniements chromosomiques

- Les prélèvements seront pré-criblés en IHC et confirmés par FISH. L'inclusion dans AcSé pourra être envisagée pour les patients **IHC+ et FISH+**.
- Les prélèvements pourront également être pré-criblés par dosage génique et confirmés par FISH. Dans ce cas, une analyse par IHC devra confirmer la présence de la protéine.

### 2.1. Translocation d'ALK

#### ➤ Tests par IHC

<b>Anticorps disponibles</b>  <b>Remarque : les anticorps destinés à l'hématologie ne doivent pas être utilisés sur tumeurs solides</b>	Clone 5A4, commercialisé par : <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Abcam</li> <li>▪ Clinisciences</li> <li>▪ Novocastra</li> <li>▪ Leica...</li> </ul>	Validé pour les tumeurs pulmonaires
	Clone D5F3, commercialisé par : <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Roche/Ventana</li> <li>▪ Ozyme (Cell Signaling Technologies)</li> </ul>	Validé pour les tumeurs pulmonaires
<b>Contrôle positif</b>	Lignées cellulaires H2228 (variant 3), H3122 (variant 1)	Lignées avec une translocation ALK issue de tumeurs pulmonaires
<b>Seuil de positivité</b>	FISH dès qu'un signal positif est observé (>10% de cellules tumorales positives): <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Score 1+, 2+ ou 3+</li> </ul>	Attention au bruit de fond sur mucus (surtout si amplification par tyramide)

Envoi de lames blanches pour effectuer la confirmation par FISH des résultats positifs en IHC.

#### ➤ Tests par FISH

<b>Sondes disponibles</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Clinisciences</li> <li>▪ Abbott</li> <li>▪ DAKO</li> </ul>	Ces 3 sondes sont validées
<b>Seuil de positivité</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Au moins 15 % de cellules positives</li> <li>• Au moins 100 noyaux analysés, sauf en cas de prélèvements très petits ne permettant pas d'obtenir ce nombre.</li> </ul>	Remarque : on peut avoir la perte d'un signal vert pour les Sondes DAKO et Abbott ou rouge pour la sonde Clinisciences.

## 2.2. Amplification d'ALK

### ➤ Tests par IHC

<b>Anticorps disponibles</b>  <b>Remarque : les anticorps destinés à l'hématologie ne doivent pas être utilisés sur tumeurs solides</b>	Clone 5A4, commercialisé par : <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Abcam</li> <li>▪ Clinisciences</li> <li>▪ Novocastra</li> <li>▪ Leica...</li> </ul>	Ac validé pour les translocations ; pas de résultats connus en cas d'amplification d'ALK uniquement
	Clone D5F3, commercialisé par : <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Roche/Ventana</li> <li>▪ Ozyme (Cell Signaling Technologies)</li> </ul>	Ac validé pour les translocations ; pas de résultats connus en cas d'amplification d'ALK uniquement
<b>Contrôle positif</b>	Lignées cellulaires H2228 (variant 3), H3122 (variant 1)	Lignées avec une translocation ALK issue de tumeurs pulmonaires
<b>Seuil de positivité</b>	Dès qu'un signal cytoplasmique est observé (>10% de cellules tumorales positives): <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Intensité 1+, 2+ ou 3+</li> </ul>	Attention au bruit de fond sur mucus (surtout si amplification par tyramide)

Envoi de lames blanches pour effectuer la confirmation par FISH des résultats positifs en IHC.

### ➤ Tests par FISH

<b>Sondes disponibles</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Clinisciences</li> <li>▪ Abbott</li> <li>▪ DAKO</li> </ul>	Ces sondes sont validées
<b>Sondes centromériques pour distinguer une amplification focale d'une polysomie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Centromère du 2 en vert VYSIS</li> </ul>	
<b>Seuil de positivité</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Nb de copies <math>\geq 6</math> en moyenne dans 100 noyaux analysés (dans un ou plusieurs foyers de cellules marquées). Sur les petits prélèvements la moyenne peut être établie sur seulement 60 noyaux.</li> <li>▪ le ratio doit être déterminé avec une sonde centromérique mais il n'y a pas de seuil fixé pour le ratio</li> <li>▪ le nombre de cellules analysées, le Nb. de copies et le ratio doivent apparaître explicitement sur les comptes-rendus</li> <li>▪ Le nombre de cellules analysées, le nombre de copies et le ratio doivent apparaître clairement sur le compte-rendu</li> </ul>	

Pour le cancer du rein et du poumon, où il faut chercher à la fois la translocation et l'amplification d'*ALK*, une analyse en deux étapes sera effectuée :

1) Recherche de translocation avec la sonde *ALK* seule.

