

# Les acides nucléiques et la robotique au centre de la médecine de précision en oncologie

Pr Antoinette Lemoine  
Faculté de Pharmacie  
Inserm UMR-S 1193  
Biochimie et Oncogénétique  
Plate-forme labellisée INCa  
Hôpital Brousse  
GHU Paris-Saclay  
Villejuif

# Plan

- la médecine de précision en oncologie = théragnostic
  - Généralités
  - Nouveaux médicaments, thérapies ciblées
  - Nouvelles technologies d'analyses diagnostiques
  - Les circuits
  - Les applications médicales

# Contexte

- Augmentation des coûts des essais cliniques et de la R&D
- Durcissement des politiques de santé publique : vers une rationalisation des dépenses de santé
- Diminution du nombre de « candidats médicaments » en phase III des essais clinique
- Diminution du nombre de nouvelles molécules
- Essoufflement du modèle « blockbuster » et du paradigme « one fit all »
- Développement clinio-bologique thérapies ciblées

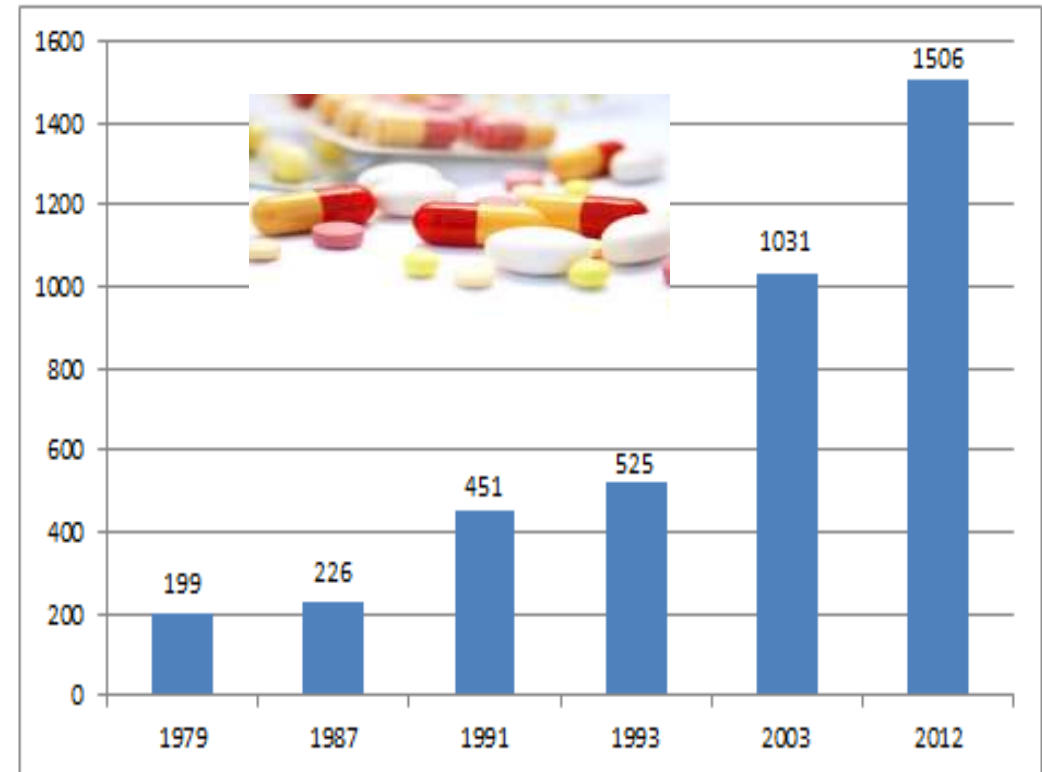
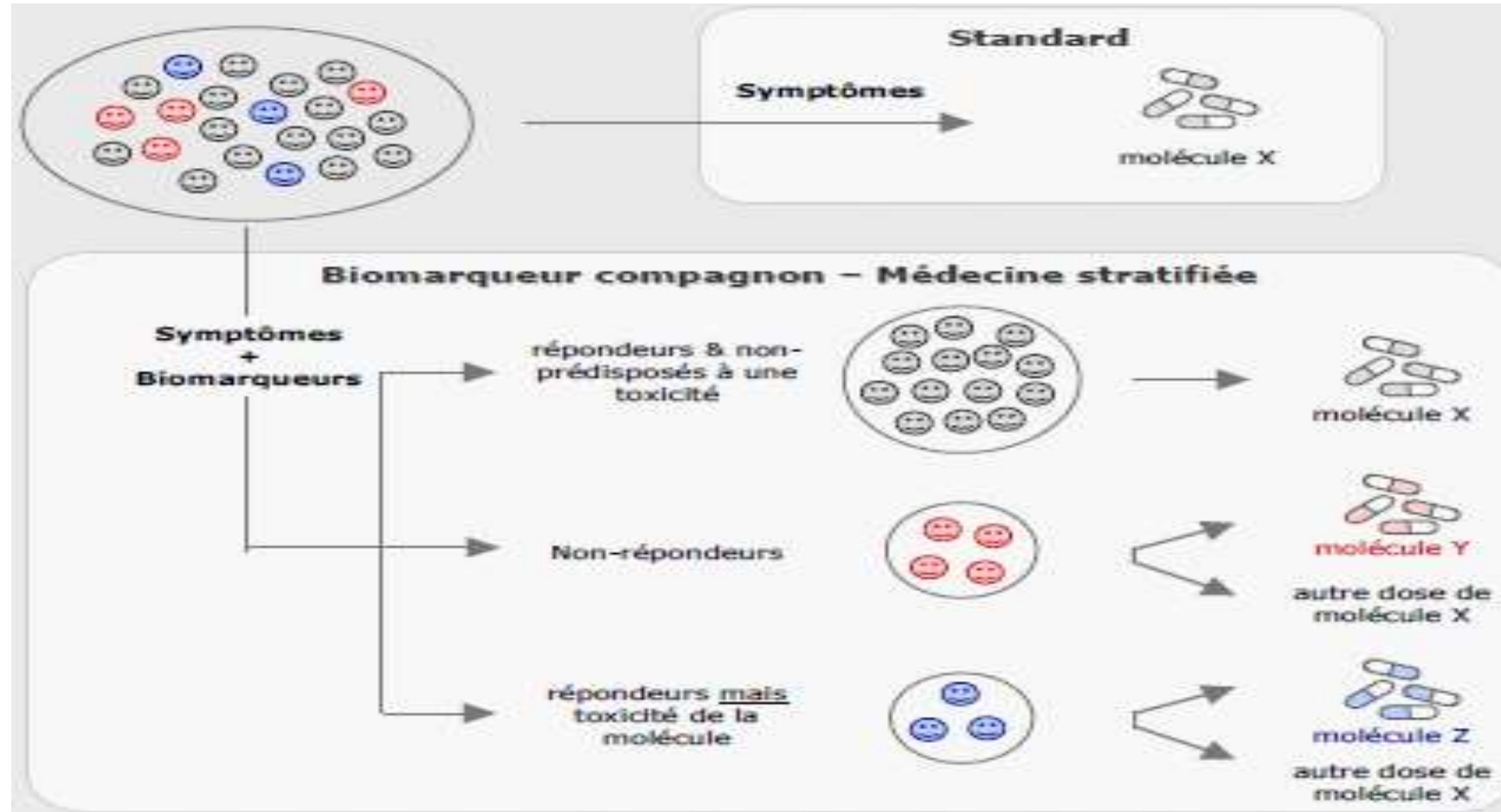
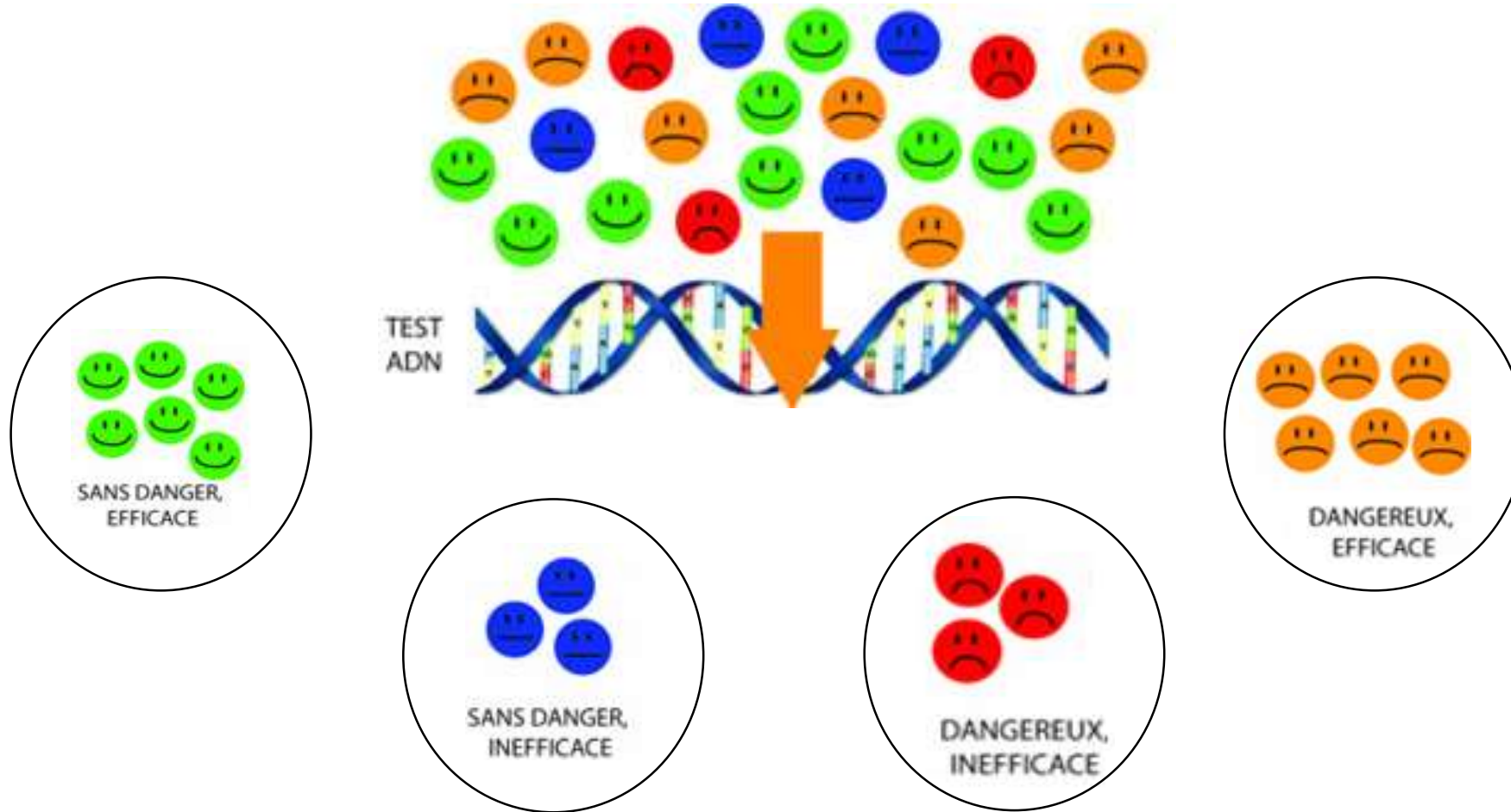


