

PROJET STIC 2005

Accès aux analyses moléculaires
prédictives de réponse aux inhibiteurs de
tyrosine kinase en oncohématologie

Coordonnateur : Pr Claude PREUDHOMME

Introduction

- ❖ Initialement : ensemble TK activé en oncohématologie (exception FGR1)
 - ❖ Retenu : « que cible thérapeutique » = sensible GLIVEC
-
- ⇒ BCR-ABL = LMC + LAL
 - ⇒ ckit = LAM (CBF) + mastocytose
 - ⇒ NUP-ABL = LAL T
 - ⇒ PDGFR α = HES
 - ⇒ PDGFR β = « SMP »

Les acteurs

Equipes	Etablissement associé	Montant du projet sur 2 ans	Montant délégué 2005-2006 (MIGAC)	Cibles
D. Bories,	Hôp. H Mondor	70 000	64 435	BCR-ABL (LMC) + PDGFR α
JM. Cayuela,	hôp. St Louis	70 000	64 435	BCR-ABL (LMC + LAL)
E. Macintyre	Hôp. Necker	20 000	18 410	NUP-ABL + PDGFR α
H. Cave	Hôp. R Debré	20 000	18 410	NUP-ABL
C. Preudhomme, P. Devos	CHRU Lille	327 000	301 004	BCR-ABL (LMC) + PDGFR α + cKit (LAM)
A. Thurau	CHRU Poitiers	33 333	30 683	BCR-ABL (LMC)
FX. Mahon	CHRU Bordeaux	50 000	46 025	BCR-ABL (LMC) + PDGFR β
JP. Magaud	Hospices Civils de Lyon	33 333	30 683	BCR-ABL (LMC + LAL)
J. Chiesa	CHRU Nîmes	24 000	22 092	BCR-ABL (LMC)
P. Dubreuil	Institut Paoli Calmette	70 000	64 435	cKit (mastocytose)
MP. Gaub	CHRU Strasbourg	33 000	30 377	BCRABL (LMC)
	total	750 666	690 988	

⇒ 1ère réunion de mise en place en décembre 2005 regroupant les différents acteurs et définition de leur responsabilité dans le projet

STIC BCR-ABL

LMC

Avec résistance aux ATK :

