

UE : Biopathologie

Date : 30.03.11
Promo : PCEM2

Plage horaire : 14-15h
Enseignant :

Ronéistes :

Loux Tehani
Zumbiehl Laurent

Facteurs prédictifs de la réponse thérapeutique en cancérologie

I - Définitions : facteur pronostique et facteur prédictif

II - L'intérêt des facteurs prédictifs de réponse thérapeutique

III - Le développement de thérapeutiques ciblées

IV - Les biomarqueurs prédictifs de réponse thérapeutique

V - Des exemples :

- 1) Facteurs prédictifs de réponse aux traitements anti-hormonaux dans les cancers du sein
- 2) Facteurs prédictifs de réponse aux traitements anti-récepteur EGFR dans les adénocarcinomes du colon et du rectum et dans les adénocarcinomes du poumon.

I - Définitions : facteur pronostique et facteur prédictif

Je vais vous parler de facteurs prédictifs de la réponse thérapeutique en cancérologie avec des définitions pour illustrer les choses que vous avez commencé à voir avec moi et M. Merliot : sur la biologie moléculaire et ses défis, et peut être que les anapath vous parleront de certains facteurs pronostiques ou prédictifs, d'IHC, etc.

Tout d'abord deux définitions de ce qu'on appelle des **facteurs pronostiques** et des **facteurs prédictifs**

La différence entre les deux est qu'on va considérer un **facteur pronostique** comme un facteur qui permet d'**estimer le potentiel évolutif** d'un processus tumoral en particulier, et de sélectionner les patients qui sont susceptibles d'avoir une évolution péjorative pour leur donner un protocole thérapeutique adapté. Cela dit, en ce qui concerne ce qu'on appelle les facteurs ou biomarqueurs pronostiques, ces facteurs seront évalués **chez des patients qui ne reçoivent aucune thérapie particulière ou bien** des thérapies génériques comme la radiothérapie ou chimiothérapie conventionnelles (**protocoles standards**)

Pour illustrer ce propos, il y a certaines tumeurs où il y a des **amplifications** de certains **oncogènes** comme **N-MYC** dans les neuroblastomes (qui touchent principalement les enfants) ou **ERB2** dans le cancer du sein, etc.

- N-MYC est un facteur pronostic parce que, quelque soit la thérapie, les enfants qui ont ces amplifications vont mal évoluer.
- ERB2 est un facteur à la fois pronostique et prédictif car les patients ayant une amplification ERB2 vont pouvoir recevoir une thérapie ciblée, on illustrera ça aujourd'hui avec un Ac qui va bloquer la protéine codée par cet oncogène.

C'est ça la différence fondamentale entre un facteur pronostique qui dira : « la tumeur est agressive », et ce, quelque soit la thérapie, et le **facteur prédictif**, qui va au contraire, être **associé avec un protocole thérapeutique spécifique**. C'est à dire que les patients ayant ce facteur prédictif répondront bien ou mal à une thérapie donnée mais par contre pourront répondre bien ou mal à une autre thérapie.

Donc en ce qui concerne tous ces biomarqueurs, qu'ils soient pronostiques ou prédictifs, leur **valeur** est obtenue en réalisant des **tests statistiques**. Je donnerai tout à l'heure un exemple de tests statistiques et de courbes de survie faits sur des cohortes de patients sur pour voir si tel facteur est prédictif d'une bonne ou mauvaise réponse à un traitement donné.

II - L'intérêt des facteurs prédictifs de réponse thérapeutique

Comme je viens de l'illustrer sur un ou 2 exemples, ils permettent de prédire la réponse à certains traitements. Il est donc important de savoir si ce marqueur est positif ou négatif car on fonction de ça, on va **administrer la thérapie à la sous population qui va pouvoir en tirer profit**. C'est à dire que les tumeurs vont avoir un marqueur qui va indiquer que les patients vont bien répondre à une thérapie et qu'on pourra donc la leur administrer. Au contraire, **on ne**

donnera pas ce médicament aux les patients dont on sait que la tumeur ne répondra pas. Cela ne sert à rien, non seulement la tumeur ne répondrait pas, mais en plus de n'avoir aucun effet, le patient subirait des effets secondaires (effets associés à toute thérapeutique).

Donc, l'intérêt de faire l'analyse de ces marqueurs prédictifs, c'est justement de **donner le traitement seulement chez les patients pour lesquels il y aurait un bénéfice.**

N.B : Donc comme je l'illustrais en préambule en prenant l'exemple de N-MYC et ERB2, certains marqueurs peuvent être à la fois pronostique et avoir une valeur prédictive thérapeutique. ErB2 est un facteur de mauvais pronostic quand l'amplification de ERB2 présente dans une tumeur du sein chez les femmes (ou dans d'autres tumeurs comme les tumeurs gastriques) parce que l'oncogène code une protéine qui a des propriétés biologiques impliquées dans la prolifération, la migration cellulaire. Donc la tumeur peut être plus agressive mais en même temps, c'est un facteur prédictif de la thérapeutique parce qu'on a une thérapie qui permet de taper sur le produit de cet oncogène et d'essayer de le bloquer. Donc c'est **à la fois un facteur pronostique ET thérapeutique.**

III - Le développement de thérapeutiques ciblées

Je pense que vous commencez à le savoir déjà, par votre culture générale et vos études que, jusqu'à présent, les thérapies pour traiter les cancers et les proliférations tumorales, c'était des molécules qui ciblaient la division cellulaire par exemple. Comme les anti-mitotiques qui sont des poisons du fuseau mitotique ou bien la radiothérapie qui endommage, casse l'ADN et tuent les cellules. Ces thérapies là sont dites génériques, c'est à dire qu'elles sont non discriminantes et qu'elles attaquent aussi bien les cellules normales qui se divisent que les cellules tumorales.

Ce qu'on appelle des thérapies ciblées, c'est qu'on va identifier, comme illustré dans les précédents cours d'oncologie moléculaire, une **anomalie moléculaire qui va déréguler un gène donné.** Par exemple le BCR/ABL dans la leucémie myéloïde où il y a une tyrosine-kinase anormalement active et qu'on ciblera ainsi. Cette tyrosine-kinase étant anormalement active uniquement chez les cellules tumorales, on va espérer avoir un effet moins toxique sur les cellules normales.

Pour faire de la thérapie ciblée, il faut :

- en préambule, **comprendre la biologie des tumeurs** qu'on veut cibler. Il faut identifier les anomalies moléculaires qui sont impliquées dans ces cancers donc faire de la **recherche fondamentale.**
- Ensuite, il faut **individualiser les cibles thérapeutiques potentielles** compte tenu des mécanismes cellulaires qui sont impliqués dans ces cancers en question. Parce que, parmi les anomalies moléculaires trouvées, certaines molécules sont ce qu'on appelle en « français » des « drugable ». C'est à dire qu'on peut les cibler avec une molécule thérapeutique alors que d'autres molécules sont difficilement ciblables et ont donc un intérêt thérapeutique moindre.
- Puis il va falloir **valider ou invalider expérimentalement ces cibles potentielles**, c'est à dire montrer qu'effectivement, ces molécules sont bien impliquées dans le processus tumoral et que le fait d'interférer avec elles via des inhibiteurs, des Ac (comme on va le voir aujourd'hui), ça a un effet bénéfique, ça bloque la croissance cellulaire, tumorale, l'angiogenèse, etc, quelque soit le processus possible. Et donc il y a des modèles expérimentaux, cellulaires, animaux avant de passer aux essais cliniques chez l'homme.

- Enfin, il faut effectivement **développer des molécules actives** dans la voie de signalisation en question. Par exemple on trouve une tyrosine-kinase active et il faut avoir des molécules qui agissent sur cette voie. La **validation de ces molécules** est nécessaire avant une utilisation thérapeutique.

IV - Les biomarqueurs prédictifs de réponse thérapeutique

Encore une fois, ce n'est pas dans l'idée de faire un catalogue exhaustif comme je vous le disais dans le cours sur les oncogènes et sortes de tumeur, c'est juste pour vous montrer quelques exemples pour que vous compreniez le concept.

Jusqu'à 2009, en fait, il y avait **assez peu de marqueurs utiles** pour la thérapie ciblée. Ce type de marqueurs commence à exploser seulement depuis 2 ou 3 ans.

Souvent, ils ont été découverts **par hasard, après qu'une molécule ait été développée pour des essais cliniques**. Par exemple, dans le cas que l'on abordera plus tard, on a des récepteurs à tyrosine-kinase comme le récepteur EGFR et l'industrie pharmaceutique va développer des molécules qui ciblent ce récepteur. Et puis, parce qu'on sait que ses voies métaboliques sont impliquées dans la croissance de beaucoup de cancers, on fait des essais cliniques chez des patients qu'on traite et puis on a une **réponse bimodale**. C'est à dire qu'on voit un groupe de patients qui répond bien et un groupe de patients qui ne répond pas du tout. À partir de ce moment, on va commencer à creuser et essayer de comprendre le mécanisme. Pourquoi tel ou tel patient répond bien ou mal ? Et donc, avec la génétique moléculaire, on identifie parfois une anomalie génétique qui corrèle avec une bonne ou une mauvaise réponse.