2) Si le nombre de copies d'*ALK* est  $\geq 6$  en moyenne sur 100 noyaux analysés, une sonde centromérique sera alors hybridée.

### 2.3. Amplification de *MET*

#### ➤ Tests par IHC

<b>Anticorps disponibles</b>	Clone SP44 Roche/Ventana	Validé dans des tumeurs pulmonaires
<b>Contrôle positif</b>	H1993	Lignée avec amplification de <i>MET</i> issue d'une tumeur pulmonaire (Kubo T et al, 2009)
<b>Seuil de positivité</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Score 2+ et 3 (diffus ou focal)</li><li>▪ <b>Glioblastomes</b> : &gt; 50% de cellules positives avec foyers de cellules d'expression modérée à forte</li></ul>	

Envoi de lames blanches pour effectuer la confirmation par FISH des résultats positifs en IHC.

#### ➤ Tests par FISH

<b>Sondes disponibles</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Clinisciences</li><li>▪ Dako</li><li>▪ Cytocell</li><li>▪ Abbott</li></ul>	Ces 4 kits sont validés
<b>Seuil de positivité</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Nb de copies <math>\geq 6</math> en moyenne dans 100 noyaux analysés (dans un ou plusieurs foyers de cellules marquées). Sur les petits prélèvements la moyenne peut être établie sur seulement 60 noyaux (à l'exception des glioblastomes).</li><li>▪ le ratio doit être déterminé avec une sonde centromérique mais il n'y a pas de seuil fixé pour le ratio</li><li>▪ le nombre de cellules analysées, le Nb. de copies et le ratio doivent apparaître explicitement sur les comptes-rendus</li><li>• Le nombre de cellules analysées, le nombre de copies et le ratio doivent apparaître clairement sur le compte-rendu</li></ul>	

## 2.4. Translocation de *ROS1*

Pour les cancers du poumon, le test sera limité aux tumeurs « triples négatives » pour limiter le nombre d'analyses (*EGFR/KRAS/ALK* WT).

### ➤ Tests par IHC

<b>Anticorps disponibles</b>	D4D6 Ozyme/ Cell signaling technologies	En cours de validation dans le cancer du poumon
<b>Contrôle positif</b>	Lignée HCC78	Lignée cellulaire avec une translocation de <i>ROS1</i> issue de tumeur pulmonaire
<b>Seuil de positivité</b>	FISH dès qu'un signal cytoplasmique est observé : <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Intensité 1+, 2+ ou 3+</li></ul>	Attention, marquage cytoplasmique non spécifique des macrophages, épithélium bronchiolaire.

Envoi de lames blanches pour effectuer la confirmation par FISH des résultats positifs en IHC. Pour les **cholangiocarcinomes** qui sont peu fréquents : envoyer tous les cas pour analyse FISH systématique.

### ➤ Tests par FISH

<b>Sondes disponibles</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Clinisciences</li><li>▪ Cytocell</li></ul>	
<b>Seuil de positivité</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Au moins 15 % de cellules positives</li><li>• Au moins 100 noyaux analysés sauf en cas de prélèvements très petits.</li></ul>	<b>Remarques:</b> <b>Sonde Clinisciences:</b> on peut avoir une perte d'un signal rouge au lieu d'une dissociation <b>Sonde Cytocell:</b> on peut avoir une perte d'un signal vert au lieu d'une dissociation

