

## FICHES À DESTINATION DES ÉQUIPES MULTIPLI

Le programme *Multipli* est le premier projet pilote de la mesure 5 du plan *France médecine génomique 2025* à être mis en œuvre. Il a pour objectif principal d'identifier et lever les verrous technologiques, cliniques et réglementaires bloquant la mise en œuvre du séquençage tumoral à haut débit (NGS, *Next generation sequencing*) dans la prise en charge systématique des patients atteints d'un cancer. Par là-même, il a vocation à valider le saut technologique permettant de passer, en routine, d'un profilage génétique tumoral ciblé sur un panel de gènes à un profilage génétique tumoral fondé sur le séquençage à haut débit de l'exome tumoral (WES, *Whole exome sequencing*) et du transcriptome tumoral (RNASeq).

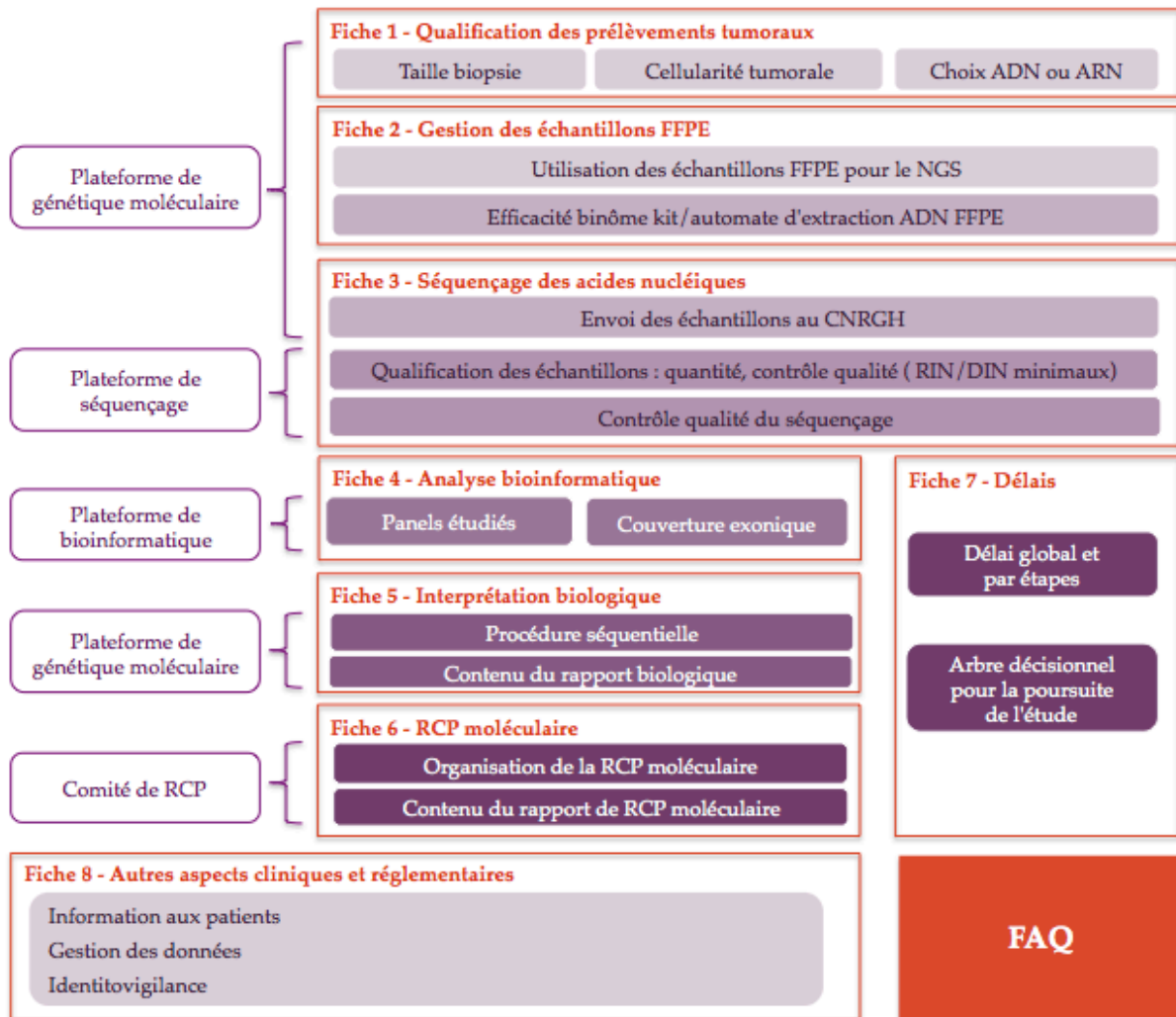
La valeur ajoutée d'un tel séquençage à haut débit proposé à des patients en 1<sup>re</sup> ligne de traitement résultera de sa capacité à :

- détecter les altérations de gènes de panels cibles avec une sensibilité raisonnable ;
- identifier de nouvelles anomalies génétiques actionnables ou susceptibles d'apporter, dans un avenir proche, de nouvelles indications de prise en charge ;
- être réalisé chez un grand nombre de patients ;
- être réalisé dans un délai compatible - 7 semaines - avec la durée du traitement de 1<sup>re</sup> ligne.