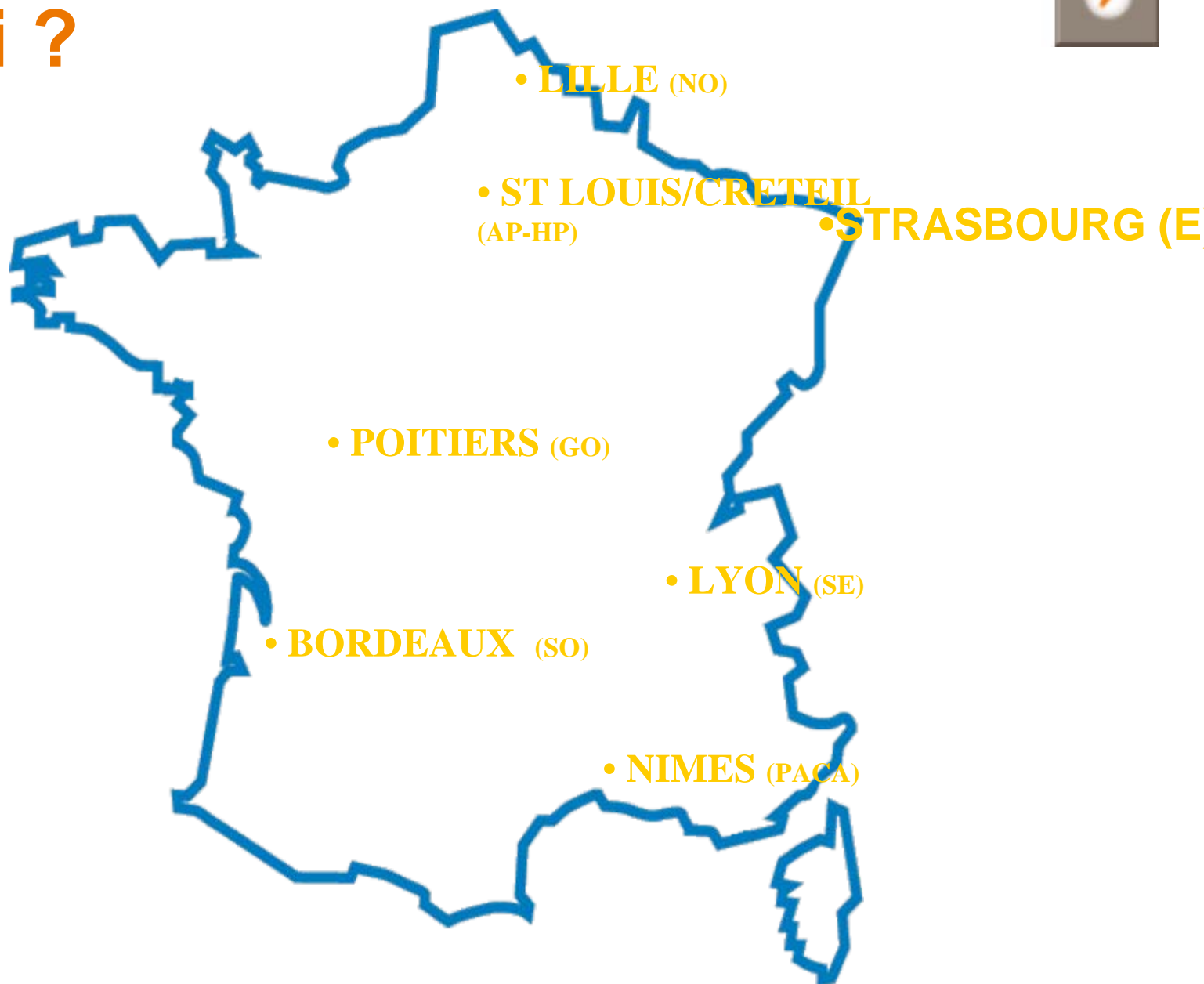
Recherche mutations ABL

Claude Preudhomme

Objectifs

- Évaluer de manière exhaustive la fréquence des mutations en fonction du type de résistance observée.
- Évaluer l'évolution clinique selon le statut muté/non muté, le type de mutation et en fonction des traitements reçus.

Par qui ?



BCR-ABL (LMC)

- ❖ Demande de moyen que pour « mutation » et suivi, mais pas pour standardisation BCR-ABL (STIC 2000)
- ❖ 8 Laboratoires impliqués
 - Technique réfèrente (séquençage : OK)
 - Autres techniques en évolution :
 - * DGGE
 - * DHPLC
 - * ASO : T315I
 - Mise en place d'un contrôle de qualité

Premier test : mai 2006

Deuxième test : prévu septembre 2006

Résultat : - OK pour 6/8

- * Un labo : pas de grand résultat, difficulté technique
- * Un labo : absence de détection d'une mutation

Recueil et analyses des données médicales

❖ Enregistrement des données biologiques et cliniques sur base Fi LMC (Medcost)

- Base créée, validée, activée (17 dossiers saisis)
- Très grande implication collègues cliniciens : P.Rousselot/S.Corm
- Lien important avec registre ELN (transfert informatique)

❖ Clinique : difficile car

- Nombreuses nouvelles possibilités
 - * nouveaux inhibiteurs +++
 - * greffe, IFN, seule ou association

Conclusion : (P.Devos) ⇒ suivi cohorte

ARC (1/2 temps ⇒ C.Frimat) depuis mars 2006

Qui rentrer dans la base STIC ?

- Patients LMC séquencés
(mutés ou non mutés)
- Avec résistance ATK telle que définie
par le consensus LeukemiaNet
(résistance + réponse sub-optimale)

Critères de résistance (1)

TIME	FAILURE	SUBOPTIMAL RESPONSE	WARNINGS
Diagnosis	NA	NA	<ul style="list-style-type: none"> - High risk - Del9q+ - Additional chromosome abnormalities (ACA) in Ph+ cells
3 months	<ul style="list-style-type: none"> - No hematologic response (HR) (stable disease or disease progression) 	<ul style="list-style-type: none"> - Less than Complete HR (CHR) 	
6 months	<ul style="list-style-type: none"> - Less than Complete HR (CHR) - No cytogenetic response (CgR) (Ph+ more than 95%) 	<ul style="list-style-type: none"> - Less than Partial CgR (PCgR) (Ph+ more than 35%) 	
12 months	<ul style="list-style-type: none"> - Less than PCgR (Ph+ more than 35%) 	<ul style="list-style-type: none"> - Less than Complete CgR (CCgR) 	<ul style="list-style-type: none"> - Less than major MolR (MMolR)
18 months	<ul style="list-style-type: none"> - Less than CCgR 	<ul style="list-style-type: none"> - Less than MMolR 	
Any time	<ul style="list-style-type: none"> - Loss of CHR (1) - Loss of CCgR (2) - Mutation (3) 	<ul style="list-style-type: none"> - ACA in Ph+ cells (4) - Loss of MMolR (4) - Mutation (5) 	<ul style="list-style-type: none"> - Any rise in transcript level - Other chromosome abnormalities in Ph-cells

Critères de résistance (2)