Ces marqueurs vont être de **plus en plus importants dans les années à venir** parce que :

- la connaissance fondamentale de la biologie des tumeurs augmente donc on augmente le nombre de gènes impliqués dans les cancers. Parmi cela, ceux qui peuvent constituer de bonnes cibles thérapeutiques
- de nombreuses techniques moléculaires se développent également. Techniques de génomique, de protéomique qui permettent d'analyser l'ADN/ARN, le profil protéique des tumeurs qui permettent d'identifier de nouvelles cibles. En parallèle avec ça, il y a des disciplines qu'on appelle la **pharmaco-génomique/génétique** qui se développent. C'est à dire que quand on fait des essais cliniques maintenant chez des patients, il y a des tests de toxicologie, etc, et en parallèle de ces tests, on fait des profils génétiques des malades (surtout des puces à ADN, on analyse les polymorphismes, etc). Et puis, on peut comme ça **identifier des profils génomiques ou génétiques qui vont corrélérer avec une bonne ou une mauvaise réponse**. Ça peut être des enzymes qui sont impliquées dans la détoxification cellulaire, ça peut être des récepteur tyrosine-kinase, etc, dont les variations génétiques vont être associées à une bonne ou une mauvaise réponse.

V - Exemples

1) Les facteurs prédictifs de réponse aux traitements anti-hormonaux dans les cancers du sein

Le cancer du sein étant un exemple quasi canonique puisqu'il a été découvert historiquement il y a une bonne trentaine d'année.

Comme vous le savez, dans un certain nombre de cancers, en particulier le cancer de la prostate et le cancer du sein, les cellules dépendent, sont **contrôlées par les hormones stéroïdiennes**.

Concernant les cancers du sein (qui sont sensibles aux oestrogènes), on a montré que :

- 70% des tumeurs étaient hormono-sensibles
- 30% ne l'étaient pas.

Il a donc fallu essayer de comprendre pourquoi les cellules étaient sensibles ou pas aux agents thérapeutiques. Et on s'est rendu compte assez rapidement que, dans le cas où les tumeurs étaient hormono-sensibles, elles exprimaient, comme j'ai voulu l'illustrer juste après sur une diapositive, des **récepteurs aux oestrogènes et plus ou moins à la progestérone**.

À ce moment là, si le récepteur était présent, c'est qu'à priori les cellules pouvaient répondre à ces hormones, et que si on bloquait cette voie métabolique on pouvait avoir un effet bénéfique.

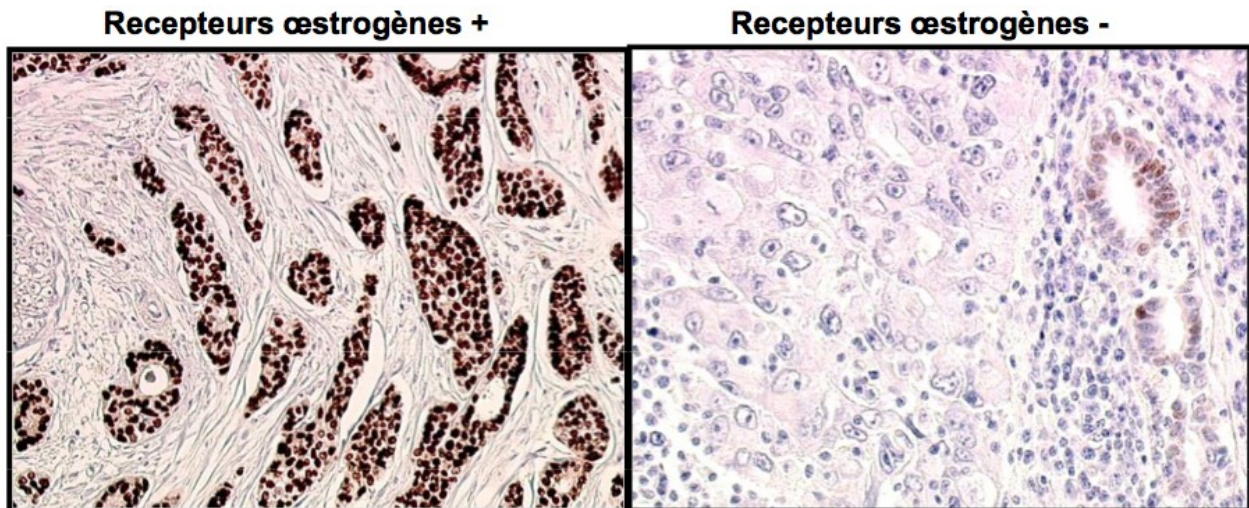
A contrario, si les cellules n'expriment pas les récepteurs, c'est qu'à priori, elles ont développé une voie parallèle pour leur prolifération et que bloquer cette voie (celle des hormones) est dans ce cas inutile.

Comme dans tous les cas de récepteur, que ce soit des récepteurs hormonaux nucléaires ou des récepteurs tyrosine-kinase membranaire, on a montré que c'est l'**interaction hormone/récepteur** qui **favorise la croissance tumorale** et qu'il y a plusieurs façons de bloquer cela.

Du fait qu'on ait vu que l'expression de ces récepteurs était un facteur prédictif, il est devenu absolument indispensable de caractériser, de phénotyper les tumeurs, avant de savoir si on allait administrer ou pas, un tel traitement à ces malades.

Il fallait donc mettre en évidence l'expression ou non de ce marqueur. Étant donné que ces récepteurs sont des protéines et qu'on avait des Ac pour ça, le plus simple était de faire en routine de l'**IHC** (immunohistochimie). Ça marchait également sur des bouts de **tissus fixés et inclus en paraffine** (comme on a toujours ce type de prélèvement en anapath, c'est très bien).

- Ici un exemple d'IHC de deux tumeurs mammaires :



À droite : une tumeur qui est négative, on ne voit pas d'expression dans les cellules tumorales de récepteurs oestrogéniques.

À gauche : on voit très bien le marquage en marron des récepteurs hormonaux, qui sont intracellulaires, en technique d'immunopéroxydase (i.e. via un Ac couplé à une enzyme qui est révélée par un substrat et en fait, ce qu'on visualise, c'est le substrat chromogène marron qui est converti par l'enzyme couplé à l'Ac). Ces récepteurs sont dans le cytoplasme voire dans le noyau en fonction de la présence ou non d'activation par les oestrogènes.

On voit très bien la différence du marqueur ici, dans ces tumeurs de deux patientes avec un cancer du sein. Dans ces cas là, pour les tumeurs qui sont **récepteurs +**, on peut penser que les cellules vont dépendre de la voie hormono-sensible pour leur prolifération, donc on a deux **stratégies thérapeutiques** pour intervenir :

- premièrement avec une molécule qui était le **Tamoxifène** dont on a dérivé plusieurs molécules appelés les **SERM** (Selective Estrogen Receptor Modulators), c'est à dire des molécules jouant un rôle d'**antagonistes sélectifs** sur les récepteurs oestrogéniques. Autrement dit, des molécules qui bloquent par une **inhibition compétitive**, l'action des oestrogènes oncogènes sur la cellule en occupant les sites sur les récepteurs **sans induire de réponse biologique**. De nouvelles molécules se sont développées ensuite. Il s'agit de molécules qui ne sont pas utilisées qu'en cancérologie, et dont vous entendrez probablement parler dans d'autres pathologies. Notamment les pathologies ostéo-articulaires, comme les ostéoporoses où les oestrogènes sont impliquées dans l'activation des ostéoclastes. En bloquant ces ostéoclastes on diminue la résorption osseuse et donc il y a un bénéfice dans ce cas là avec ce type de molécules. Donc il y a des molécules comme le **Tamoxifène**, le **Raloxifène**, etc qui ce sont développées.
- L'autre stratégie, au lieu d'agir sur l'interaction ligand/récepteur, c'est d'essayer de **bloquer la fabrication des stéroïdes** par l'organisme. Dans ce cas là, on peut utiliser des inhibiteurs d'enzymes, ces enzymes qui sont appelées des **aromatases** impliquées dans la transformation des androgènes surrénaliens en oestrogènes. Ainsi, en utilisant des **anti-**

aromatases, on bloque au maximum la fabrication des stéroïdes androgènes, des oestrogènes endogène. Et du coup le récepteur est présent mais ne sera pas occupé, les stéroïdes n'étant plus fabriquées.

Pour ces 2 types de traitement, ce marqueur est absolument décisif, c'est à dire que les patients qui sont **récepteur -**, **ne répondront pas ces molécules**. C'est un facteur prédictif de la réponse thérapeutique.

2) Les facteurs prédictifs de réponse aux traitements anti-récepteurs EGFR dans les adénocarcinomes du colon et du rectum et dans les adénocarcinomes du poumon.

Autre exemple que je voulais illustrer aujourd'hui, c'est la voie des **récepteurs tyrosine-kinase**. On a pris l'exemple de l'**EGFR** parce qu'il a des implications dans différentes pathologies : pour l'instant le cancer du colon et cancer du poumon.