Des travaux préliminaires ont permis au comité de pilotage de *Multipli* de rédiger les procédures nécessaires au bon déroulement de cette analyse génomique à haut débit puis de lancer une évaluation en situation réelle pour en évaluer la robustesse. À l'issue de cette évaluation, 30 verrous ont pu être identifiés et levés, autorisant ainsi le démarrage du programme *Multipli*.

Les **Fiches à destination des équipes *Multipli*** présentent les principaux enseignements tirés de ces travaux préalables et les recommandations de pratique qui en découlent. En complément des SOP/MOP spécifiques au programme *Multipli*, elles viennent attirer l'attention des équipes sur les écueils de l'analyse génomique à haut débit dans le cadre du programme. Une version détaillée des travaux préliminaires dont sont issues ces recommandations est également disponible.

## CONTENU DES FICHES



## FICHE 1 - QUALIFICATION DES PRÉLÈVEMENTS TUMORAUX

L'analyse des génomes tumoraux est réalisée sur des biopsies pratiquées au moment du diagnostic ou, en cas de non-disponibilité de matériel archivé, sur une nouvelle biopsie.

### Taille de la biopsie

Dans le cas des sarcomes des tissus mous (essai *Multisarc*), en l'absence d'échantillon congelé, les prélèvements tumoraux sont obtenus par biopsie échoguidée ou guidée par scanner.

→ Afin de garantir une quantité suffisante d'acides nucléiques, toute nouvelle biopsie est pratiquée avec un trocart de biopsie de **calibre 18 G** au minimum. Au moins **3 échantillons** sont prélevés.

### Cellularité tumorale

L'anatomopathologiste de la plateforme de génétique moléculaire labellisée par l'INCa évalue la cellularité tumorale des biopsies (pourcentage de cellules tumorales dans un échantillon, hors zones de nécrose) sur coupe au cryostat pour les tissus congelés ou sur coupe au microtome pour les échantillons conservés en paraffine.

→ Une cellularité tumorale trop faible peut constituer un obstacle à la détection de certaines mutations. Un échantillon est qualifié lorsque sa cellularité tumorale est **supérieure ou égale à 30 %**. Cette valeur est **reportée** dans le **compte-rendu d'analyse** de la séquence.

### Choix ADN ou ARN

L'analyse de transcriptome est réalisée sur des ARN extraits d'échantillons tumoraux congelés. Deux échantillons par patient sont nécessaires, l'un pour l'extraction de l'ARN, l'autre pour l'extraction de l'ADN. Il est cependant possible qu'un seul échantillon soit disponible, ou qu'un seul des deux échantillons soit qualifié (cellularité tumorale > 30%).

→ Si un **seul échantillon** est qualifié, l'extraction de l'**ADN** est privilégiée.

→ Si les **deux échantillons** sont qualifiés, celui ayant la **cellularité tumorale la plus élevée** est utilisé pour l'extraction de l'**ARN**.

## FICHE 2 - GESTION DES ÉCHANTILLONS FFPE

### Utilisation des échantillons FFPE pour le NGS

Les échantillons biopsiques tumoraux conservés en paraffine (FFPE, *Formalin-fixed paraffin-embedded*) constituent une ressource importante pour l'identification des modifications à l'œuvre dans le processus cancéreux et sont utiles au diagnostic et à l'évaluation du pronostic des patients. Cependant, le mode de conservation en FFPE et le type de protocole d'extraction FFPE utilisé peuvent impacter à la fois la qualité des acides nucléiques extraits et la détection des altérations génétiques. Or une grande majorité des échantillons tumoraux des patients participant à l'essai *Acomplis* (cancer colorectal métastaté) seront conservés en FFPE.

→ À condition d'utiliser un protocole de **type Maxwell** et sous réserve de l'obtention d'un **DIN (DNA Integrity Number) suffisant**, les échantillons FFPE **peuvent être inclus** dans l'étude *Multipli* et devraient donner des résultats de séquençage exploitables.

### Efficacité du binôme kit/automate pour l'extraction des ADN FFPE

Durant l'évaluation en situation réelle, un problème de qualité est survenu pour des ADN extraits d'échantillons FFPE à l'aide du kit AS1450-Maxwell® RSC DNA FFPE utilisé avec l'automate Maxwell®RSC. Des tests ont permis de mettre en cause le binôme kit/automate.

→ Il est essentiel de **vérifier systématiquement l'efficacité des binômes kits d'extraction d'acides nucléiques/automate** avant le lancement de toute activité de séquençage à haut débit.

→ Il n'y a **pas d'obstacle méthodologique** à ce que deux plateformes de *Multipli* utilisent des **kits d'extraction différents**. La plateforme équipée de l'automate Maxwell®16 utilisera le kit Maxwell®16 FFPE Plus LEV DNA Purification, tandis que la plateforme équipée de l'automate Maxwell®RSC utilisera un kit Custom dont la chimie est similaire à celle du kit LEV.