- **Résistance primaire**

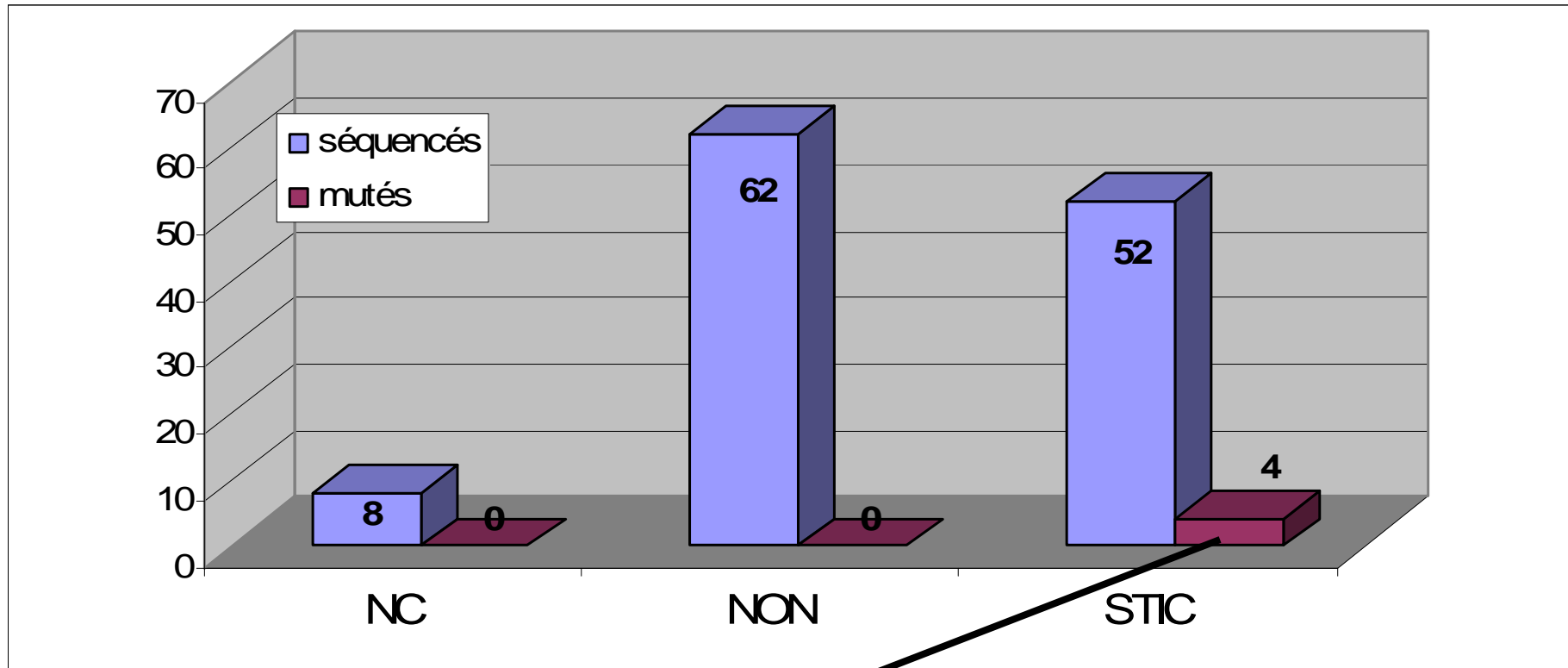
- Hématologique : absence RCH M3
- Cytogénétique :
 - absence RCyP M6
 - Absence RCyC M12
- Moléculaire : MRD > 1% à M12 et/ou > 0.1% à M18

- **Résistance secondaire**

- Hématologique : rechute (+ accélération/transformation)
- Cytogénétique : perte de la réponse ou évolution clonale
- Moléculaire : + 0.5 log confirmé à 1 mois d'intervalle

