

Etude de Faisabilité d'un CARYOTYPE MOLECULAIRE sur ADN Tumoral circulant

Matching Day “Techno-Cancer”

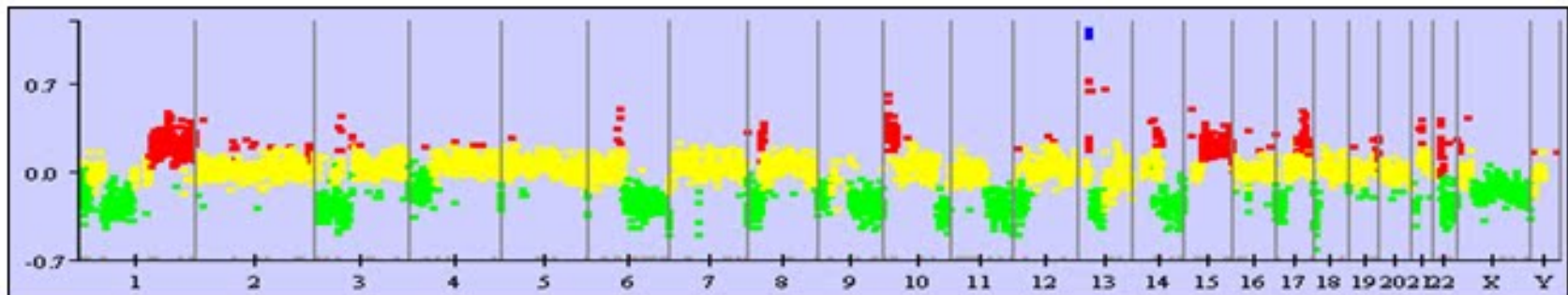
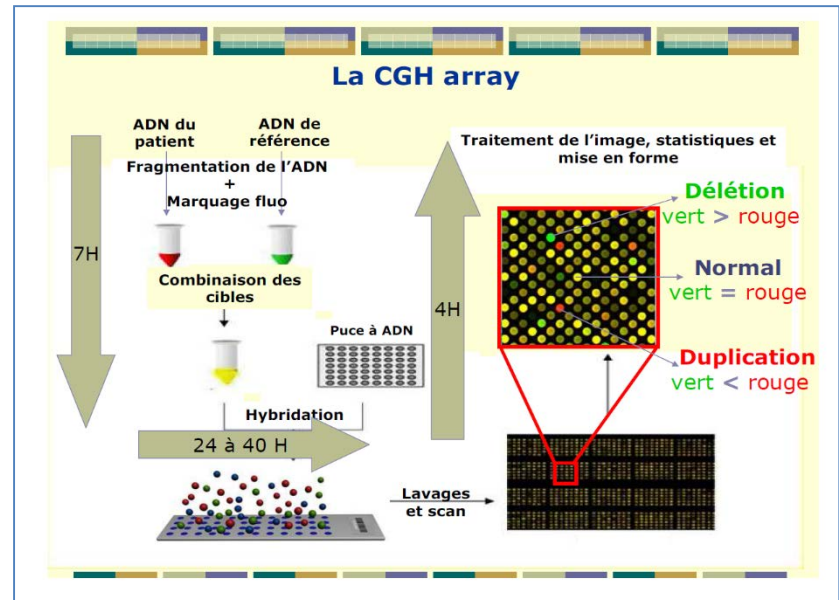
Jean CHIESA . Toulouse 14 septembre 2017