## FICHE 3 - SÉQUENÇAGE DES ACIDES NUCLÉIQUES

### Envoi des échantillons au CNRGH

→ Les tubes portent **deux étiquettes** :

- le numéro d'identification du patient (ID-patient) ;
- le code barre CNRGH attribué à l'échantillon.

→ Les échantillons d'un même patient sont envoyés **de façon groupée** (notamment, pas d'envoi d'ADN constitutionnel sans ADN tumoral).

→ Les échantillons sont accompagnés de la **fiche de transfert des prélèvements**, exportée par le *data manager* à partir de l'outil de traçabilité, portant les données suivantes :

- le numéro de la plateforme,
- l'ID-patient,
- le sexe du patient,
- le code-barre fourni par le CNRGH,
- le numéro d'échantillon,
- le type d'acide nucléique,
- le tissu source (congelé ou FFPE),
- la quantité et la concentration d'acide nucléique dans l'échantillon,
- la date d'envoi.

→ Pour que les échantillons parviennent au CNRGH le vendredi au plus tard, et ne restent pas en transit le week-end en cas de retard dans le transport, les échantillons sont envoyés des plateformes **au plus tard le mercredi de chaque semaine**.

### Qualification des échantillons

Un contrôle qualité quantitatif et qualitatif des échantillons est réalisé par la plateforme de séquençage du CRNGH dans les 24 heures qui suivent leur réception.

→ La quantité minimale d'acide nucléique nécessaire pour conduire un séquençage d'exome ou un RNASeq dans l'étude *Multipli* est de 200 ng. Pour permettre un contrôle qualité des acides nucléiques et faire face à l'échec éventuel d'un premier essai, chaque échantillon doit

contenir **au minimum 500 ng** d'acides nucléiques à une concentration comprise entre **10 ng/μl et 30 ng/μl**.

→ La qualité des acides nucléiques est estimée notamment à partir de l'analyse de la taille des fragments d'ADN ou d'ARN dans l'échantillon, qui permet de déterminer leur DIN (*DNA Integrity Number*) ou leur RIN (*RNA Integrity Number*). Un ADN ou un ARN est de bonne qualité quand il possède un DIN ou un RIN > 7.

Pour l'étude *Multipli*, les valeurs de RIN suivantes déterminent l'entrée des ARN en séquençage :

	RIN < 5,5	5,5 < RIN < 6,0	RIN ≥ 6
Séquençage	Non	Au cas par cas	Oui

## Contrôle qualité du séquençage

	ADN constitutionnel	ADN tumoral
Couverture globale	60 X	120 X
Métriques de qualité		
Duplicats		< 30 %
Profondeur	> 30 X pour 80 % des bases	> 60 X pour 80 % des bases > 120 X pour 50 % des bases
% On Target		> 75 %

La **couverture** globale est un **élément-clé** de la qualité du séquençage. Elle correspond au nombre de fois où l'exome entier est couvert par l'ensemble des *reads* produits. Pour l'**ARN tumoral**, une mesure indirecte de la couverture est le nombre de séquences produites, fixé pour Multipli à **90 millions de reads** par échantillon.

Les **duplicats** résultent de l'amplification multiple de mêmes fragments d'ADN lors de la phase de PCR précédant le séquençage. Un pourcentage de duplicats trop élevé (> 30 %) traduit une représentation insuffisamment diversifiée des différents *reads* à séquencer.

La **profondeur** de séquençage par base traduit le nombre de *reads* non dupliqués couvrant une base à une position d'ADN donnée. Elle peut varier de base en base.

Le **pourcentage On Target** représente la proportion de *reads* s'alignant sur la région génomique d'intérêt (ADN contenu dans les exons codants), parmi l'ensemble des *reads* s'alignant sur l'ADN de référence (certains *reads* s'alignant sur des régions non codantes).

## FICHE 4 - ANALYSE BIOINFORMATIQUE

### Panels étudiés

- **Multipli** : 90 gènes d'intérêt immédiat, cibles des molécules proposées dans l'essai *Multipli* ;
- **Cancer Gene Census**<sup>1</sup> : 616 gènes connus pour être impliqués dans la cancérogenèse, permettant éventuellement d'orienter les patients vers d'autres protocoles de recherche clinique ;
- **Anomalies incidentes germinales** : 59 gènes « de prédisposition » recommandés par l'ACMG (*American College of Medical Genetics and Genomics*) ;
- **Polymorphismes constitutionnels** connus pour être associés à un risque plus élevé de **toxicité médicamenteuse** (avec un niveau de preuve 1A et 1B sur le site PharmGKB<sup>2</sup>).
- **ARN tumoral** : transcrits de fusion potentiellement oncogéniques.

Les données sont **filtrées, hiérarchisées, annotées et connectées** au sein de l'outil d'analyse tertiaire *genVarXplorer* développé par la plateforme de bioinformatique de l'Institut Bergonié et adapté à l'étude *Multipli*.