Patients du Spirit

SPIRIT : 122 séquençages / 82 patients réalisés à partir des données de RQ-PCR



Type de résistance

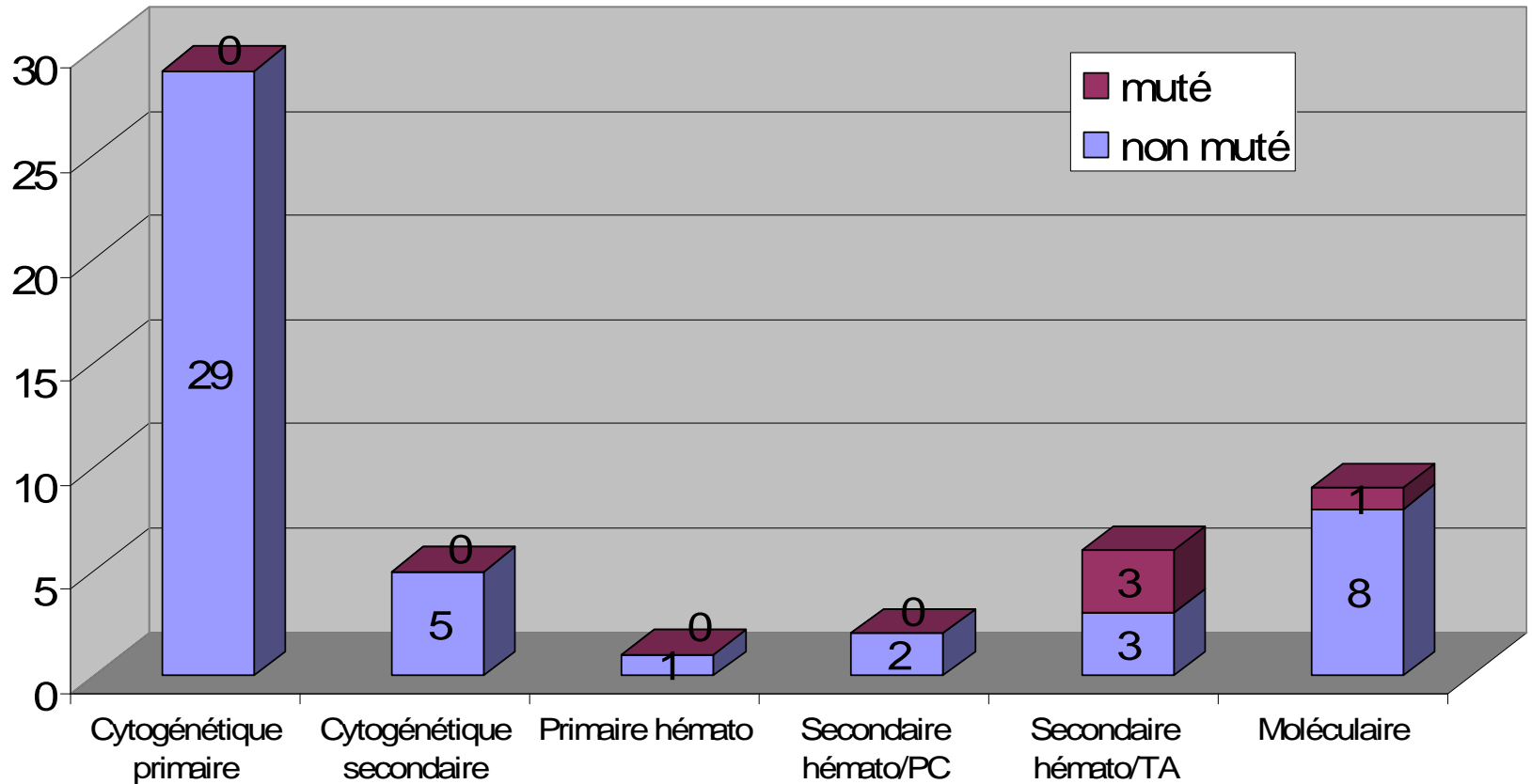
- F317L
- E255K
- L384M
- E373K

→ Secondaire hémato (PA, TAL, TAM)

→ Primaire moléculaire

Patients « STIC »

Détail des résistances



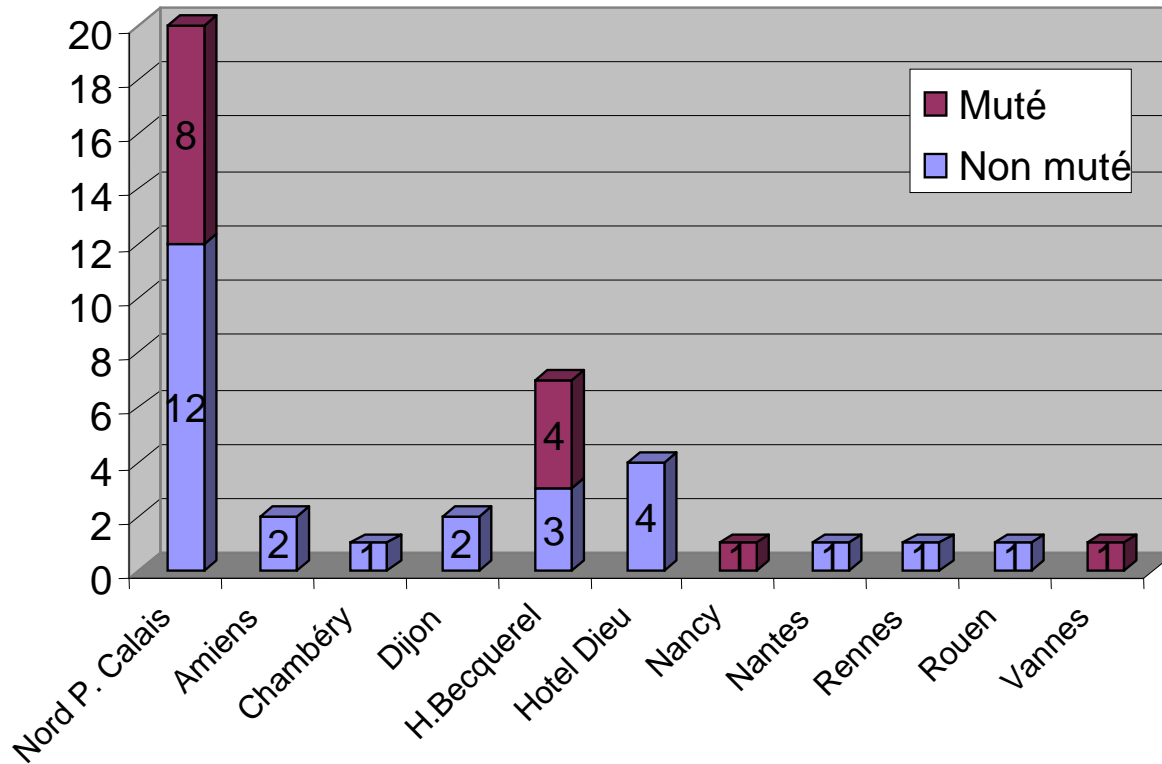
Attention : TAL ⇒ faire séquençage sur moelle

Séquençages faits à Lille en 2006

Situation au 30/06/06

Lille - 30/06/2006

- 43 séquençages
- 14 (33%) patients mutés
 - T315I (3), L248V (1), Y253H (1), E255K (1) = 6
 - M244V (4), L384M (1), T394 (1), F359V (3), I418V (1) = 10