CGH arrays ou puce à ADN appliquée aux tumeurs solides

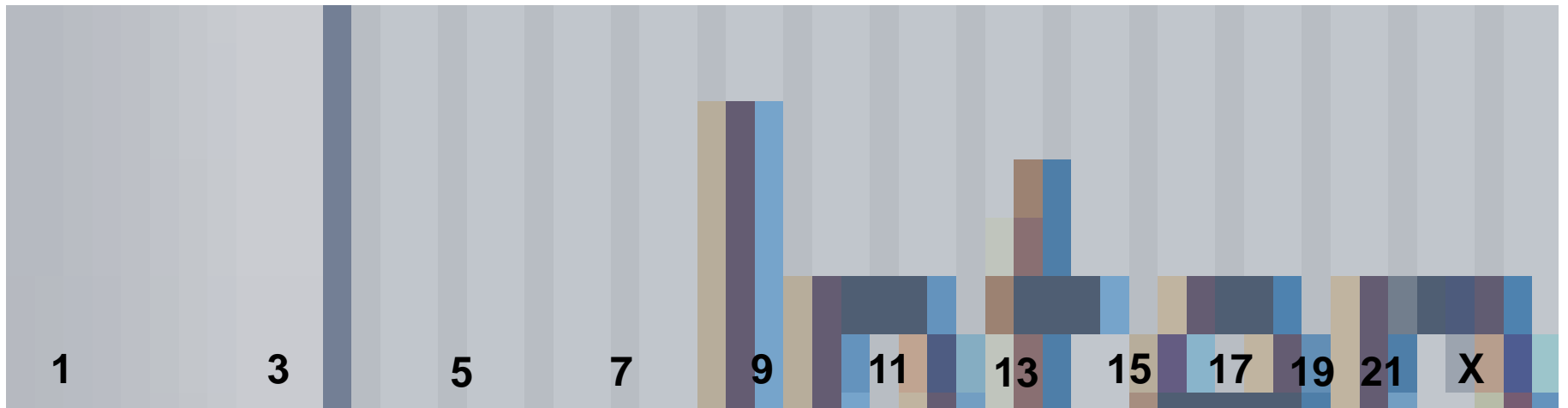
- Caryotype
Moléculaire

- Anomalie chromosomique
 - Trisomie
 - Monosomie
- Copie Number Variation (CNV)
 - Duplication génique
 - Amplification génique
 - Délétion génique
 - Polymorphisme

- Profil Génomique
 - CNV



représentation graphique du profil génomique d'une tumeur *BRCA2* (CGH-array BAC)