Mais les récepteurs de la famille **EGF-like** sont impliqués dans d'autres pathologies (comme ERB2, qu'on trouve impliqué notamment dans le cancer du sein et les cancers gastriques ou encore ERB4 dont on a décrit récemment des mutations dans les mélanomes et pour lesquelles il n'y a pas beaucoup de thérapeutiques pour le moment etc). Il est très possible que cette stratégie (qu'on a va vous illustrer aujourd'hui, pour les 2 pathologies qu'on a choisi de vous présenter, c'est à dire poumon et colon), se développeront probablement ensuite pour d'autres récepteurs de cette famille sur d'autres pathologies.

On va pas reprendre en détail la signalisation des récepteurs à activité tyrosine-kinase, je l'aborderai un petit peu plus tard sur une diapo pour illustrer un peu ces voies et visualiser quelles mutations sont prédictives ou non de la réponse thérapeutique.

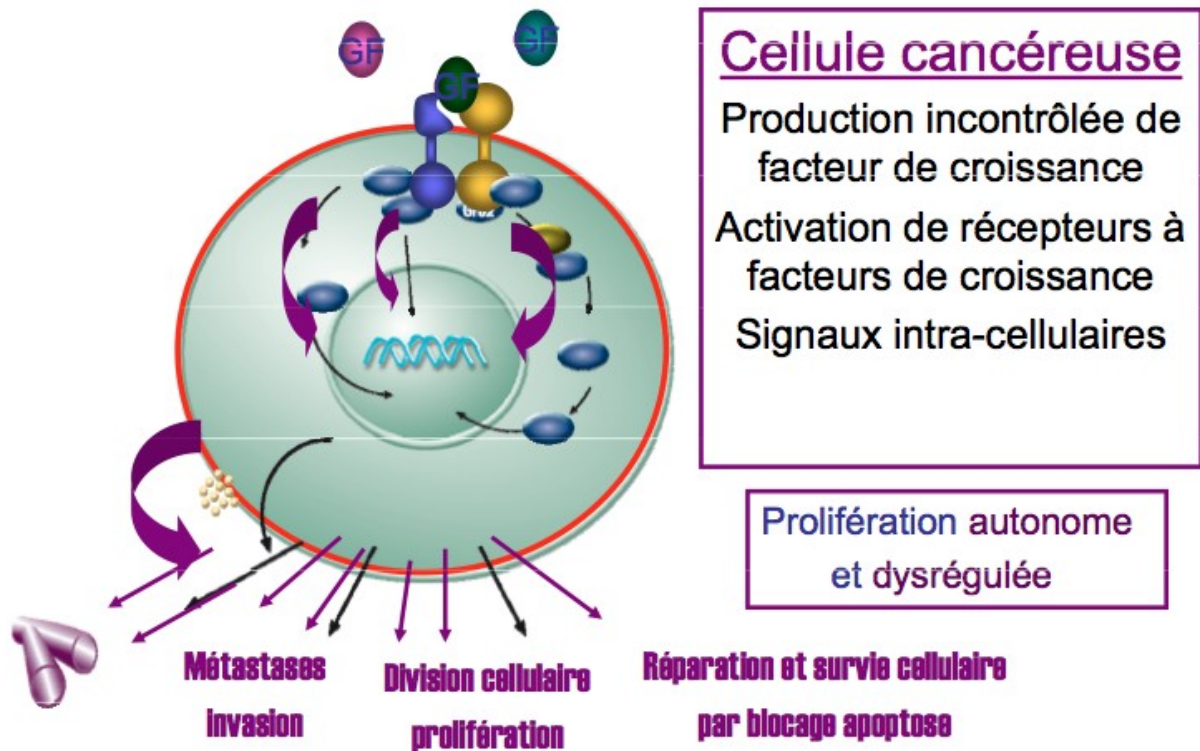
Mais en gros, ce qui se passe c'est que, soit il y a :

- une **activation constitutive** du récepteur par des mutations, comme je vous l'avais dit dans le premier cours,
- une **production dite autocrine**, c'est à dire que la cellule va fabriquer les **facteurs de croissance en quantité excessive**, et cette quantité excessive de facteurs de croissance va activer, de manière là aussi excessive le récepteur et déclencher les voies intracellulaires, sur lesquelles on reviendra un tout petit peu tout à l'heure

Ce qui va entraîner :

- une **division et prolifération** anormale,
- éventuellement ça va être impliqué dans les processus de **dissémination, migration, invasion** donc dans les tumeurs secondaires, les **métastases**
- et puis ça peut aussi jouer un rôle dans les processus de **survie cellulaire**, en bloquant l'apoptose, qui est normalement un processus physiologique pour éliminer les vieilles cellules.

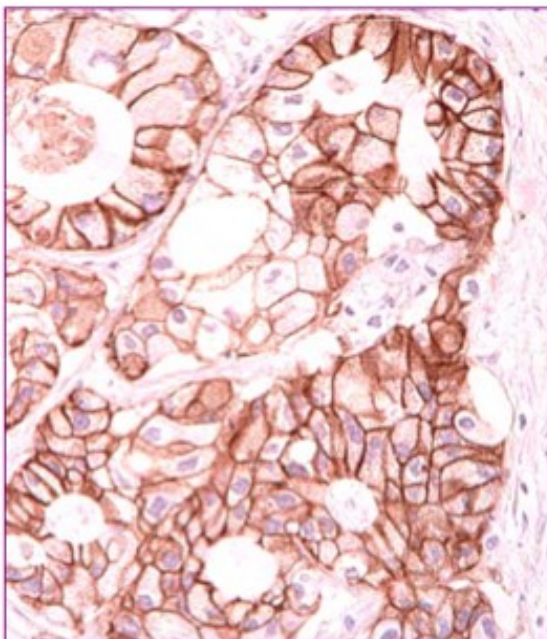
→ Tout ça fait que ça entraîne une **croissance exagérée du clone tumoral**.



- Pourquoi on a pensé que cette voie métabolique pouvait être importante ?

Parce que d'une part, il avait été démontré qu'elle était impliquée physiologiquement dans les cellules normales dans la prolifération cellulaire, etc.

D'autre part, on a vu qu'un certain nombre de tumeurs exprimait de manière anormale soit le **récepteur**, soit le récepteur plus un certain nombre de **ligands possibles** de ce récepteur.

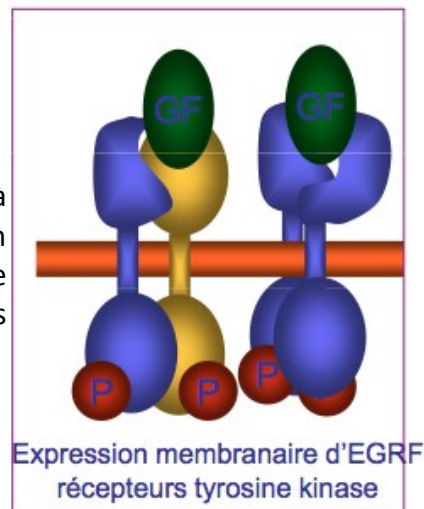


Par exemple ici, vous voyez très bien, en IHC là encore, avec un Ac couplé à la peroxydase, un marquage membranaire cette fois, des récepteurs type tyrosine-kinase qui sont transmembranaires. Donc on voit très bien dans un tissu tumoral ici, (à mon avis, il s'agit d'un adénocarcinome du colon au vu de la morphologie des cellules, mais je ne suis pas sûr)

Illustration 1: IHC - Expression membranaire d'EGFR

Dans ces cellules tumorales, il y avait l'expression de récepteurs. Du coup, dans des modèles cellulaires, des chercheurs ont montré que le fait de bloquer l'activation de ce récepteur avait un impact sur la prolifération des cellules et on a pensé que c'était une bonne cible thérapeutique.

Donc là encore, comme je vous le disais tout à l'heure, le principe c'est qu'un ligand se fixe sur un récepteur qui se dimérise, ce qui induit une phosphorylation du récepteur qui va activer les voies intracellulaires.



On a vu que ce récepteur était présent, qu'il était activé dans ces tumeurs et qu'il était à priori, une cible thérapeutique, notamment des les cancers du colon et du rectum et puis dans certains cancers pulmonaires.

Il a été mis en œuvre une thérapie pour cibler cette voie de signalisation.