### Couverture exonique

Durant l'évaluation en situation réelle, des mutations connues de l'exon 2 du gène *KRAS* n'ont pas été détectées dans des échantillons FFPE. Des tests ont montré un déficit de couverture de certains exons, au niveau constitutionnel comme au niveau tumoral.

→ Ce risque de mauvaise couverture d'un ou plusieurs gènes nécessite de **notifier** les informations concernant **la couverture des 90 gènes Multipli** avant toute interprétation des séquences ainsi que dans le compte-rendu biologique. Le **graphique** de ces données de couverture par gène et par patient figure en **page d'accueil de genVarXplorer**.

---

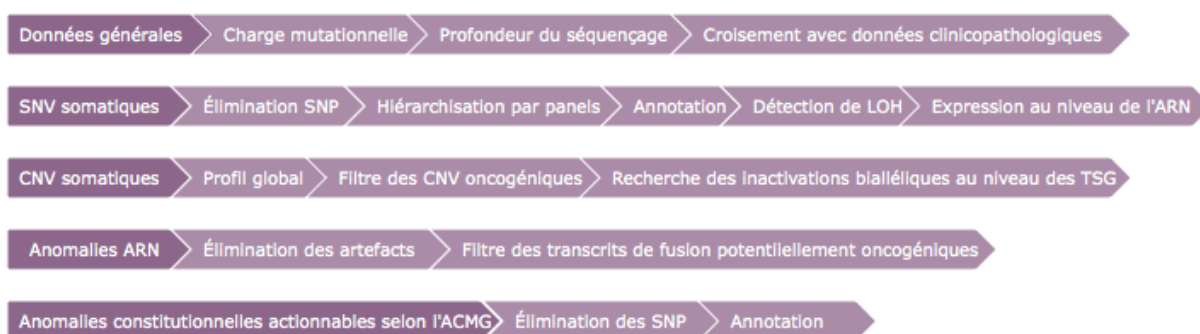
<sup>1</sup> version 8.1 of human genome (version GrCh37)

<sup>2</sup> [www.pharmgkb.org/](http://www.pharmgkb.org/)

## FICHE 5 - INTERPRÉTATION BIOLOGIQUE

### Procédure séquentielle

Le biologiste de la plateforme de génétique moléculaire labellisée par l'INCa procède à l'interprétation et à la validation des données de séquençage disponibles dans *genVarExplorer* selon la séquence suivante :



SNV : variant nucléotidique ; CNV : variant du nombre de copies ; SNP : polymorphisme nucléotidique ; LOH : perte d'hétérozygotie ; TSG : gène suppresseur de tumeur ; ACMG : American College of Medical Genetics and Genomics

L'interprétation biologique étudie :

- la **charge mutationnelle tumorale** : nombre de variations somatiques non synonymes dans l'exome tumoral ;
- les **trois types d'altérations ciblables** : SNV, CNV et fusions géniques ;
- les **anomalies constitutionnelles actionnables** selon l'ACMG et les **polymorphismes de susceptibilité** à une toxicité médicamenteuse.

L'interprétation biologique prend en compte :

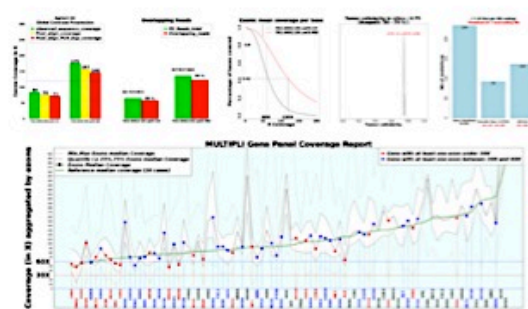
- les informations relatives à la **fonction des gènes mutés** ;
- les **caractéristiques techniques des variants** ;
- les **rapports des bases de données** ;
- les **prédictions bioinformatiques**.



## Contenu du rapport biologique

→ L'interprétation aboutit à une **classification des variants** détectés sur le plan de leur pathogénicité, de leur actionnabilité et de leur ciblage éventuel par l'une des molécules disponibles dans *Multipli*. Une partie « **commentaire** » permet d'argumenter la classification proposée.

→ Les résultats de cette interprétation (**le rapport biologique**) sont **consultables directement sur genVarXplorer**, après **connexion sécurisée**. Le rapport biologique se présente sous la forme d'une page d'accueil présentant , suivie de 4 pages consacrées à l'interprétation des résultats concernant successivement les mutations somatiques, les mutations de prédisposition, les altérations génomiques et les gènes de fusion.