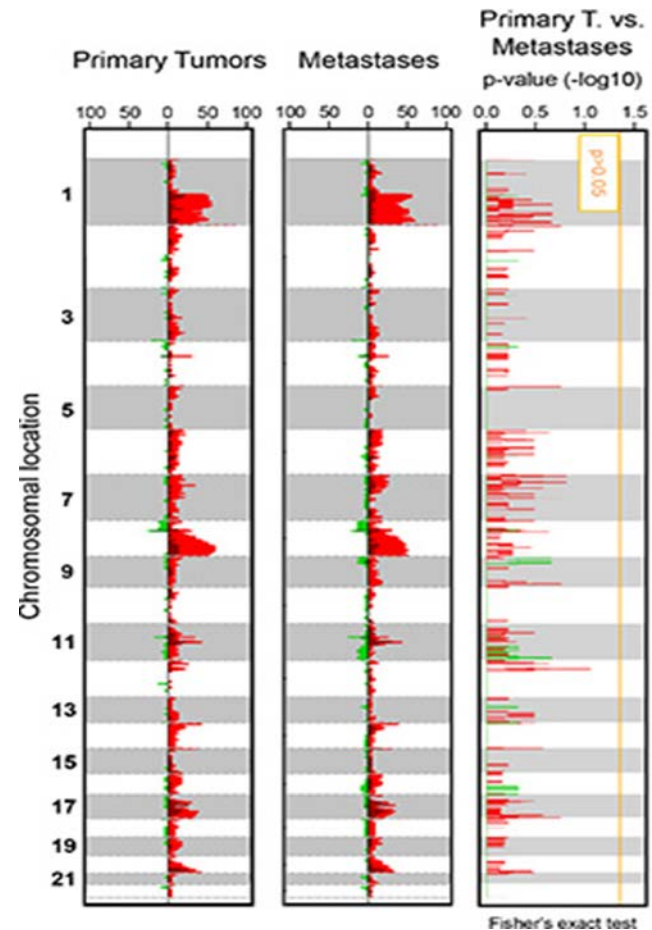


- Caryotype moléculaire

- Cancer du sein
- Cancer du colon

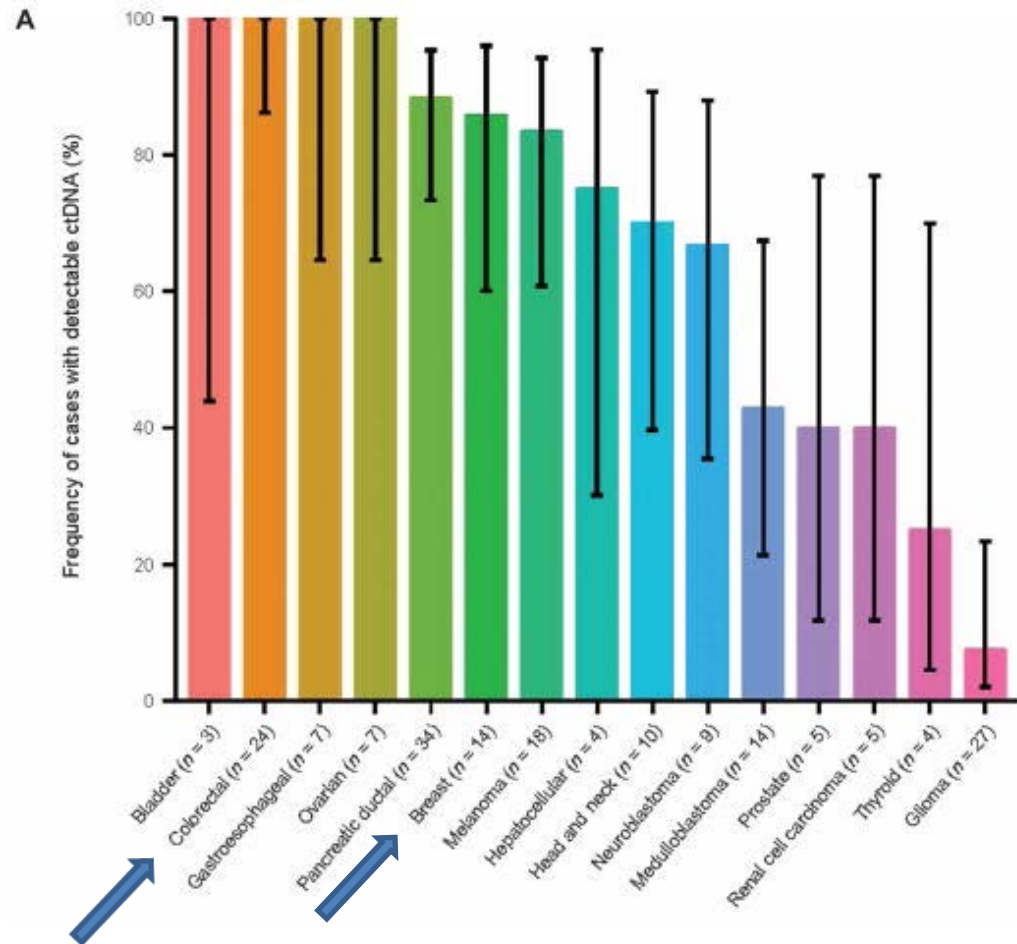
- CNV et Tumeurs solides

- Toujours présents
- Nombreux
- Complexes
 - Dérégulation multigénique
 - Multiclonalité
- +/- Spécifiques



Biopsie Liquide et ADNTumoral circulant (ADNTc)

- Acides nucléiques extra cellulaire (plasmatique)
 - Fragmenté
 - 166 nucléotides (ADNc)
 - 150 nucléotides (ADNTc)
 - 143 nucléotides (ADNFc)
 - ADNTc : 5-35 % ADN plasmatique total
 - Constant pour tous les cancers
 - 1-40 ng/ml (1000 ng/ml)
 - ½ vie : 15 mi-2 heures
 - Enzymes hépatiques
 - Cellules tumorales
 - Apoptose
 - Nécrose
 - Cellules tumorales circulantes
- Biopsie Liquide
 - Test compagnons
 - Cancer du poumon
 - EGFR ...
 - Cancer du colon
 - Mélanomes...



Caryotype moléculaire par Séquençage en Massive Parallel Sequencing

- Séquençage très haut débit
 - Echantillons patients (ADNTc)
 - Echantillons références (ADNc)
 - ADN nucléaire patients ou
 - Pool ADN plasmatique
 - 50 témoins
- Méthodologie
 - Séquençage «paired-end»
 - 2 X 75 bases
 - Evaluation du nombre de copie de séquence (CNV) par rapport à un pool d'ADN référence
- BioInformatique
 - Par chromosome
 - Calcul Z Score
 - Calcul ZZ Score
 - Calcul Bin Median
 - Calcul Other Median
 - Caryotype Moléculaire
 - Résolution < 5 Mb
 - CNV
 - Pas les translocations