On l'évoquera tout à l'heure plus en détail. Il y a **2 voies possibles** pour ces récepteurs de la famille tyrosine-kinases, que ce soit les récepteurs de la famille EGF-like ou d'autres récepteurs à activité tyrosine-kinase comme FGF, PDGF, etc. (les signalisations sont en partie communes) :

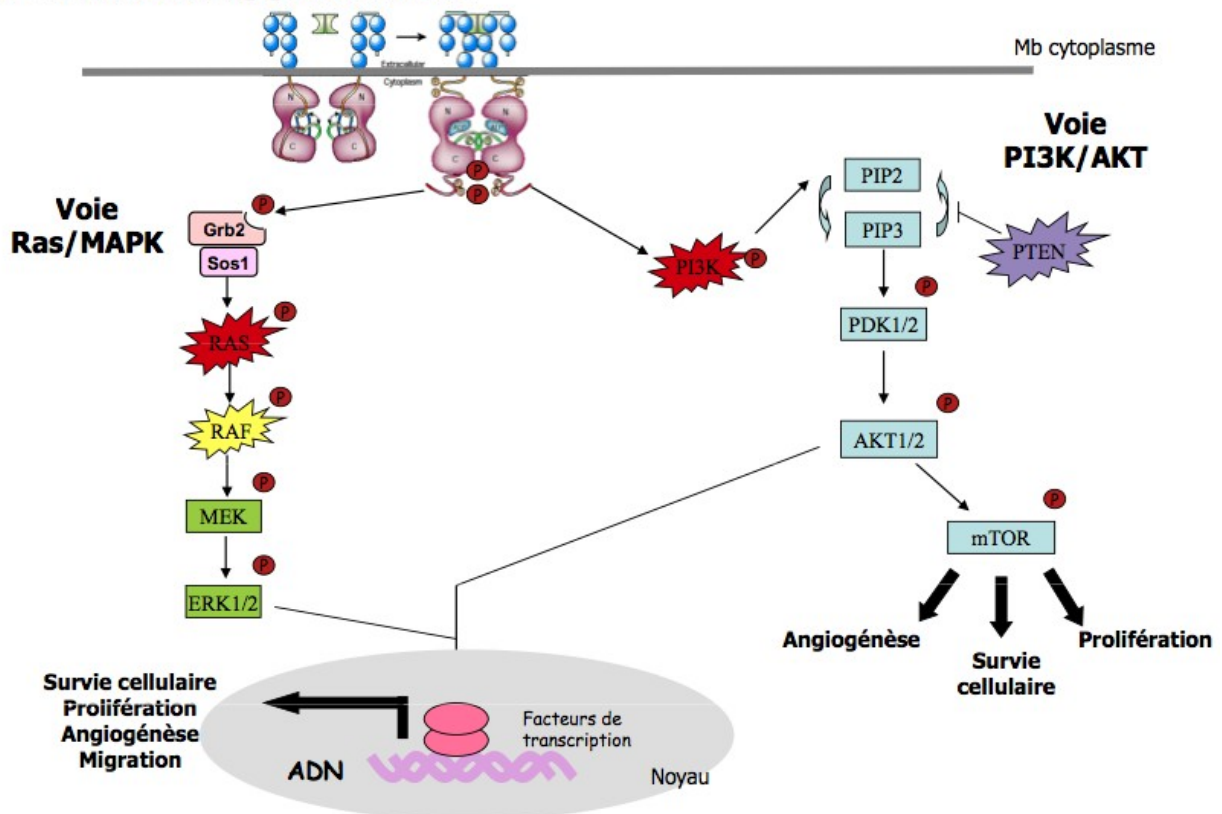
- la voie **Ras/MAP kinase** qui va aboutir à une phosphorylation de certaines molécules en particulier les facteurs de transcription et ces derniers activeront des gènes impliqués dans la survie, la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, etc.
- la voie de la **PI3K** = autre kinase cytoplasmique qui va être recrutée et activée par le récepteur et qui va entraîner la phosphorylation d'un certain nombre de substrats dont une autre kinase appelée **AKT** ou PKB et enfin, une autre protéine appelée **mTOR** (mTOR car découverte au départ comme la cible d'une molécule appelé la rapamycine → Target Of Rapamycine). Cette voie métabolique est aussi impliquée dans la survie cellulaire, dans l'angiogenèse, la prolifération.

Ligands :

EGF : epidermal growth factor

TGF- α : Transforming growth factor- α

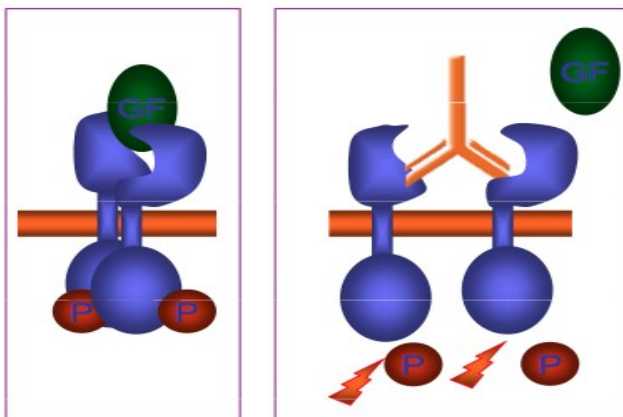
Voies de signalisation EGFR



Selon les tissus, il y a une voire deux voies métaboliques possibles en réponse aux récepteurs tyrosine-kinase. L'idée c'est de **bloquer ces voies pour essayer de bloquer la croissance tumorale**.

Au départ, comme on a vu que le récepteur était présent à la surface des cellules et qu'il était activé, la première idée c'était d'essayer de bloquer cette activation.

- Une des stratégie, c'était d'utiliser un **Ac bloquant**, c'est à dire, un Ac qui va occuper les sites de liaison du ligand sur le récepteur et qui va de ce fait, empêcher la fixation du ligand et l'activation du récepteur. Donc un Ac qui va agir pas **inhibition compétitive** au niveau du site du ligand.



Il y a deux compagnies pharmaceutiques qui ont développés des Ac dont le principe est similaire. Sauf que dans un cas, l'Ac est totalement **humain** alors que dans un autre, il s'agit d'un Ac **chimérique** avec un module de reconnaissance du récepteur qui est souris et le domaine constant qui vient d'une protéine humaine. Le fait de chimériser un Ac pouvait entrainer un rejet par le système immunitaire (SI)

de cette protéine thérapeutique qui allait peut être, être reconnue comme une protéine étrangère et être éliminée. La deuxième génération d'Ac totalement humaine contrecarrerait cet éventuel rejet par le système immunitaire de la protéine thérapeutique.

- La deuxième stratégie c'était de faire des **inhibiteurs pharmacologiques** cette fois. Le récepteur activé par son ligand se dimérise. Il a un domaine intracellulaire tyrosine-kinase, c'est à dire avec un domaine catalytique qui fixe l'ATP, etc. Si on donne une petite molécule qui **empêche cette activité ATPasique** et par conséquent l'activité tyrosine-kinase. On donc a un médicament potentiel.

L'avantage des **Ac**, c'est que c'est **très spécifique**. Comme vous le savez, le SI peut avoir des Ac vraiment très spécifique d'une protéine donnée. Ici, ça agit un peu à tous les niveaux : ça bloque l'activation du récepteur à activité enzymatique.

L'**inconvenient ou l'avantage**, on peut le voir de deux façons différentes, c'est que, c'est **inhibiteurs de tyrosine-kinase** ne vont **pas** être forcément **autant spécifiques** que les Ac. Parce que les domaines ATPasique de nombreuses tyrosine-kinase ont des **analogies structurales** et donc il se peut qu'un inhibiteur d'EGFR reconnaisse d'autre tyrosine-kinases. Du coup, on peut avoir des effet secondaires par inhibition de tyrosine-kinases nécessaires dans la physiologie de la cellule normale. Mais ça peut aussi être un avantage parce que ça peut aussi permettre d'utiliser ces médicaments **pour cibler d'autres cancers qui ne pas d'anomalies d'EGFR mais d'autres protéines apparentées**.

L'exemple qu'on peut prendre c'est qu'il y a une molécule qui s'appelle le **Glivec** qui est un **inhibiteur de la kinase ABL** qui est impliqué dans la leucémie myéloïde chronique (LMC). Cet inhibiteur n'a finalement pas tellement d'effet toxique et a un effet sur une autre tyrosine-kinase **KIT** impliquée dans d'autres cancers, des cancers gastro-intestinaux. Et donc, ce médicament peut être utilisé pour traiter les LMC, mais aussi d'autres types de tumeurs du fait de cette spécificité un peu plus élargie de l'inhibiteur.

C'est pour ça que c'est un inconvenient mais pas forcément. Si la non-spécificité est restreinte, ça peut être finalement un avantage. Notamment dans le cas de l'**inhibiteur de l'EGFR** qui cible aussi d'autres récepteurs essentiellement apparentés à l'EGFR ainsi que les **récepteurs du VEGF** qui est un facteur de croissance des cellules endothéliales et qui est impliquées dans l'**angiogenèse tumorale**. Donc finalement, avec cette molécule on peut cibler à la fois la tumeur et la prolifération des vaisseaux et par conséquent, l'apport en nutriments de la tumeur.