### III. Modalités pratiques pour la recherche de mutations

- Il n'y a pas lieu d'effectuer un précriblage par IHC pour les recherches de mutations.
- Les mutations devant être recherchées dans le cadre du programme de criblage AcSé Moléculaire :
  - mutations d'*ALK* : exons 23 à 25 (à l'exception des mutations de résistance avérées au crizotinib) ;
  - mutations de *MET* : exons 14 et 16 à 19, **dont les mutations du site d'épissage de l'exon 14** ;
  - mutations de *BRAF* exons 15.
- Contrôles positifs disponibles :
  - *ALK* : neuroblastomes (xenogreffes de neuroblastomes avec mutation d'*ALK*)
  - Pour *MET* : Cancers du rein papillaires avec mutation hétérozygote de *MET*.
- L'inclusion de patients dont la tumeur exprime un variant dont le caractère activateur ou la sensibilité au crizotinib ou au vemurafenib ne sont pas décrits pourra être envisagée après évaluation *in silico* du caractère activateur des mutations. Les demandes d'évaluation doivent être adressées à l'INCa selon les modalités suivantes :

#### **Modalités pratiques pour les demandes d'évaluation *in silico* du caractère activateur des mutations**

Les demandes doivent être adressées à l'INCa par la plateforme avant retour du résultat au prescripteur par mail :

**Destinataire :** [acse@institutcancer.fr](mailto:acse@institutcancer.fr)  
**Objet du mail :** Évaluation du caractère activateur d'une mutation

#### **Les informations suivantes sont nécessaires à l'évaluation :**

- Séquence nucléotidique et anomalie protéique correspondante ;
- % de cellules tumorales dans l'échantillon analysé ;
- Pour les analyses faites en NGS : scan IGV et confirmation du résultat par séquençage de Sanger si réalisé ;
- Pour les analyses faites en séquençage de Sanger : séquence du reverse ;
- Pour les mutations dans le site d'épissage, indiquer la séquence +/- 5pb autour du site consensus.



- **Critères d'éligibilité pour un patient avec une mutation d'ALK ou de MET:**

Ces critères sont applicables aux mutations identifiées dans le cadre du criblage organisé par l'INCa ainsi que pour les mutations identifiées dans le cadre de programmes pangénomiques indépendants :

		<b>ALK</b>	<b>MET</b>
<b>Mutations décrites dans la littérature comme conférant une sensibilité au crizotinib chez l'homme</b>		<u>Mutations de sensibilité connues :</u> K1062M T1087I D1091N G1128A T1151R	<u>Mutations de sensibilité connues :</u> V1110I H1112R H1124D M1149T V1206L
<b>Mutations décrites dans la littérature comme conférant une sensibilité au crizotinib <i>in vivo</i> (chez l'animal) ou <i>in vitro</i> (sur lignées cellulaires)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Inclusion possible dans les cohortes spécifiques correspondantes</li> <li>▪ Inclusion possible dans la cohorte « miscellaneous » pour les localisations tumorales n'ayant pas de cohorte spécifique</li> </ul>	I1171N F1174L/S/I F1174V R1192Q R1192P F1245C F1245V R1275Q Y1278S	L1213V/P V1238I D1246N/H/G Y1248D/H/C M1268T
<b>Mutations décrites dans la littérature comme activatrices sur la base de tests fonctionnels <i>in vitro</i> (lignées cellulaires)</b>			
<b>Mutations décrites comme associées au neuroblastome familial (ALK) ou au cancer héréditaire papillaire rénal (MET)</b>			

<p><b>Variants dont le caractère activateur ou la sensibilité au crizotinib ne sont pas décrits :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- situées dans le domaine TK</li> <li>- qui ne sont pas des polymorphismes décrits (1000 génomes)</li> <li>- faux sens ou delins en phase</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Evaluation <i>in silico</i> du caractère activateur de la mutation. <b>Les demandes d'évaluation doivent être adressées à l'INCa selon les modalités décrites ci-dessus.</b></li> <li>• Possibilité d'inclusion dans la cohorte « miscellaneous » évaluée au cas par cas</li> </ul>		
<p><b>Mutations de résistance avérées</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas d'inclusion possible</li> </ul>	<p><u>Mutations de résistance connues :</u></p> <p>I1250T  1151Tins*  L1152R*  C1156Y*  L1196M*  G1202R*  S1206Y*  G1269A*</p> <p>* : décrites sur transcrit EML4-ALK</p>	
<p><b>Polymorphismes connus</b></p>			<p>T1010I  R988C</p>
<p><b>Mutations hors du domaine kinase</b></p>			
<p><b>Mutations autres que faux sens et delins en phase</b></p>			

• **Cas des mutations sur les sites d'épissage de MET:**

Des délétions au niveau du site d'épissage de l'exon 14 de *MET* qui provoquent un saut d'exon avec maintien du cadre de lecture ont été décrites. Ces altérations sont relativement fréquentes dans les cancers du poumon. Une inclusion dans AcSé de ce type de tumeurs peut être envisagée après validation selon le même circuit que pour les évaluations *in silico*.