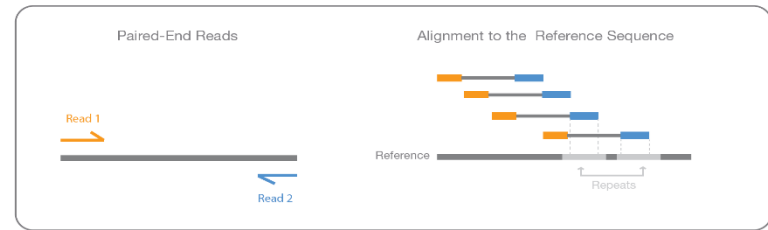
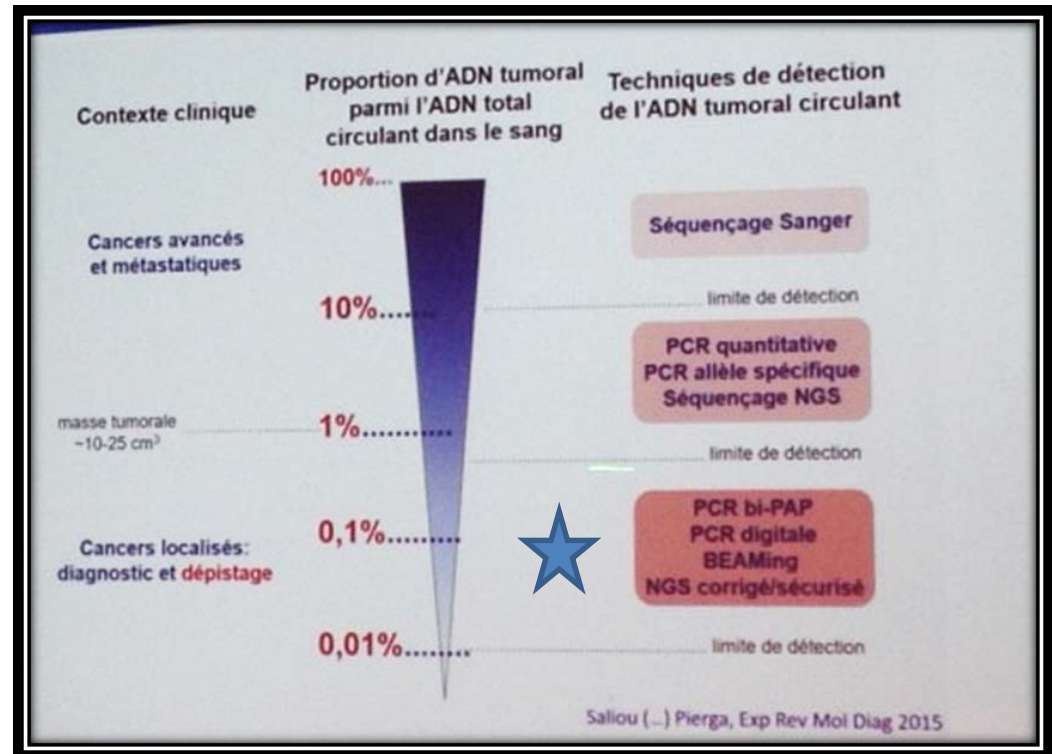


Figure 4: Paired-End Sequencing and Alignment—Paired-end sequencing enables both ends of the DNA fragment to be sequenced. Because the distance between each paired read is known, alignment algorithms can use this information to map the reads over repetitive regions more precisely. This results in much better alignment of the reads, especially across difficult-to-sequence, repetitive regions of the genome.