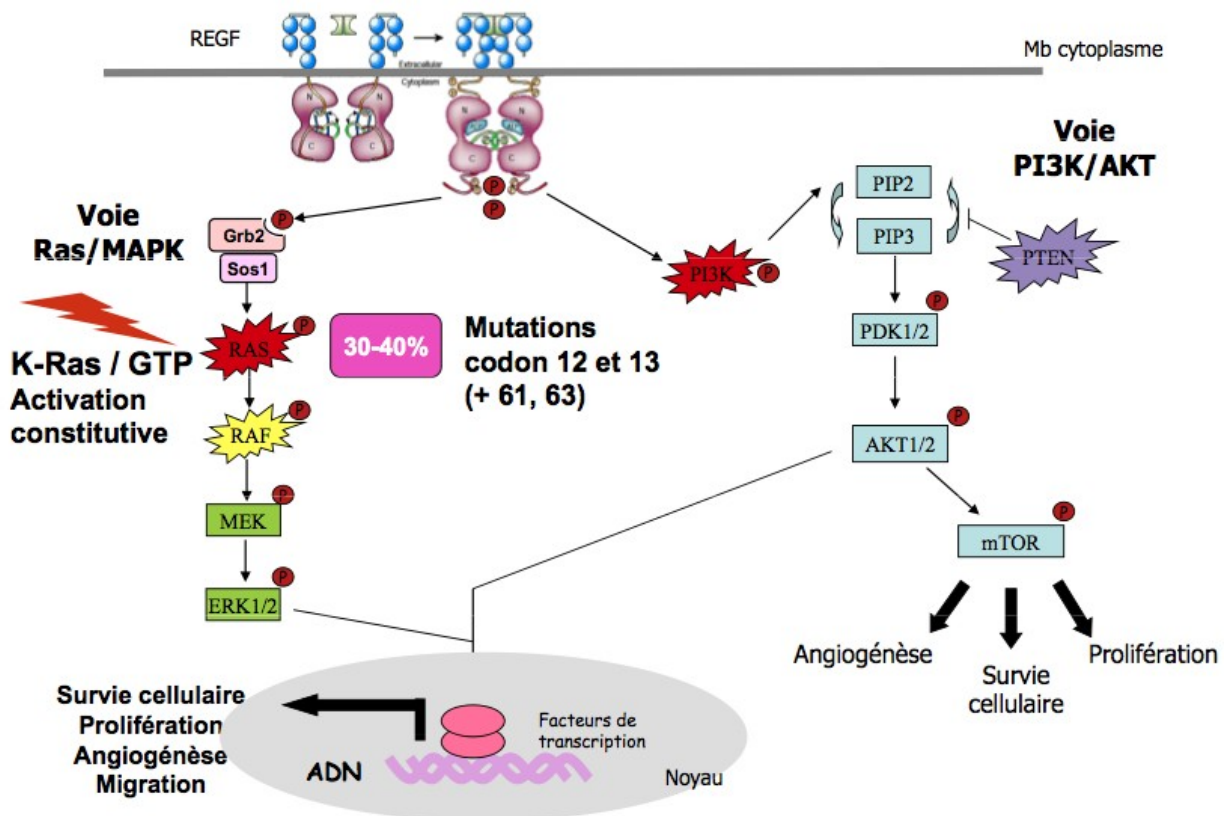
Il y a 2 molécules qui ont été développées par deux compagnies pharmaceutiques différentes, la première est l'Erlotinib (Tarceva®) et le deuxième Gefitinib (Iressa®).

Ces molécules ont été développées au départ, en pensant qu'elles pourraient être utiles l'une comme l'autre, Ac et inhibiteurs de tyrosine-kinase dans tous les cancers où il y aurait une implication EGFR. Finalement, on va vous illustrer aujourd'hui que, l'une ou l'autre marche plus ou moins bien voire pas du tout selon les tumeurs et la voie d'activation de la cellule. En particulier, on va voir que les inhibiteurs de tyrosine-kinase marchent beaucoup mieux sur les tumeurs dans

lesquelles il y a des mutations dans le gène.

En ce qui concerne les voies de signalisation, je voulais juste vous reparler de **Ras** qui est une petite **protéine G** qui sert de relais dans la transmission du signal. Les récepteurs tyrosine-kinase lorsqu'ils sont activés recrutent des protéines adaptatrices qui vont elles-mêmes recruter Ras. Ras va être activés par **substitution** de nucléotide **GDP par GTP** et ça va ensuite activer la voie des kinases intracellulaires.

Voies de signalisation EGFR et mutation de Kras



Il y a un certain nombre de cas, 30-40% ici en ce qui concerne les cancers colo-rectaux, un peu moins dans les cancers pulmonaires, des **mutations de certains codons** (je vous en ai parlé lors du premier cours) qui rendent la protéine **Ras constitutivement active** parce qu'elle n'est plus capable d'hydrolyser le GTP en GDP. Et dans ce cas là, **la voie métabolique est active tout le temps, que le récepteur soit activé ou pas**. C'est important à retenir car ça a un impact sur la prédiction de la réponse dans certains cancers.

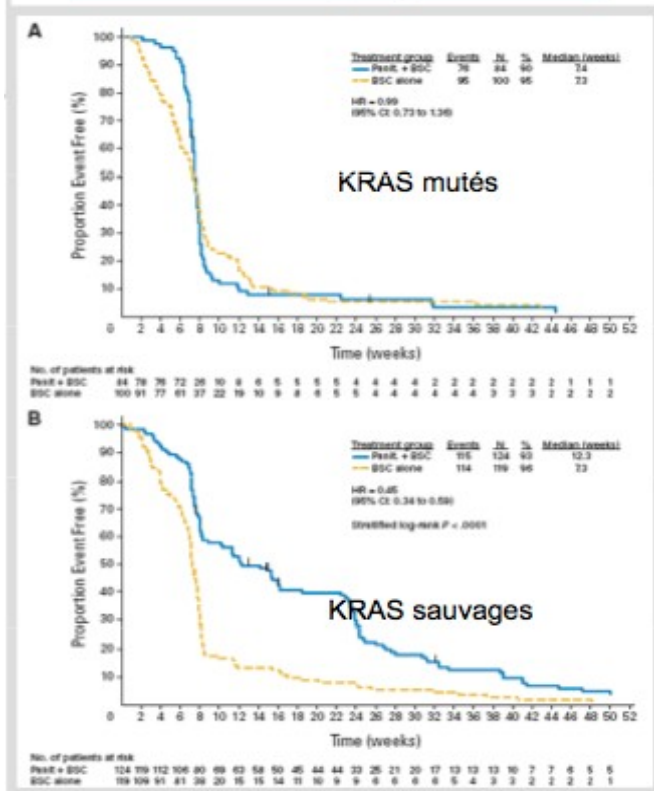
Parfois, il s'agit d'un marqueur de réponse prédictive, parfois on les découvre par hasard, parce qu'il y a des molécules qui sont développées (comme les molécules anti-EGFR qu'elles soient inhibiteurs de tyrosine-kinase ou Ac bloquants). Et en fait, on fait des essais thérapeutiques chez les malades et on se rend compte qu'il y a des malades qui répondent bien et d'autres pas. On a distingué **deux groupes** de patients :

- des patient qui présentaient des **mutations de K-Ras** dans leur tumeur
- d'autres qui n'en avaient **pas**.

Là ce sont des courbes de survie avec en ordonnée la fraction des patients qui survivent en % et en

abscisse, le temps en semaines ici (mais cela peut être en mois, en années selon les cas). Vous voyez ici que les tumeurs rectales peuvent être relativement agressives. Vous voyez parfois, en quelque semaines, un taux de **survie sans progression**, les patients ne sont pas morts au bout de 12 semaines mais la tumeur fait une **récidive**, c'est dire qu'on a fait une exérèse chirurgicale à ces patients par exemple, on les a traités malheureusement 3 mois après après la tumeur commence à repousser avec éventuellement une progression métastatique. C'est ça la survie sans progression.

Survie sans progression



Vous voyez que pour les patients qui ont une **mutation du gène K-Ras**, qu'on les traite avec ou sans l'Ac anti-EGFR, il ne se passe rien. Il n'y a **aucun bénéfice thérapeutique**. En générale, les patients reçoivent quand même la thérapie conventionnelle en même temps. On va les traiter avec une chimiothérapie conventionnelle et puis, en complément de cette thérapie conventionnelle, on va ajouter une thérapie ciblée. Ici, on voit qu'il n'y a aucun bénéfice supplémentaire à la thérapie ciblée sur la survie sans progression, c'est à dire que les malades vont rechuter aussi rapidement qu'ils aient ou pas le traitement.

Vous voyez ici la courbe d'en bas parle d'elle même, par rapport à celle du haut : chez les patients qui n'ont pas de mutation Ras, on voit que la courbe se décale quand même légèrement vers la droite, assez significativement quand même, on a un gain de plusieurs semaines par rapport à la survie sans progression.

On va revenir sur ce schéma (cf schéma Voies de signalisation EGFR et mutation K-Ras page précédente) : on ce qui concerne les cancers du colon, la voie métabolique importante à priori pour la croissance de ces tumeurs en aval de l'activation du récepteur EGFR, c'est la voie Ras/MAPK. Et en fait, vous comprendrez facilement que on va bloquer le récepteur ici, avec cet Ac bloquant. Normalement, chez les **patients sauvages** (Ras sauvage, non muté) Ras est recrutée par le récepteur activé et activera à son tour les protéines en aval (RAF, MEK, MAPK, etc). En bloquant le récepteur, Ras n'est plus activé et n'active plus ainsi la voie en aval.

Or si la protéine Ras est mutée, i.e. constitutivement active, la voie court tout le temps. Les cellules tumorales, malheureusement se fichent complètement d'avoir le récepteur activé ou pas parce que Ras va faire son job. Il est muté, activé, et va donc activer la voie. Chez ces patients là, on va essayer de bloquer la voie au niveau du récepteur alors qu'elle est active plus bas et donc c'est trop tard, on ne peut rien faire. Vous comprendrez que pour ces patients, il y a un rationnel biologique qui explique que la **thérapie ciblée n'a aucun effet** puisque la **voie est constitutivement activée, que le récepteur le soit ou non**.