Séquençage fait à Saint-Louis en 2006

53 patients séquencés:
8 patients mutés

Nature des mutations

	Mutations en AA	Mutations en nt	Nombre de patients
Pour les patients LMC	D276G	A881G	1
	L384M	C1204A	1
	F359I + E255K	T1129A + G817A	1
	M351T	T1106C	2
	S348C	C1367G	1
	G250E	G803A	1
	M244V	A784G	1
	F359C	T1130G	1
Pour les patients LAL	E255V	A818T	1
	T315I	C998T	1
	G250E	G803A	1
	Y253H	T811C	1
Pour les patients AFRO7	F317L + H396R	C1005A + A1241G	1
	E255K	G817A	1
	T315I	C998T	1
Pour les patients "absence d'information clinique"	G250E	C803T	1

Nîmes

- 15 séquençages demandés
- 4 résultats « non muté » rendus
- 11 séquençages en cours dont :
 - 2 ayant révélé une positivité (Y253F et Y253H)
 - 2 douteux sur Y253F

Service	rescripteur	Date de naissance	Date de réception	Extraction	Mutation détectée	Commentaire
HUS Strasbourg	MARCAIS	19/12/1963	02/01/2006	Sang	∅	
HUS Strasbourg	MALOISEL	01/05/1956	17/01/2006	Moelle	∅	
HUS Strasbourg	MALOISEL	08/03/1938	01/02/2006	Sang	L248V	nt 889 C-->G
HUS Strasbourg	MALOISEL	19/10/1941	02/02/2006	Sang	311I +T31578 T->A+	nt 1091
HUS Strasbourg	AME	19/06/1958	27/02/2006	Sang	∅	
HUS Strasbourg	FOHRER	28/06/1974	02/03/2006	Moelle	∅	
HUS Strasbourg	MALOISEL	06/04/1953	02/03/2006	Sang	E355G	nt 1211A->G
HUS Strasbourg	MALOISEL	20/03/1981	08/03/2006	Sang	∅	
HUS Strasbourg	LIU	18/11/1925	13/03/2006	Sang	M244V	nt 877 A->G
HUS Strasbourg	MALOISEL	08/01/1921	05/04/2006	Sang	∅	
HUS Strasbourg	MALOISEL	18/03/1940	05/04/2006	Sang	∅	
HUS Strasbourg	MALOISEL	06/04/1981	10/04/2006	Sang	∅	
HUS Strasbourg	CLAVIER	22/11/1973	12/04/2006	Sang	∅	
HUS Strasbourg	MALOISEL	24/10/1941	20/04/2006	Sang	∅	
Centre Hospitalier Régional Metz	GUIBAUD	11/04/1978	26/04/2006	ARN (sang)	∅	
CHU Nancy	SCHMITT	05/06/2003	26/04/2006	cDNA (moel	∅	
CHU Nancy	WITZ	01/10/1959	11/05/2006	cDNA (sang	∅	
Centre Hospitalier Emile Muller Mulh	HENON	23/05/1954	22/06/2006	cDNA (sang	∅	

Lyon

N° Pvt	Date de Prélèvement	date du séquençage	Diagnosti c	Date de naissance	Nature de la mutation	Provenance	Medecin
M899a	05/01/2006	16/01/2006	LMC	05/12/1955	M244V	HEH	E5
M084d	23/01/2006	30/01/2006	LMC	24/11/1925	F486S	HEH	Dr NICOLINI
M933a	13/02/2006	28/02/2006	LMC	12/08/1927	E255K	HEH	Dr NICOLINI
M934b	21/06/2006	28/02/2006	LAL Phi1+	26/03/1981	T315I	CHU Clerm	Dr MOLUCON
M976a	01/11/2005	26/04/2006	LMC		F359V	CHU de N	Pr RAYNAUD
M993a	15/05/2006	23/05/2006	LAL PHI+	13/12/1970	E255K	C H CLERF	Dr DERENZIS
M804b	12/06/2006	27/06/2006	LMC	08/05/1925	D276G	CHU Clerm	Dr TOURNILHAC
M501g	12/06/2006	11/07/2006	LMC	07/10/1955	T315I	HEH	Dr TRONCY
M671b	04/07/2006	11/07/2006	LMC	28/06/1934	Y253H	HEH	Dr NICOLINI
M923a	06/02/2006	06/02/2006	LMC	01/12/1948	<10-4 ech	CHU de N	Dr LEGROS