- **Critères d'éligibilité pour un patient avec une mutation de *BRAF* :**

Ces critères sont applicables aux mutations identifiées dans le cadre du criblage organisé par l'INCa ainsi que pour les mutations identifiées dans le cadre de programmes pangénomiques indépendants :

		<b><i>BRAF</i></b>
<b>Mutations sur le codon V600</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Inclusion possible dans les cohortes spécifiques correspondantes</li> <li>▪ Inclusion possible dans la cohorte « miscellaneous » pour les localisations tumorales n'ayant pas de cohorte spécifique</li> </ul>	<u>Mutations de sensibilité connues :</u>  V600D/E/G/K/M/R
<b>Variants décrits comme potentiellement activateurs</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inclusion possible dans la cohorte « miscellaneous »</li> </ul>	<u>Mutations décrites comme activatrices ou sensibilisantes :</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Exon 11 :</u> G466E/V G469A/V/R</li> <li>• <u>Exon 15 :</u> N581S/T G596R L597Q/R/S/V K601E</li> </ul>
<b>Autres variants dont le caractère activateur ou la sensibilité au vemurafenib ne sont pas décrits :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- situées dans le domaine TK</li> <li>- qui ne sont pas des polymorphismes décrits (1000 génomes)</li> <li>- faux sens ou delins en phase</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Evaluation <i>in silico</i> du caractère activateur de la mutation. <b>Les demandes d'évaluation doivent être adressées à l'INCa selon les modalités décrites ci-dessus.</b></li> <li>• Possibilité d'inclusion dans la cohorte « miscellaneous » évaluée au cas par cas</li> </ul>	
<b>Mutations décrites comme non activatrices</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas d'inclusion possible</li> </ul>	<u>Mutations potentiellement non activatrices sur l'exon 15 :</u>  D594G/H/N
<b>Mutations hors du domaine kinase</b>		

#### **IV. Envoi des comptes-rendus d'analyse à l'INCa**

Les comptes-rendus d'analyses anonymisés doivent être envoyés à l'INCa au moins une fois par mois selon les modalités suivantes au choix :

- Par Fax : **01 41 10 72 42**
- Par mail : [acse@institutcancer.fr](mailto:acse@institutcancer.fr)
- Par courrier :

**Charlotte Gudewicz  
Comptes-Rendus AcSé  
52 Avenue Morizet  
92513 Boulogne Billancourt**

Par ailleurs, en raison de l'anonymat, tous les comptes-rendus pour un même patient doivent être réunis lors de l'envoi à l'INCa.

Les points suivants devront impérativement être rendus illisibles avant tout envoi à l'INCa afin de garantir l'anonymat des patients :

- Nom et prénom du patient ;
- Jour et mois de naissance (laisser l'année de naissance visible pour l'âge du patient) ;
- Coordonnées du patient;
- N° d'identification du prélèvement ;
- Toute autre information pouvant permettre l'identification du patient par l'INCa.

#### **V. Conservation des prélèvements tumoraux des patients inclus dans le programme AcSé pour des programmes de recherche**

Les patients inclus dans le programme AcSé signent un consentement pour que leurs prélèvements puissent être utilisés à des fins de recherche.

- Les acides nucléiques extraits des prélèvements tumoraux des patients sont conservés par les plateformes de génétique moléculaire.
- Selon l'organisation mise en place au sein de chaque plateforme, les blocs tumoraux ayant servi à l'analyse moléculaire des patients inclus dans le programme AcSé seront conservés par la plateforme ou renvoyés au pathologiste local en le prévenant qu'ils pourront lui être redemandés pour être utilisés à des fins de recherche.