La présence de la **mutation K-Ras** est un **critère d'exclusion pour la thérapie ciblée** parce que, les patients qui sont mutés ne vont pas répondre et on leur donnera donc un traitement

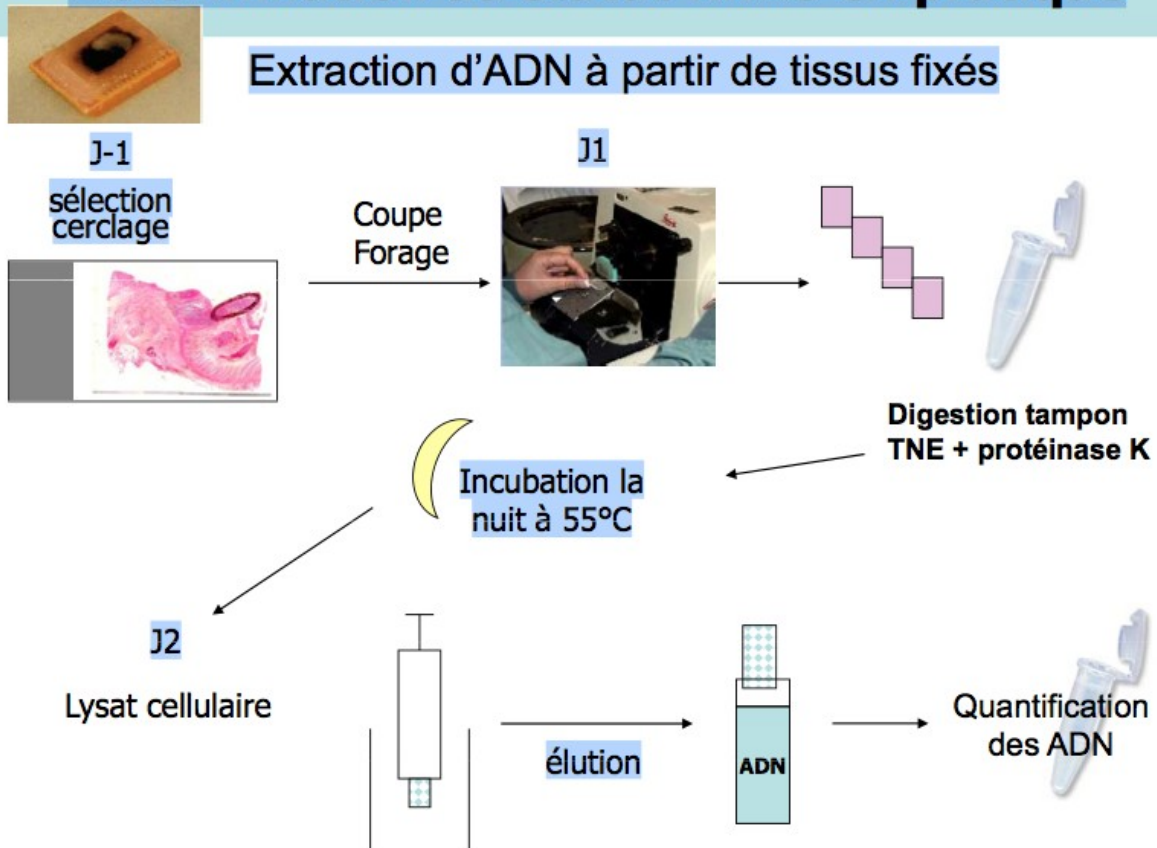
substitutif. Depuis que ces travaux ont été menés et confirmés par la suite, l'autorisation de mise sur le marché des Ac anti-EGFR est **restreinte** aux tumeurs qui n'ont pas de mutations K-Ras.

Depuis bientôt 2 ans, il y a une **recherche systématique des mutation K-Ras** qui a été mise en œuvre au niveau national en France, ainsi qu'au niveau international bien sûr, **chez tous les patients qui ont un cancer colo-rectal**, en particulier ceux qui ont un cancer métastatique, et qui vont bénéficier de type de traitement, pour **déterminer quel traitement leur donner**.

Cette mutation K-Ras est vraiment un facteur prédictif de la réponse et même ça conditionne puisqu'on n'a pas le droit de prescrire le médicament aux malades mutés.

- Comment ça se passe concrètement ?

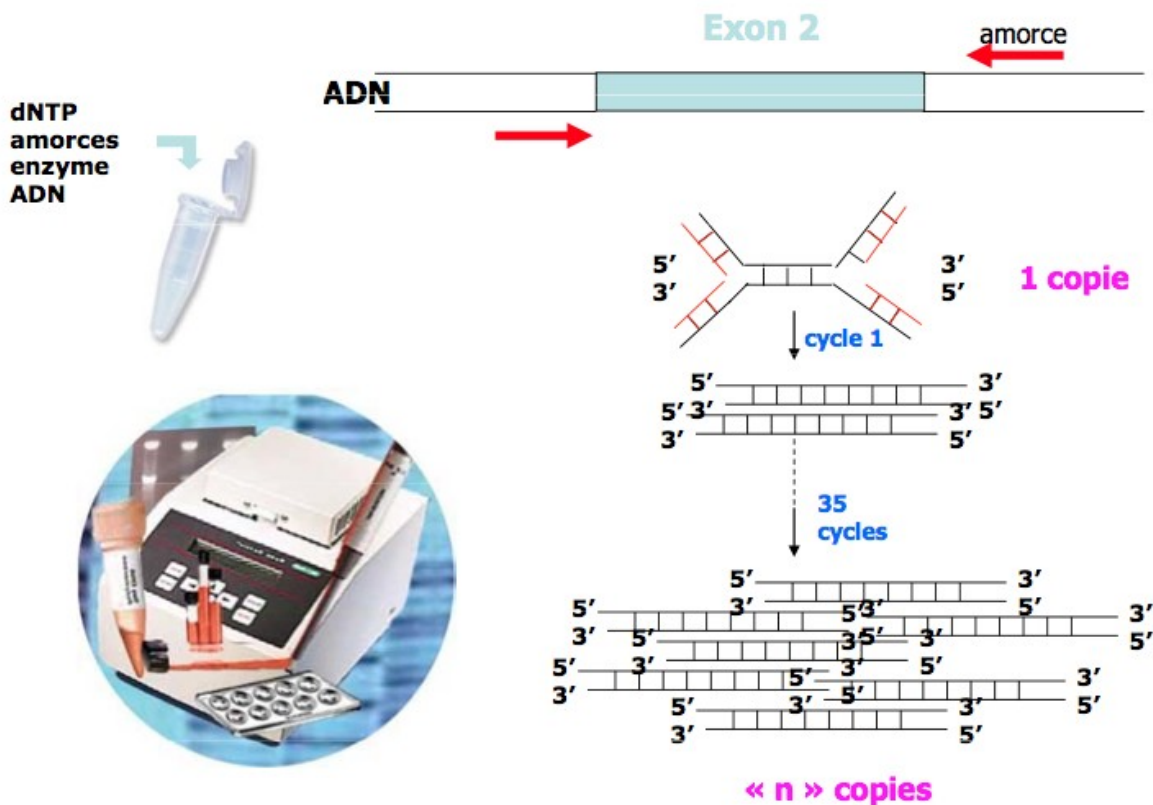
Détermination du statut KRAS en pratique



On ne va pas refaire le cours sur les techniques de biologie moléculaire, c'est juste pour vous illustrer en quelques diapo comment fonctionne cette recherche de mutation en pratique.

Le patient est diagnostiqué, il est biopsié ou opéré selon l'étendue de la lésion. On va recevoir au laboratoire d'anapath, soit du tissu frais et congelé, soit un bloc et on va sélectionner la région tumorale sur une lame. Un anapath va regarder la lame et nous dire : « La tumeur est par là ». On va faire des coupes et sélectionner sur les coupes, la région tumorale qui nous intéresse. On va faire des petits copeaux de la tumeur incluse en paraffine, que l'on mettra dans un petit tube, et puis, avec un tampon approprié, des protéases, etc, on va digérer le tissu pour en extraire, par différentes méthodes (précipitation, colonnes d'affinité, etc) l'ADN, le doser.

J3: la PCR



Ensuite, cet ADN, on va pouvoir l'amplifier par PCR avec des amorces spécifiques de part et d'autre de l'exon. Par exemple ici, l'exon qui est muté dans K-Ras. On va multiplier le nombre de copies du gène et puis ensuite on a 2 stratégies que je vais vous illustrer sur une autre diapo.

On va faire une première analyse qui permet de savoir si le **profil d'amplification par PCR** a l'air de contenir des **fragments** absolument **normaux** ou des **fragments** bizarres, **potentiellement mutés**. Si le fragment est normal, on va rendre un résultat non muté et le traitement va pouvoir commencer immédiatement. Si le fragment de PCR a l'air bizarre, on doit vérifier par **séquençage** s'il y a réellement présence de mutation ou pas avant de dire au médecin s'il peut traiter avec l'Ac bloquant ou non. C'est ce qu'on appelle la technique **HRM** : High Resolution Melting qui est une technique assez intéressante puisque et qu'elle très **rapide** (alors que les techniques de séquençage prennent du temps). En 3h on rend un résultat. C'est à dire qu'à partir du moment où on a le bloc qui arrive au laboratoire, où on extrait l'ADN et on fait la PCR, ça nous prend 48h et en gros en moins de 3 jours on a rendu un résultat, à savoir si la tumeur est mutée ou pas et donc si le malade va pouvoir rentrer sous traitement immédiatement, le plus tôt possible. Cette technique est **sensible** même si on a 1% de cellules tumorales dans le prélèvement, s'il y a des cellules mutées on va les détecter.