Qualité séquençage et charge mutationnelle

actions	info	PASSING_PANEL	GeneSymbol	RefSeq	WTBCConclusion	AltRef	CTBCConclusion	WTBCComment	WTBReport
		MULTIPLI	TP53	p.T173M	Libra pathogène	No	Activable	Variant suspecté à cause d'un	Yes
		MULTIPLI	DNAH1	p.R103L	Libra pathogène	No	Not activable	Insulation dans le site 5'UTR	Yes
		MULTIPLI	PLCB1	p.T208S	Benign	No	Not activable	2 variants couverts en chr11:90,391912-1234	No
		MULTIPLI	PLCB1	p.T208S	Benign	No	Not activable	2 variants couverts en chr11:90,391912-1234	No

Analyse des SNV somatiques

actions	info	GeneSymbol	CopyNo_Eval	WTBCConclusion	AltRef	CTBCConclusion	WTBCComment	WTBReport
		RB1	1	Libra pathogène	No	Not activable	Cloné dans 1 variation probablement pathogène sans	Yes
		TP53	1	Libra pathogène	No	Not activable	Cloné dans une variation probablement pathogène	Yes

Analyse des CNV somatiques

actions	info	PassingPanel	Count	WTBCConclusion	AltRef	CTBCConclusion	WTBCComment	WTBReport
		RB1+CCND2P	100	Libra pathogène	No	Not activable	Présenté 100%	Yes
		SPDYL1+CD34	50	Libra benign	No	Not activable	Plus d'argument en faveur de partie de fonction de B	No

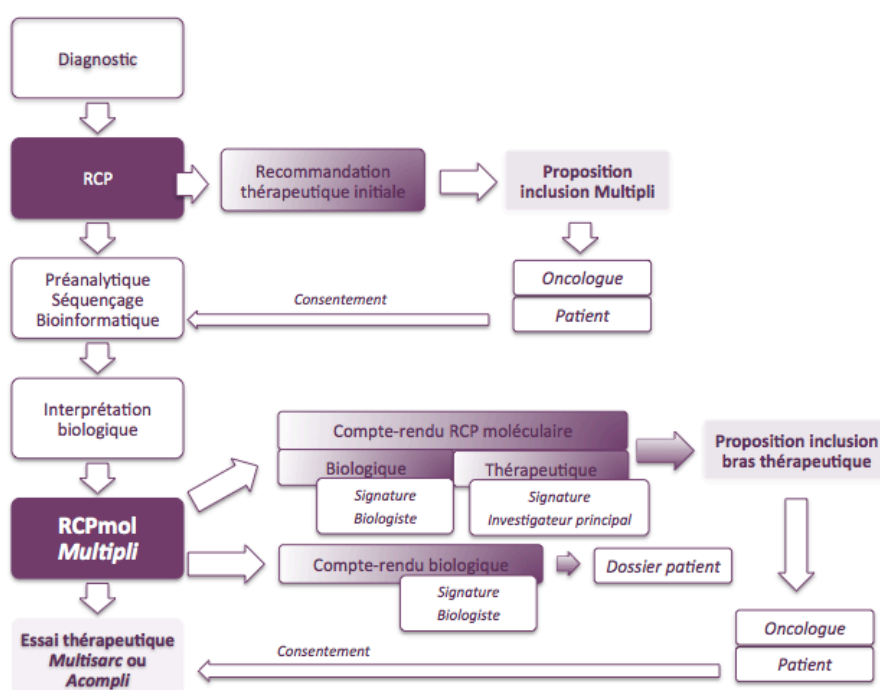
Analyse des anomalies ARN

actions	info	PASSING_PANEL	GeneSymbol	RefSeq	WTBCConclusion	AltRef	CTBCConclusion	WTBCComment	WTBReport
		MULTIPLI	RB1	p.S20Y	Libra pathogène	No	Not activable	pathogène (substitution conservatrice) suspecté	Yes

Anomalies constitutionnelles « actionnables » selon l'ACMG

## FICHE 6 - RCP MOLÉCULAIRE

La RCP moléculaire de Multipli (RCPmol Multipli) s'intègre dans le circuit classique de prise en charge des patients atteints de cancer. Liée au caractère spécifique de Multipli comme programme de thérapie ciblée, elle vient en complément du dispositif existant.



### Organisation


Les RCP moléculaire de Multipli sont :

- hebdomadaires ;
- communes aux deux types de tumeurs - sarcomes et cancers colorectaux - et aux deux plateformes - HEGP et Institut Bergonié ;
- composées (au minimum, **quorum exigé**) d'un médecin biologiste d'une plateforme de génétique moléculaire de Multipli, coordonnateur de la RCP moléculaire, d'un oncologue médical (référé sarcome/colon), d'un anatomopathologiste et d'un secrétaire de séance. La présence d'un **bioinformaticien** et du **médecin investigateur** prenant en charge le patient est **conseillée** ;

- tenues par **vidéoconférence** compte tenu du caractère multicentrique du programme : l'interface *genVarXplorer* permet à tous les participants, *via* un partage d'écran sécurisé, de **visualiser simultanément** l'interprétation biologique du séquençage et les données clinicopathologiques du patient issues de l'outil de recueil des données ;
- organisées selon la séquence suivante :
  - ✓ exposé des **renseignements cliniques** concernant le patient ;
  - ✓ **discussion collégiale** de l'interprétation biologique du séquençage ;
  - ✓ **validation**, s'il y a lieu, des **variants** permettant **l'inclusion** dans un essai de *Multipli* ;
  - ✓ discussion autour de **variants éventuels** (de classe 4 ou 5) pouvant orienter le patient vers **d'autres essais cliniques** ;
  - ✓ orientation du patient, si nécessaire, vers une **consultation d'oncogénétique**.