Poitiers

NOM	Prénom	Date de naissance	Type de résistance (1)	Date du (ou des) prélèvement(s)	Présence ou absence de mutation	Nom de la mutation (2)
AUDOIN	Alain	28/01/1953	R1 Imatinib	29/05/2006	Présence	V379I
BAAZIZ	Abdelfateh	27/12/1968	R1 Imatinib	03/02/2006	Présence	L248V
BATY	Gilbert	17/11/1941	R1 Imatinib +R1 Dasatinib	22/02/2006, 31/05/2006	Présence	M351T
BERTON	Pierrette	11/09/1942	R1 Imatinib *	01/02/2006	Présence	NS
FEREC	Robert	21/09/1929	R1 Imatinib	04/01/2006	Présence	H396R
FILLIAU	Marie-Suzanne	21/04/1928	R1 Imatinib	13/06/2006	Présence	E255K
GUILLET	Véronique	08/03/1964	R1 Imatinib	20/02/2006	Présence	NS
LE BERT	Ginette	21/07/1941	R1 Imatinib +R1 Dasatinib	23/01/2006, 13/03/2006 et 04/05/2006	Présence	V379I + T315I
LEHERPEUR	Sylvie	23/05/1964	R1 Imatinib +R1 Dasatinib	23/02/2006 et 18/05/2006	Présence	NS
LEYRAT	Lucien	26/06/1936	R1 Imatinib +R1 Dasatinib	29/05/2006	Présence	NS
LOPEZ	Georges	04/07/1936	R1 Imatinib	08/03/2006	Présence	NS
MAUNOURY	Jeanine	10/08/1946	R1 Imatinib	18/05/2006	Présence	NS
MIRVENARD	Corinne	27/08/1958	R1 Imatinib *	06/02/2006	Présence	NS
MOLLIER	Carole	08/08/1964	R1 Imatinib	17/01/2006	Présence	F359V
MONNIER	Christophe	23/10/1968	R1 Imatinib	12/06/2006	Présence	Y253H + E255K
POUEZARD	Gabrielle	28/06/1927	R1 Imatinib	13/06/2006	Présence	H396R
ROSE	Mauricette	26/02/1948	R1 Imatinib +R1 Dasatinib	31/01/2006 et 24/04/2006	Présence	NS
SEGUIGNES	Jackie-Louis	12/01/1947	R1 Imatinib	27/02/2006	Présence	M244V
SOYER	Jean-loup	01/11/1953	R1 Imatinib *	08/02/2006 et 17/05/2006	Présence	M244V
VIDAL PEREZ	José	07/07/1938	R1 Imatinib	22/03/2006	Présence	NS

(1) R1 : résistance primaire et R2 : résistance secondaire, R1 Imatinib * : suivi moléculaire de moins de 1 an

(2) NS : mutation détectée par DGGE avec un pourcentage d'allèles BCR-ABL muté faible, non caractérisé par séquençage direct

Créteil, Henri Mondor

91 Demandes entre janvier et juin 2006

33 prélèvements étaient mutés

Mutations (77 patients différents)
H396R(5x)
F317L(x6)
Y253H(x3)
Q252H(x2)
T315I(x3)
M351T(x3)
M244V(3x)
E255K(8x)
F359I(3x)
F359C(x1)
Q252H(2x)
G250E(1x)

MUTATIONS

CHU de Bordeaux

25 demandes de recherche de mutations

Provenance

Nice	3
Toulouse	2
Monaco	2
Grenoble	1
Limoges	2
Bordeaux	15

8 patients sont mutés (244, 253, 315, 255,388,459)

Conclusion sur LMC

- ❖ Personnes et plateaux techniques opérationnels depuis plusieurs mois
- ❖ Harmonisation des techniques (primers identiques)
- ❖ Contrôle de qualité mis en place
- ❖ Base de recueil opérationnelle et saisie en cours (17 patients)
- ❖ Développement technique spécifique T315I
- ❖ ARC formé et très impliqué
- ❖ Nombre de patients testés : 387
- ❖ Nombre de patients mutés : 93

Leucémie Aiguë Lymphoblastique

- ❖ Technique idem LMC
- ❖ Recueil de données ⇒ GRAAPH
- ❖ Nombre de patients étudiés limité mais démarrage depuis quelques mois protocole récent
- ❖ GRAAPH : 15 patients dont 4 mutés et 5 mutations
- ❖ AFR07 : 17 patients dont 3 mutés et 5 mutations

Accès aux analyses prédictives de réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinases - STIC 2006

JM CAYUELA - Laboratoire Central d'hématologie, hôpital Saint-Louis
BILAN au 1/9/06
BCR-ABL

Recherche des mutations BRC ABL depuis 01/01/06

Nombre d'analyses effectuées : 163 dont 3 contrôles de qualité

Nombre de patients différents : 90

Nombre d'analyses en cours de validation : 14 LMC, 2 LAL et 6 AFRO7

Diagnostic	PATIENTS DIFFÉRENTS ANALYSÉS : 90		ANALYSES EFFECTUÉES : 163			
	Nombre	Nombre de mutations	Nombre de mutations	Absence de mutation détectable	Echec d'amplification	En cours
LMC	56	9	18	53	12	14
LAL	15*	4	5	10	3	2
AFRO7	17	3	5	20	9	6
Absence d'information clinique	2	1	1	2		

* dont GRAAPH = 10

Accès aux analyses prédictives de réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinases - STIC 2006

JM.CAYUELA - Laboratoire Central d'hématologie, hôpital Saint-Louis -
BILAN au 1/9/06
NUP214-ABL1

Laboratoires participant

Laboratoire d'hématologie. Pr E.Macintyre, Hôpital Necker-Enfants-Malades, Paris.

Laboratoire de biochimie génétique. Dr H.Cavé, Hôpital Robert Debré, Paris.

Laboratoire d'hématologie. Dr JM.Cayuela, Hôpital Saint-Louis, Paris.

Nombre et origine des patients analysés au diagnostic.