- Sur quoi repose cette technique ?

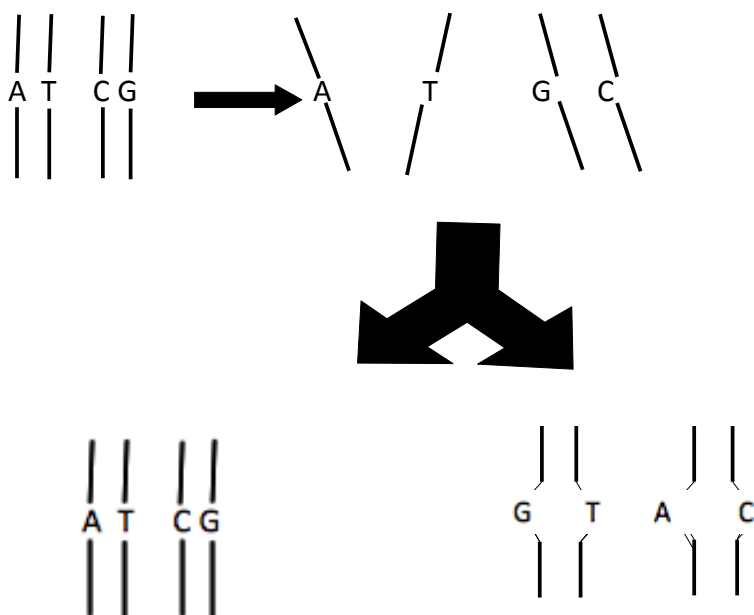
On fait une amplification par PCR et puis on va mettre au point la technique avec des témoins, des ADN pour lesquels on a déjà identifié par séquençage s'il est normal ou muté et que

l'on comparera ensuite avec l'ADN à tester. Après amplification de la séquence d'intérêt, en l'occurrence l'exon 2 du gène K-Ras, et on va suivre l'incorporation d'un agent fluorescent (molécule intercalante qui se fixe dans le sillon de l'ADN) durant la PCR = **PCR en temps réel**. Quand on va amplifier l'ADN Ras, il va se former des **hétéroduplex** et on pourra déterminer s'ils sont sauvages ou mutés.

Si l'ADN est de bonne qualité, il s'amplifiera mieux et sera détecté plus rapidement que s'il est muté. L'ADN, s'il est de mauvaise qualité s'amplifiera très tard et du coup, on le détectera plus tardivement. Donc on a déjà un critère décisif pour voir si l'ADN est de bonne ou mauvaise qualité.

On a la fluorescence qui augmente en fonction du nombre de cycle, et plus les ADN sortent tard et plus la qualité est médiocre.

Comme je vous l'ai dit, au cours de cette amplification, l'ADN est recopié par le polymérase, et si on a la présence de mutations, par exemple, séquence sauvage AT sur les DB et une séquence GC, ce qu'on va faire c'est qu'on va dénaturer l'ADN. Il y a une co-existence dans la tumeur, de séquences normales et de séquences mutées (si mutation il y a) et on le ré-hybridiser en baissant progressivement la température de telle sorte que ça va favoriser la formation des appariement hétérologues, c'est à dire, les hybrides de ce fragment d'ADN avec un autre fragment d'ADN. Ces fragments vont être complémentaires sur le plupart de la séquence sauf la région où il y a la mutation. Il y a ce qu'on appelle un **mismatch** ou un **mésappariement**.



Et ces mésappariements on va les détecter avec une très grande sensibilité ensuite parce que comme l'ADN est déjà mal apparié à cet endroit là, quand on va le dénaturer à nouveau, l'ADN va se décrocher plus rapidement. Quand on va analyser le **profil de fluorescence en fonction de la température**, en la remontant progressivement, si l'ADN est normal, il va se décrocher tard alors que s'il est anormal, il va se décrocher plus tôt parce qu'il va y avoir une base qui est mal appariée et va se décaler de 1, 2, 3, ..., 5 degrés et se décrocher plus tôt.

Là le prof est passé un autre diaporama qu'il mettra éventuellement sur apprentoile, mais c'était juste histoire d'illustrer un peu ses propos avec des cas pratiques. En gros :

C'est des patients qu'on analyse et on mesure la fluorescence en temps réel en fonction de la température. On chauffe, on laisse refroidir puis on chauffe progressivement de nouveau et on obtient des courbes de dénaturations. Tous les patients qui n'auront pas de mutations vont avoir des courbes de dénaturation similaires, normale (qui se superposent plus ou moins) et les patients ayant une mutation auront une courbe qui va se décrocher différemment, plus tôt ou plus tard par rapport aux courbes normales au cours du temps (courbes qui seront décalées par rapport aux courbes normales).

Dans ces cas là, les patients présentant une courbe décalée sont susceptibles de présenter une mutation.

Ce sont des résultats obtenus très rapidement (en 3h) et donc pour tous ceux qui ont des courbes similaires aux courbes de référence normales, on rendra comme résultat que le patient n'est pas muté et ils seront traités. Tous ceux qui ont des profils variants seront séquencés et puis on va pouvoir identifier, la présence d'une mutation sur tel ou tel codon. C'est très très sensible, on a une sensibilité de 1%, i.e. que s'il y a 1% de cellules tumorale dans le prélèvement, on pourra le détecté avec cette technique.

Voilà c'était juste pour vous parler un peu de la technique HRM qui permet de cibler, ici le gène Ras dans les cancers du poumon et les cancers du colon mais on met au point cette technique à chaque fois qu'un nouveau gène est muté, on peut être au point cette technique de criblage parce que finalement tous les patients qui n'ont pas de mutation vont pouvoir être traités plus rapidement que si on devait attendre les résultats de séquençage.

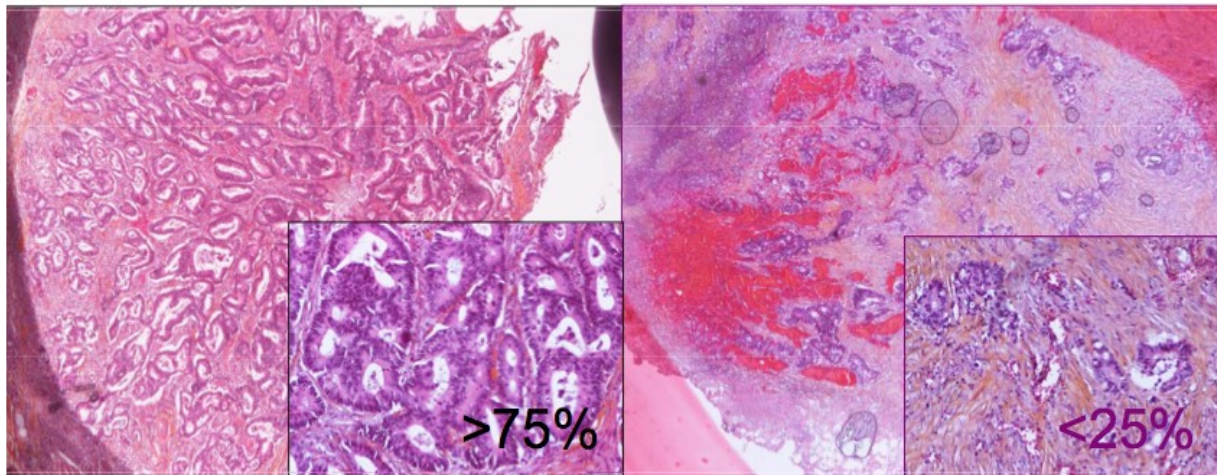
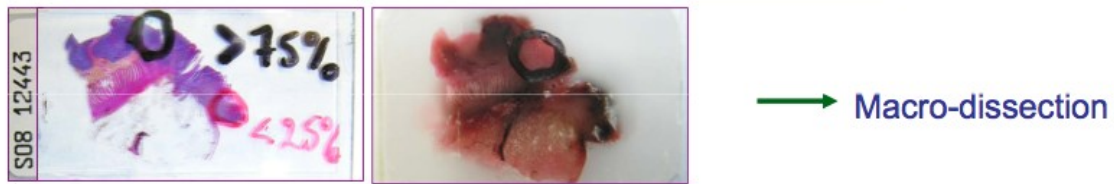
Dernier exemple pour finir, d'un point de vu pratique, ce qui est important de noté, la technique HRM c'est une technique qui est très sensible, donc on peut avoir jusqu'à 1% de cellules tumorales. En séquençage, si on a qu'1% de cellules tumorales, le pic sera tellement petit qu'on aura du mal à confirmer et à identifier la mutation et il faudra alors utiliser des techniques plus sensibles (ex : PCR spécifique d'allèle, on essaiera de détecter dans une population de cellules normales les quelques cellules mutés avec des sondes spécifiques qui vont reconnaître l'allèle muté même s'il est peu représenté dans la tumeur).