Identification d'un Cancer Pré Symptomatique sur ADNTc

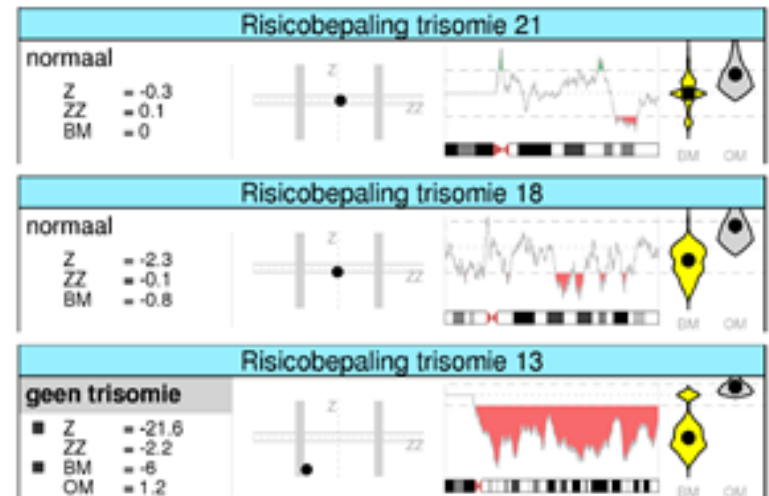
- Presymptomatic Identification of Cancers in Pregnant Women During Noninvasive Prenatal Testing. *Joris Robert Vermeesch et al. JAMA Oncol . 2015.*
 - Cancer de l'ovaire
 - Lymphome folliculaire
 - Lymphome de Hodgkin
- Non-invasive detection of genomic imbalances in Hodgkin/Reed-Sternberg cells in early and advanced stage Hodgkin's lymphoma by sequencing of circulating cell-free DNA: a technical proof-of-principle study. *Peter Vandenberghe 2015.*
 - Etude prospective sur 7 lymphomes de Hodgkin
- Cancer Genome Scanning in Plasma Detection of Tumor-Associated Copy Number Aberrations, Single-Nucleotide Variants, and Tumoral Heterogeneity by Massively Parallel Sequencing. *K.C. Allen Chan, Clinical Chemistry 2013.*
 - 4 cancers hépatiques
 - 1 cancer du sein et de l'ovaire

Incidental Finding of maternal Multiple Myeloma During Non Invasive Prenatal *Assises de Génétique Lyon 3-5 février 2016*

- Consultation 21 juillet 2015
 - Mme REY... Ca...(Luxembourg)
 - 40 ans G1P0
 - Indications du DPNI
 - Age maternel
 - ATCD +21 familial
- Principe du D P N I
 - Dépistage : +13, +18 et +21
 - Sang maternel
 - ADN foetal circulant
 - Nouvelle Génération Séquenceur
 - Massive parallel sequencing
- Résultat
 - Pas de résultat interprétable

Resultaten niet-invasieve prenatale test (NIPT)^{1,2}

Test kwaliteit	Std dev	Aantal fragmenten		Foetale fractie		Geslacht foetus
		Netto totaal	Chr Y	Chr X	Chr Y	
niet geslaagd	8.27	7.281.503	953	19.03%	4.27%	man



Andere autosomen

• Caryotype Moléculaire

– Complexe

- Trisomie 1q
- Trisomie 3
- Trisomie 6p
- Monosomie 13
- Délétion interstitielle 14q
- Trisomie 15q
- Monosomie 22

– Cancer

– Myélome Multiple

• ADN Tumoral circulant

– Caryotype foetal

- Normal 46,XY
 - Elias né 17 12 2015

– Patiente asymptomatique

- IRM normale
- Myélogramme
 - 20 % plasmocytes
- Biologie Normale mais
 - Pic chaîne légère lambda
 - » 212 mg/l