	NEM	RDB	SLS	Total
EORTC 58951				118
FRALLE 2000				56
FRALLE autre (93, 89, 87)				61
GRAALL (pilote et 05)				50
LALA 94				21
Interfant				2
Protocole inconnu				112
Patients hors protocoles				21
Total	118	169	164	441

Base de donnée

Excel

Comparaison des techniques RT-PCR et FISH.

		RT-PCR		
		+	-	NF
FISH	+	6	1	0
	-	2	79	8
	NF	23	311	11

On observe une concordance des techniques de RT-PCR et de FISH dans 85 sur 88 cas, soit 96.6 % des cas.

Les discordances sont les suivantes :

patient positif en FISH et négatif en RT-PCR. La positivité du FISH était limitée à une population minoritaire de cellules (6%).

2 patients positifs en RT-PCR et négatifs en RT-PCR. Les 2 présentaient une fusion E31/A2

Fréquence des transcrits NUP214-ABL

32 patients positifs sur 441 patients analysés, soit 7.4 %

20 patients expriment aussi HOX11L2, 7 patients HOX11, 5 groupe génétique non précisé

PDGFR α

- ❖ Application aux HES (pathologie rare)
- ❖ MEE : FiP-PDGFR α si +, sensible +++ ITK
- ❖ Technique : RT-PCR
FISH
RQ-PCR (en cours d'évaluation)
- ❖ Réunions en janvier et juin 2006
3 labos : Lille, Necker, Créteil H.Mondor

❖ Mise en place contrôle de qualité entre les 3 laboratoires (échanges patients positifs et négatifs : 43 échantillons)

❖ Conclusion : RT-PCR = RQ-PCR (pas de faux + ou -)

Retombée : évite le problème de contamination
outil MRD mais peu prélèvement

Nombre de cas étudiés positifs

	N	+	%
Lille	90	5	6
Necker	52	3	6
Créteil	ND	ND	ND

Retombées médico-économiques

❖ Evaluation économique en cours

❖ Evaluation médicale

- Pas de recueil de données médicales initialement prévu
- Incitation à déclarer l'ensemble des cas étudiés dans le Résopil (coordonnée L.Prin)
- Recueil donnée clinique : type de traitement et réponse de l'ensemble des cas analysés à Lille (Steven Richebourg)

⇒ **Questions :**

Traitement des patients FIP+ et réponse

Traitement des autres patients et réponses obtenues

Conclusion : le criblage moléculaire est-il indispensable ?

C-KIT

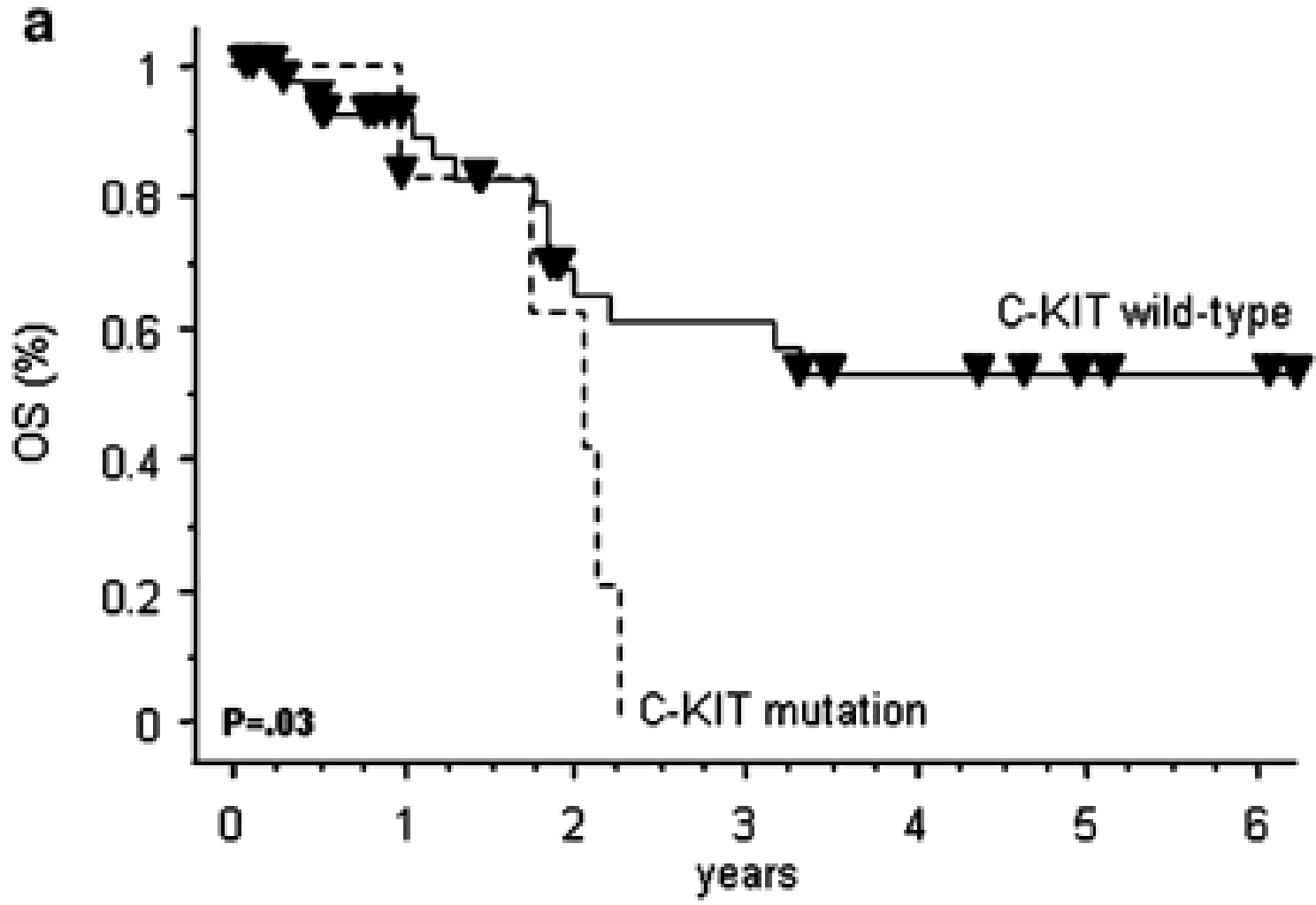
- ❖ Impliquer dans 2 pathologies rares
 - LAM (CBF)
 - Mastocytose
- ❖ Approche méthodologique un peu différente
 - Séquençage complet (mastocytose) mais plus souvent D816
 - Criblage plus cible LAM (exon 17 et exon 8)
- ❖ Mastocytose : 1 seul centre (P.Dubreuil)
 - Biopsie cutanée ou moelle osseuse : 76
 - Incidence mutation : 72 % identique au 600 autres patients étudiés depuis 4 ans
 - Corrélation physiopathologie/génotype en cours
 - Séquençage complet : 0