## Contenu du rapport de RCP moléculaire

Le rapport de la RCP moléculaire comprend **trois parties** : données clinicopathologiques du patient, rapport de l'interprétation biologique du séquençage **signé par le biologiste** et conclusions de la RCPmol avec recommandations thérapeutiques (inclusion dans un essai/traitement standard) signées par **l'oncologue investigateur principal**. Il est adressé au médecin qui suit le patient et figure dans son dossier médical.

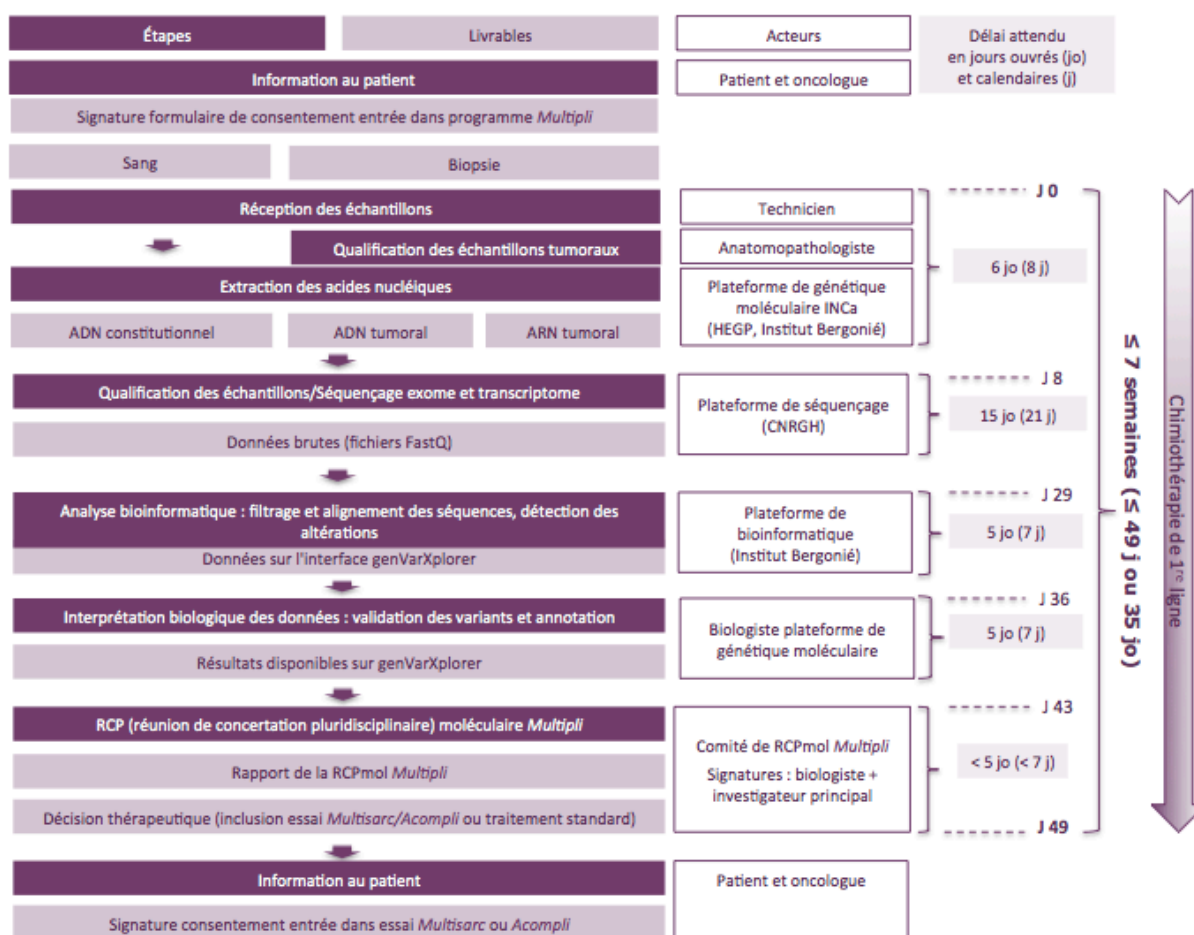
 <b>Étude Multipli</b> <b>Rapport de RCP moléculaire</b> ID patient	<b>INTERPRÉTATION BIOLOGIQUE DU NGS</b>	<b>CONCLUSIONS DE LA RCP MOLÉCULAIRE</b>
<b>RENSEIGNEMENTS CLINIQUES</b> <b>Date de naissance</b> <b>Sexe</b> <b>Médecin demandeur</b> <b>PS/ECOG (le plus actualisé)</b> <b>Diagnostic histologique</b> <b>Historique médical</b> <b>Antécédents (pathologies concomitantes antécédents majeurs)</b> <b>Traitements reçus</b> <b>Traitement en cours</b>	<b>Profondeur de séquençage</b> <b>Charge mutationnelle</b> <b>Variations somatiques*</b> <b>Variants du nombre de copies*</b> <b>Transcrits de fusion*</b> <i>* Avec signification en termes de pathogénicité et actionnabilité ou non</i> <b>Variations constitutionnelles</b>  <i>Validé par (biologiste)</i> <i>Date</i>	<b>Présence ou absence de cibles <i>Multisarc</i> ou <i>Acomplil</i></b> <b>Recommandation d'inclusion dans un des protocoles <i>Multisarc</i> ou <i>Acomplil</i> ou recommandation thérapeutique standard</b>  <b>Date de la RCP moléculaire</b>  <b>Liste des participants</b>  <i>Validé par (oncologue)</i> <i>Date</i>
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>