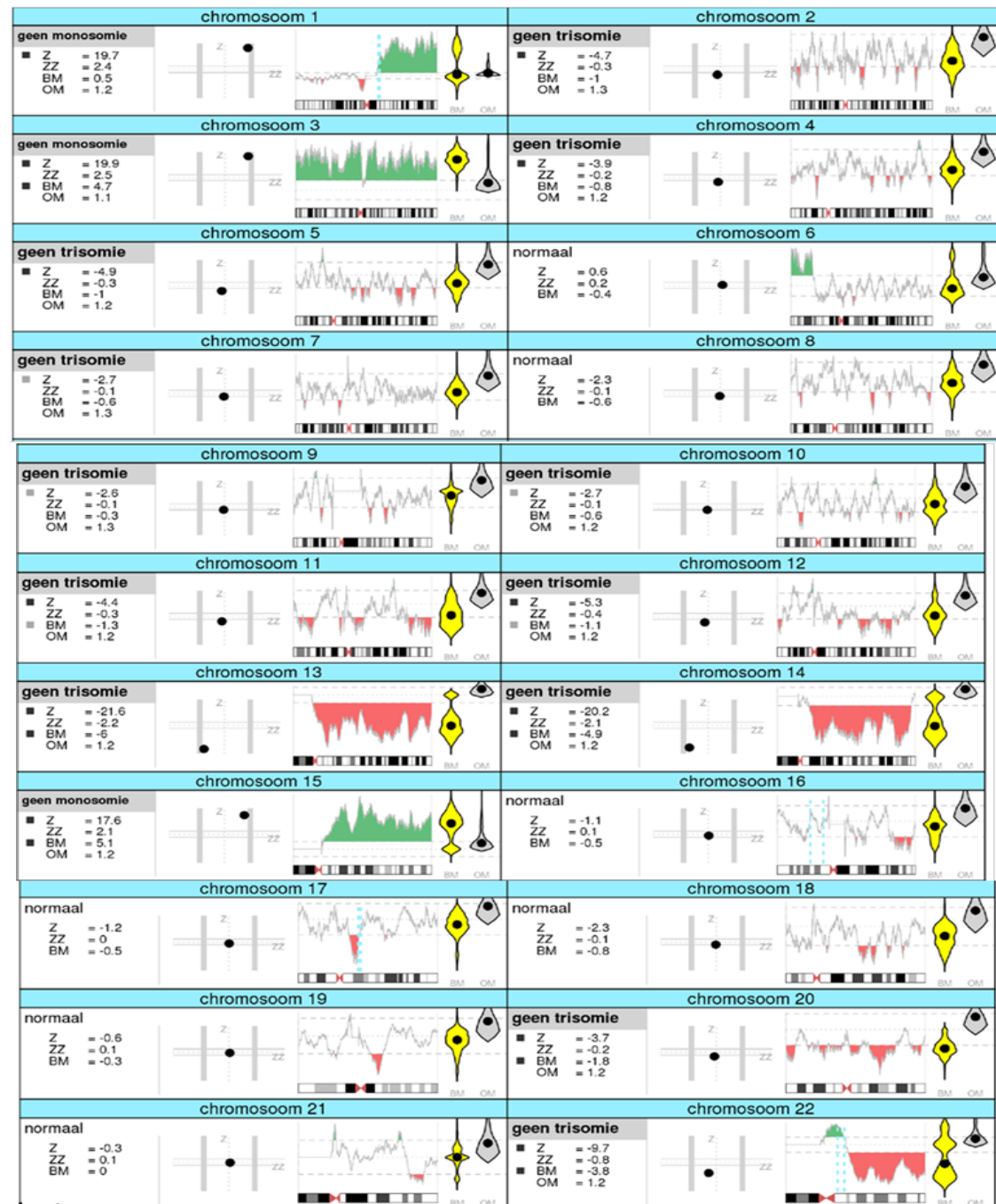
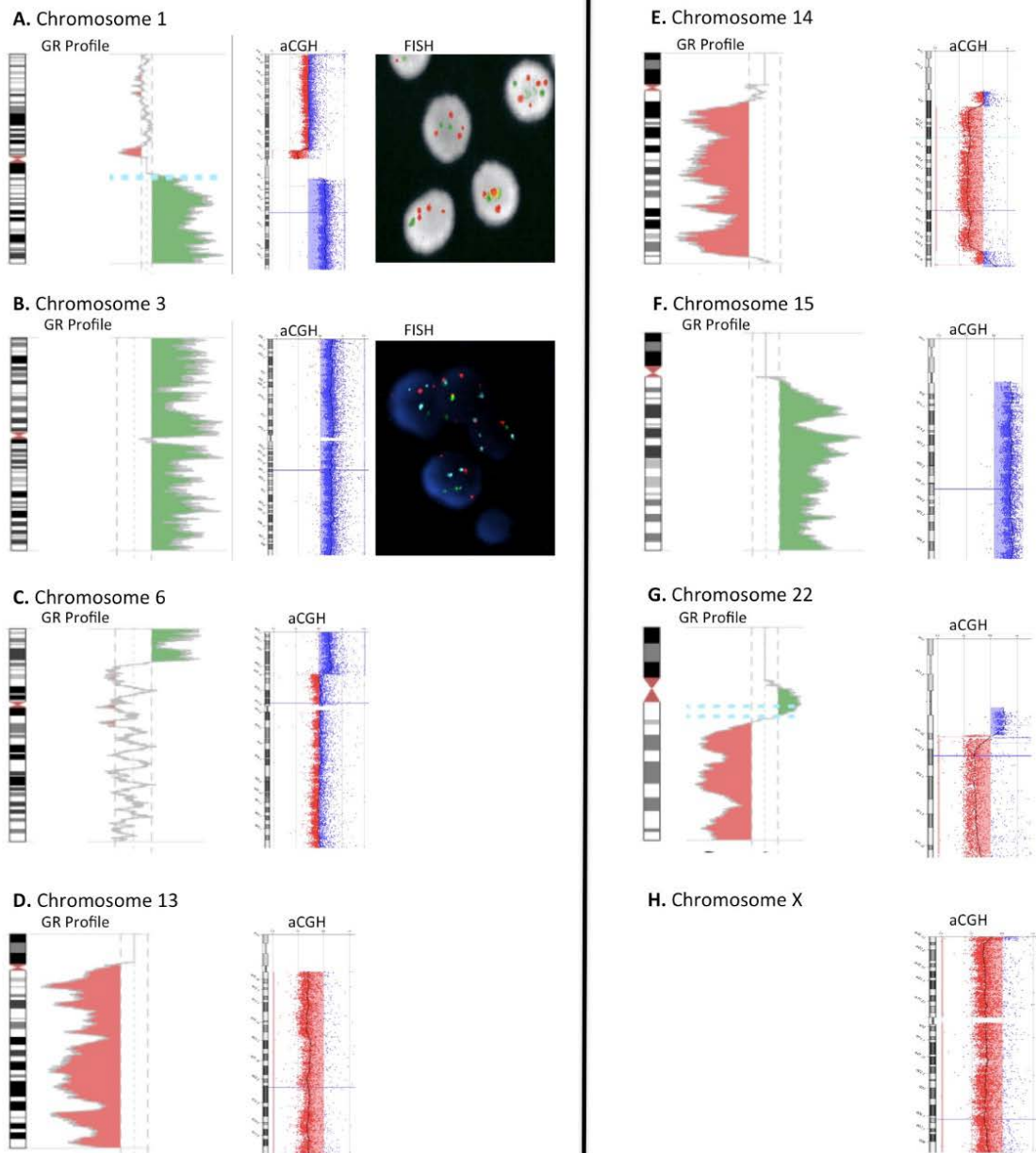