Perspectives fin 2006 : - Protocole mastocytose: 80-100 prélèvements

- Séquençage complet : 20
- Aussi sensible peau/MO : moins traumatisant

Table 1 Incidence of RTK and *Ras* gene mutations in patients with CBF-AML

	<i>All patients</i>	<i>t(8;21)</i>	<i>inv(16)/t(16;16)</i>	<i>P-value</i>
Patients (N)	103	56	47	
<i>c-Kit</i> mutations	16/96 (17%)	6/50 (12%)	10/46 (22%)	0.27
exon 8	12	3	9	
D816	4	3	1	
<i>FLT3</i> mutations	8/103 (8%)	5/56 (9%)	3/47 (6%)	0.72
ITD	1	1	0	
D835	7	4	3	
RTK mutations	22/97 (23%)	10/51 (20%)	12/46 (26%)	0.48
<i>Ras</i> mutations	21/97 (22%)	4/50 (8%)	17/47 (36%)	0.001
N- <i>Ras</i>	17/97 (18%)	2/50 (4%)	15/47 (32%)	
K- <i>Ras</i>	5/97 (5%)	2/50 (4%)	3/47 (6%)	
RTK and/or <i>Ras</i> mutations	39/93 (42%)	13/47 (28%)	26/46 (57%)	0.006



F

Recherche des mutations de cKit D816 et D419 dans les LAM CBF

Matériel utilisé : DNA ou RNA

Techniques utilisées :

Exon 8 : séquençage

: analyse de fragment (ABI 3130)

Exon 17 : séquençage

; RFLP HinfI (ou PleI) et BsmalI

C-KIT (LAM CBF)

2 centres LILLE \Rightarrow centre ALFA + ELAM02

REIMS \Rightarrow centre GOELAMS (transfert 10 KE LILLE
 \Rightarrow REIMS)

Lille - 18 recherches de mutations exon 8 et 17

dont 4 positifs \Rightarrow * 2 D816V

* 2 EXON 8

Perspectives

- ❖ Etude systématique toutes LAM CBF(50/an) du protocole CBF en cours d'activation
- ❖ Lien avec thérapeutique : essai en cours de finalisation (N.Boissel)

Patients analysés :Reims

➤ Analyse rétrospective des LAM CBF du protocole LAM 2001

	LAM 2001 nbre total de LAM CBF	Patients récupérés	Patients analysés
Inv(16)	69	20	8 dont 2 D419
t(8;21)	30	16	11 dont 1 D816V

➤ Analyse prospective des patients du GOELAMS inclus dans le protocole CBF soit 40 patients/an (3 ans) départ en 2006

PDGFR β

- ❖ Cible très rare
- ❖ Recherche implication : FISH
- ❖ Caractérisation : RT-PCR (PDGFR α -TEL)
- ❖ 1 centre : Bordeaux
 - Mise au point (sonde NC-Cross)
 - Mise à disposition sonde commerciale (09/06) en cours de validation
 - 8 demandes d'examens
 - 3 patients positifs : tous TEL-PDGFR α

Conclusions

- ❖ Toutes les cibles sont activées
- ❖ Pas de difficulté méthodologique
- ❖ 3 CQ réalisés
- ❖ Médico-économique en cours
- ❖ Difficultés :
 - Certains centres ne disposent pas encore de leur budget (Bordeaux)
 - Différence coût projet et disponibilité (MIGAC)
 - Recueil données cliniques : $\frac{1}{2}$ arc