## FICHE 7 - DÉLAIS

### Délai global et par étapes

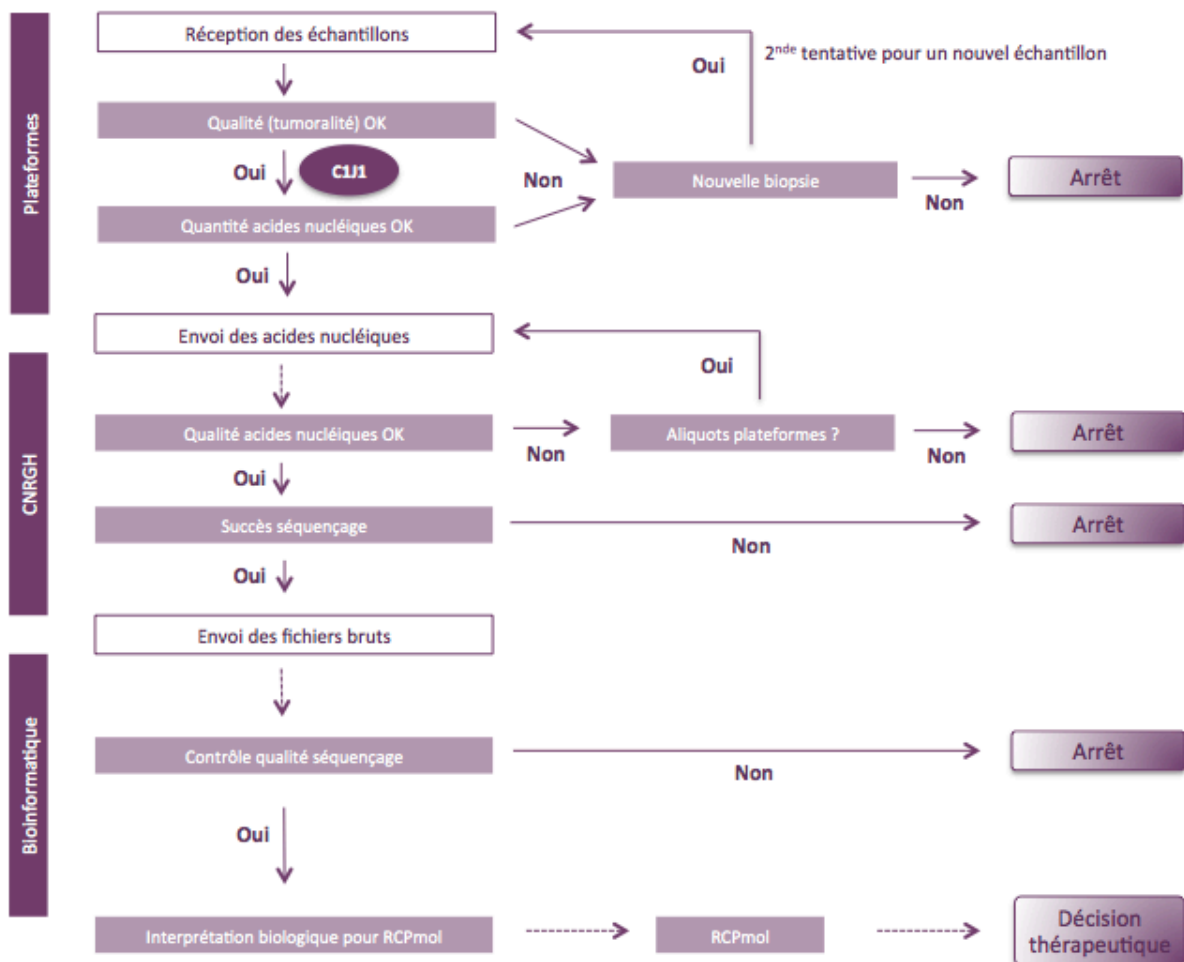
Au total, **sept semaines maximum** ( $\leq 35$  jours ouvrés) s'écoulent entre la réception (J0) des échantillons d'un patient par une plateforme de génétique moléculaire labellisée par l'INCa et la remise du rapport (J49) de la réunion de concertation pluridisciplinaire moléculaire de *Multipli*.

Les délais pour chaque étape ont été optimisés et sont détaillés ci-dessous :



## Arbre décisionnel pour la poursuite de l'étude

Compte tenu des délais maximum de chaque étape, un **arbre décisionnel** a été validé, permettant de déterminer **jusqu'à quels stades et à quelles conditions** un échantillon peut poursuivre le circuit biologique *Multipli* ou doit en être écarté.