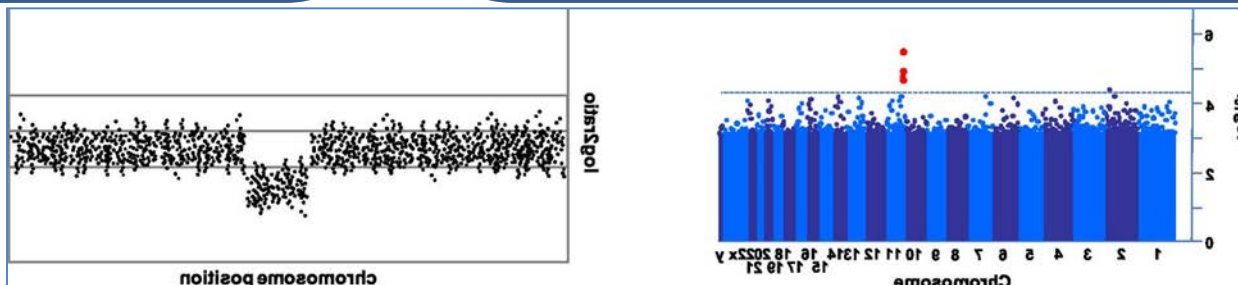
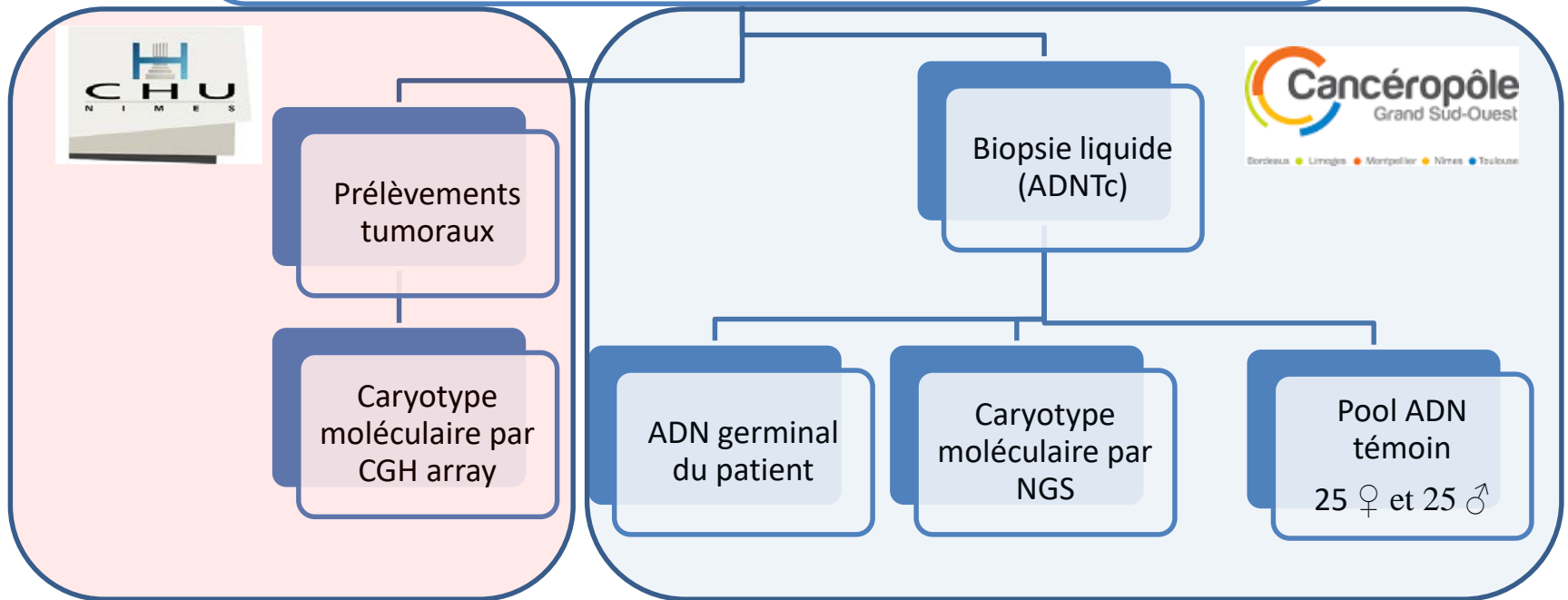