- Difficultés techniques

Le nerf de la guerre pour les techniques moléculaires, c'est la qualité du prélèvement. C'est à dire qu'il faut que la fixation soit compatible avec une analyse des acides nucléiques d'une part. D'autre part, il faut qu'il y ait suffisamment de matériel tumoral pour pouvoir en extraire suffisamment d'acide nucléique. Comme vous le savez, les tumeurs sont relativement hétérogènes du point de vue histologique (il y a la réponse inflammatoire, etc) et dans ce cas là on va aller cibler une zone vraiment tumorale.

Difficultés techniques

Analyser un matériel assez riche en cellules tumorales



ADN parfois dégradés par la fixation

Hétérogénéité et évolutions rapides des techniques

Un pathologiste va nous dire qu'ici, à gauche, il y a 75% de cellules tumorales (on a une prolifération tumorale importante) alors qu'à droite il n'y en a que 25% (seulement quelques amas tumoraux au milieu d'un stroma normal) comme on le voit ici (c'est encore du carcinome colo-rectal). On fera donc préférentiellement l'analyse dans la région où il y a le plus de cellules tumorales.

On va aller soit avec un emporte pièce sur le bloc découper une petite carotte, dans la partie la plus tumorale possible, soit faire des coupes et aller gratter avec un scalpel sous microscope binoculaire là partie dont on va extraire l'ADN. L'aspect pratique est vraiment important, l'ADN peut être dégradé par la fixation ou on peut avoir trop de matériel tumorale et dans ce cas là on ne peut pas rendre de résultat et en général, si c'est vraiment très important pour le malade, on demande à faire une nouvelle biopsie pour pouvoir avoir un résultat contributif.

- Quels les autres facteurs prédictifs ?

On a vu dans le cadre des thérapies avec les Ac monoclonaux, que le facteur prédictif c'est la présence d'une mutation de Ras. En effet, si elle est présente, la voie est active et cela ne sert à rien de cibler en amont. La cascade de signalisation récepteur tyrosine-kinase Ras/MAPK, c'est un peu comme un 4x100m où on essaie de bloquer le premier coureur mais avec un 2ème coureur qui part alors qu'on ne lui a pas passé le témoin.

Maintenant, il y a d'autres tumeurs pour lesquelles les facteurs prédictifs ne sont pas les mêmes. Dans le cas du cancer colo-rectal, il y a des mutations de Ras. On aussi décrit des mutations de RAF (c'est encore le coureur suivant qui est muté) et là encore, même combat que pour Ras, si

RAF est muté, la voie est aussi constitutivement active et cela ne servira à rien de bloquer le récepteur EGFR. Finalement les patients qui ont un cancer colo-rectal ne recevront de thérapie anti-EGFR que s'ils n'ont pas de mutation de Ras ni de mutation Raf à l'heure actuelle. Donc en routine maintenant, par les mêmes techniques que je vous ai illustrées juste avant, on recherche systématiquement des mutations de Ras et de Raf.

Ensuite, il y a d'autres mutations qui ont été découvertes dans ces voie de signalisation. Des mutations du récepteur lui-même, pour les cancers du poumon, et également des mutations de la deuxième voie métabolique impliquées : PI3K/ATK/mTOR avec des mutations constitutives de PI3K que l'on a trouvé dans les cancers bronchiques et aussi dans les cancers colo-rectaux.

Là aussi, ça ne sert à rien de bloquer ce qui se passe en amont vu qu'il y a une activation en aval d'une voie ou d'une autre voie. Parfois ces 2 voies contribuent de concert et parfois c'est préférentiellement l'une plutôt que l'autre. Il semble que dans le cancer colo-rectal ce soit plutôt la voie Ras/MAPK et que dans les cancers pulmonaires ce soit plutôt la voie PI3K/ATk. Mais là encore ces conclusions ne sont pas complètement figées.

Maintenant on développe des stratégies pour bloquer la PI3K directement ou pour bloquer directement les kinases qui sont en aval de Ras et Raf et dans ce cas, on bloque toute la cascade.

Qu'il y ait des mutations de Ras, Raf ou EGFR, si on bloque la voie à un niveau donné en aval, on bloque toute la cascade.

- Des différences entre cancers...

Ces biomarqueurs ne sont pas forcément transférables à tous les cancers parce que pour le colon, on a vu que les mutations Ras et Raf sont un critère d'exclusion dans la thérapie anti-EGFR alors que pour le cancer pulmonaire, ce n'est pas la même histoire. i.e. dans le cas des **cancers pulmonaires**, les **Ac anti-EGFR ne marchent pas**, n'apportent aucun bénéfice thérapeutique quelque soit le groupe de patients.

Il y a eu une stratégie alternative qui a été développée, ce sont ces **inhibiteurs pharmacologiques de l'activité tyrosine-kinase** dont je vous ai parlé au début. On s'est rendu compte que ces inhibiteurs ne marchaient pas tout le temps. Un peu comme les Ac anti-EGFR dans le cancer du colon qui ne marchent que chez les patients Ras et Raf sauvages. Ici, dans les cancers du poumon, ces inhibiteurs ne marchaient que chez certains patients et pas chez d'autres.

On s'est dit c'est peut être lié à des mutation de K-Ras ou Raf, comme dans le colon. Et on trouve des **mutations de K-Ras** qui sont associées à un **mauvais pronostic** mais qui ne corrèle pas avec la réponse ou non aux Ac anti-EGFR. Donc Ras est impliqué dans le cancer du poumon mais n'est pas en relation stricte avec EGFR contrairement au colon.

On s'est rendu compte que dans les **cancers du poumon**, le facteur prédictif de la bonne ou mauvaise réponse aux inhibiteurs de tyrosine-kinase, c'était dans ce cas là, la présence d'une **mutation du récepteur EGFR lui-même**, c'est à dire des mutation dans le gène lui-même, en particulier dans le **domaine tyrosine-kinase** du récepteur.

Comme cela a été prescrit pour les inhibiteurs Ac dans cancer du colon qu'on ne donne qu'aux malades K-Ras et Raf sauvages, dans le cancer du poumon, on a vu au contraire, que les ces inhibiteurs ne sont efficaces que chez le patient mutés pour EGFR.

Ainsi, on va devoir rechercher systématiquement la mutation d'EGFR sur tous les patients et seulement ceux qui seront mutés recevront le traitement par inhibiteurs d'EGFR.

Tout à l'heure on a vu des critères d'exclusion thérapeutique, parce que, si c'est muté, c'est

résistant donc on ne donne pas de traitement. Là au contraire, c'est un critère d'inclusion thérapeutique, c'est à dire que chez les patients chez qui l'on va trouver la mutation, seront susceptibles de tirer bénéfice du traitement. donc on va le leur donner spécifiquement. Par contre, il ne sera pas donné aux malades sans mutation EGFR, c'est interdit légalement dans l'autorisation de mise sur le marché.

Il faut qu'on recherche des mutations et encore, certaines mutations seulement parce que toutes les mutations ne sont pas équivalente.

Depuis environ 2 ans maintenant, la recherche de la mutation EGFR a été mise en place de manière systématique et on recherche la mutation de 4 exons dans le cancer pulmonaire. Pour avoir une idée ce que ça représente, à Bordeaux, on fait 8000 séquences par ans pour rechercher des mutations du gène EGFR dans les cancers bronchiques. Imaginez ce que ça représente au niveau national comme activité dans les laboratoires de biologie moléculaire.

Pour terminer, un ou deux exemples :

- on fait du séquençage, avec d'un côté un tissu normal où la séquence est conforme à la **séquence de référence GGC** et d'un autre côté on a un malade qui a une **substitution GCC** ce qui change l'acide-amino. Et ça c'est une mutation qui a été **répertoriée**. Typiquement, le type de compte rendu pour le clinicien révèle la présence de cette mutation avec ses conséquences au niveau protéique et on dit, si c'est documenté dans la littérature (s'il y a eu des essais cliniques chez ces patients de ce type), si la mutation est décrite comme sensible ou pas aux inhibiteurs de l'activité tyrosine-kinase et donc, si le malade peut recevoir le traitement. Ça ce sont des **bases de données** qui sont compilées, complétées au fur et à mesure que sont découvertes les mutations. On aura d'un côté des groupes de mutations qui sont associés à une réponse aux traitements et d'un autre côté, des groupes associés à une non réponse aux traitements. Le malade, selon qu'il aura telle ou telle mutation se verra administré le traitement ou non.
- Pour finir, le cas d'un malade qui avait une mutation GCC à l'état homozygote, 2 copies du gène muté sur l'un des exons, par rapport à un témoin normal (ce qui doit probablement donner un avantage à la tumeur). Et puis on a regardé un autre exon et on a trouvé une autre mutation à l'état hétérozygotes cette fois. Malheureusement pour ce malade, la première mutation est une bonne mutation, i.e. qu'elle répond bien au traitement. Par contre, la 2ème ne répond pas au traitement. Et les malades, qui sont très rares et qui ont ces 2 mutations co-existantes dans leur tumeur, ne répondent pas au traitement. On le signale sur le compte-rendu et le clinicien décide s'il va traiter quand même le malade ou non, mais en général, le malade ne bénéficiera pas d'une réponse thérapeutique.