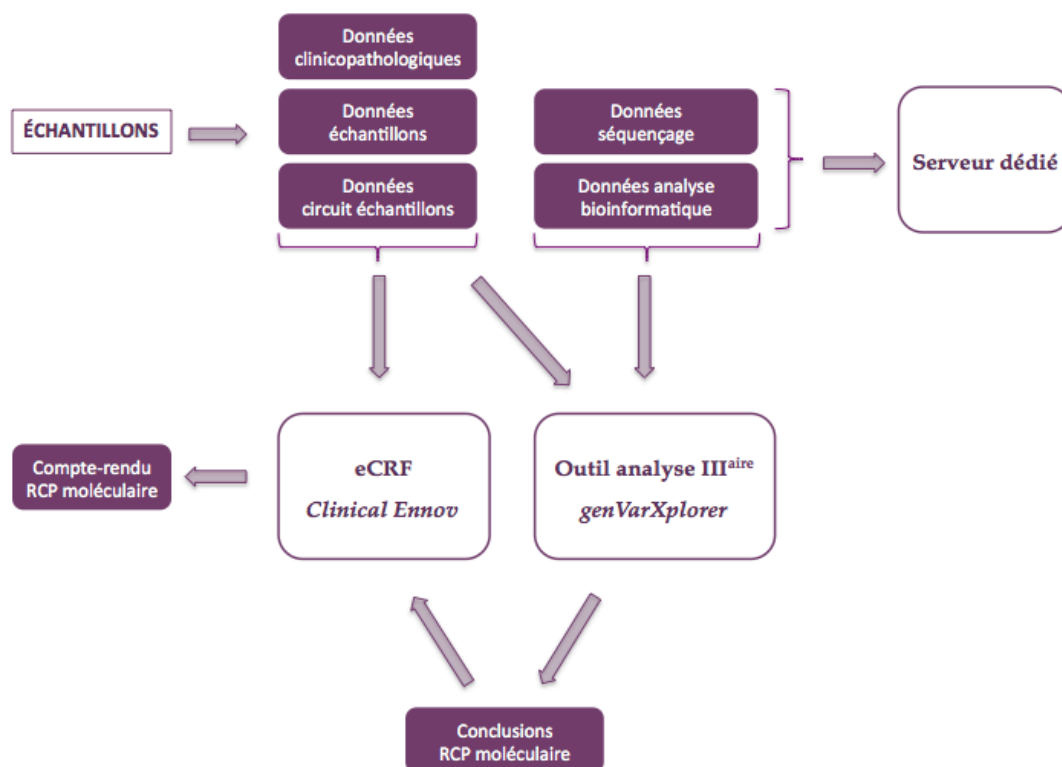
## FICHE 8 - AUTRES ASPECTS CLINIQUES ET RÉGLEMENTAIRES

### Information aux patients

→ La participation des patients à l'étude *Multipli* repose sur le recueil de leur **consentement** par l'investigateur, après que celui-ci ait délivré une information adaptée (**notice d'information**) et ait répondu à l'ensemble des questions posées par le futur participant.

→ La possibilité de découvrir une (ou des) **anomalie(s) génétique(s) constitutionnelle(s)** est exposée au patient et son souhait d'être ou non informé de ces découvertes est **expressément recueilli**. Les **modalités de restitution** des résultats du séquençage constitutionnel et l'organisation de la **prise en charge d'éventuelles anomalies incidentes** dans le cadre de *Multipli* serviront de **modèle** pour le futur circuit génomique en routine.

### Gestion des données



→ Le complexité du circuit des données nécessite d'effectuer une **saisie de qualité et en temps réel** de l'eCRF, au risque de bloquer la saisie lors des étapes suivantes.

## Identitovigilance

IDENTIFICATION ET IDENTITOVIGILANCE		
Centres d'investigation	Collecte échantillons	Attribution ID-patient : Essai : 1 lettre → M (Multisarc) ou A (Acompli) Centre de recrutement : 2 chiffres → 01, 02, 03, etc. Patient : n°ordre d'inclusion (4 chiffres) + code aléatoire 3 lettres Saisie sur outil de gestion Remplissage formulaire papier pour envoi plateforme génétique moléculaire
Plateformes de génétique moléculaire lab.INCa (HEGP, Institut Bergonié)	Réception échantillons	Cohérence entre formulaire papier, outil de gestion et échantillons en présence → nombre de tubes, volume par tube, remplissage des items
	Extraction acides nucléiques	Attribution code-barre CNRGH aléatoire → Double étiquetage: ID-patient + code-barre CNRGH
Plateforme de séquençage (CNRGH)	Réception acides nucléiques	Cohérence entre formulaire papier, outil de gestion et échantillons en présence → nombre de tubes, volume par tube, remplissage des items
	Séquençage	Cohérence données de séquences avec données cliniques (e.g., le sexe)
Plateforme de bioinformatique (Institut Bergonié)	Analyse séquences	Vérification cohérence entre séquences ADN et ARN d'un même patient