Figure 1. Genome Representation (GR) Profile, Microarray based Comparative Genomic Hybridization (aCGH) and Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) on CD138+ sorted bone marrow (BM) plasma cells of patient.



Méthodologie de l' Etude

Cancer sein et colon
Au diagnostic
histologie:CCI(sauf in situ),C lieberkünien



Objectifs de l' Etude

Cancer du Sein/colon au diagnostic

Objectif Principal

- Etude de Faisabilité NGS
 - Caryotype Moléculaire
 - Massive Parallel sequencing
 - ADNTc (biopsie liquide)
- Critères d'évaluation
 - Vérification de l' ADNTc
 - Dosage (> 7 ng/ml)
 - Sizing « *in silico* » : 150 nucléotides
 - Présence de CNV acquis
 - 90 % des cas

Objectif Secondaire

- Comparaison des Profils Génomiques Tumoraux
 - Profil Génomique ADNTc
 - Profil Génomique tumoral
- Critères d'évaluation
 - Présence /absence de CNV acquis
 - Eventuelle discordance
 - Comparaisons des résultats obtenus

Originalité et Caractère Innovant

Caryotype Moléculaire sur ADNTc

Test Générique de Dépistage, de Diagnostic et de Suivi du Cancer

Réalisation d'un séquençage du génome humain à partir d'ADN circulant

- Plate Forme Génotypage Très haut débit
 - Illumina : HiSeq 4000 ou plus ...
- Banque ADN plasmatique
 - Extraction, dosage (6ng) : Echantillon et témoin
 - Préparation banque ADN pour séquençage « paired end »
 - Dosage librairie PCR quantitative
- Séquençage 25 M paires : 3, 75 Gb de séquences
 - Dosage équimolaire des banques indexées
- Méthode analyse bio-informatique et bio statistique
 - Génération Caryotype Moléculaire

Test Dépistage Précoce du Cancer

- Signature Moléculaire du Cancer
 - Constante
 - Précoce
 - Spécifique d'un type de cancer
- ADNTc (biopsie liquide)
 - Caryotype moléculaire
- Populations à Risque
 - Les cancers fréquents
 - cancer du sein > 50 ans
 - Cancer du colon > 50 ans
 - Cancer prostate > 60 ans
 - Cancer du col de l'utérus
 - Population avec une prédisposition héréditaire aux cancers
 - Cancer du sein BRCA

- Atlas de Profil Moléculaire des Cancers