Figure : Coût total de la recherche et du développement d'un médicament chimique ou biologique jusqu'à sa mise sur le marché (en millions de dollars base 2011)

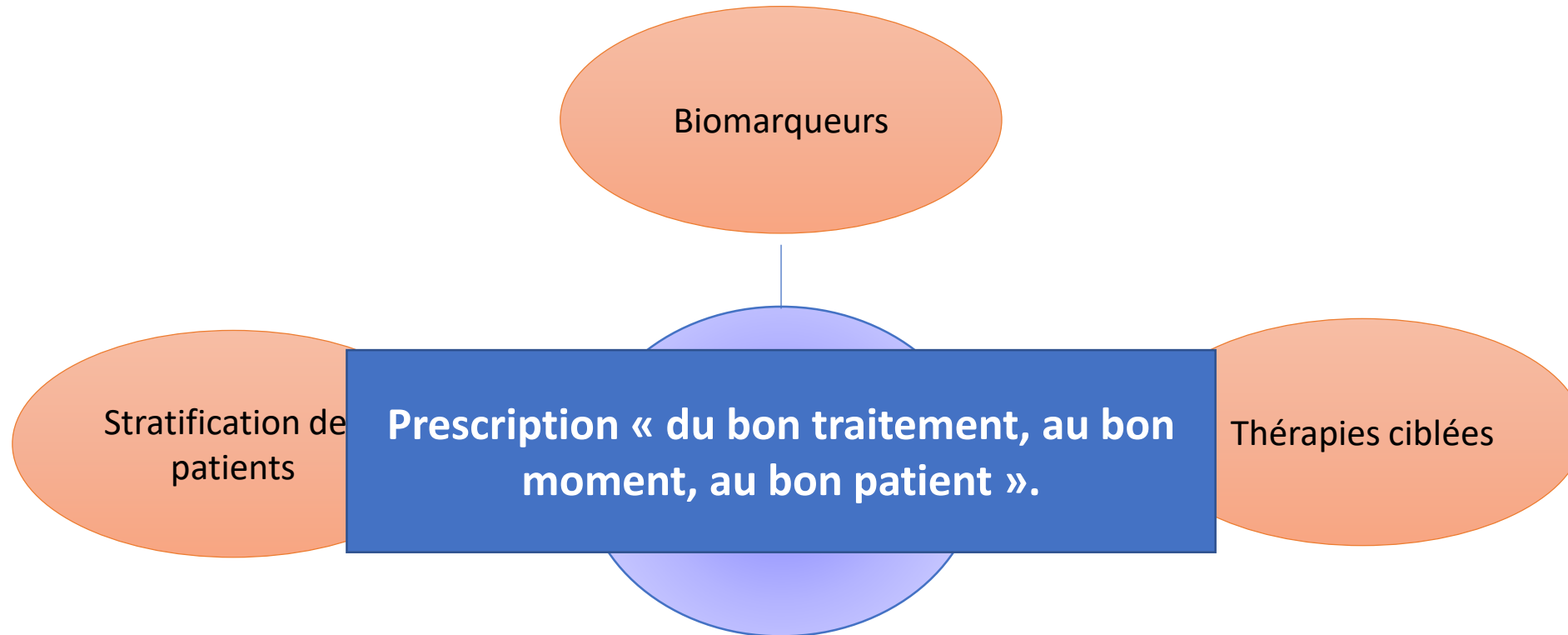
# Représentation des approches traditionnelles et de la médecine stratifiée basée sur l'utilisation des biomarqueurs



# Du diagnostic au Théranostic



# Nouveau paradigme



- Objectifs** :
- Optimiser la réponse au traitement des patients
  - Développements accélérés de nouvelles thérapies
  - Des coûts de développement réduits pour les industriels

# Theranostic / Médecine de précision

- **Néologisme** : « thérapeutique » + « diagnostic »
- **Applications**
  - Identification des patients les patients les plus susceptibles de bénéficier d'un traitement spécifique
  - Identification des patients susceptibles de présenter un risque accru d'effets indésirables graves en réaction
  - Contrôle et surveillance de la réponse au traitement
- **Finalités**
  - Stratifier les patients et Adapter les traitements
  - Développer des médicaments plus efficaces et plus sûrs
  - Rationaliser les stratégies thérapeutiques

# Thérapies ciblées et Biomarqueurs

## Exemple : biomarqueur EGFR et inhibiteur TKI (gefitinib) / cancer du poumon non à petites cellules

*inhibiteur du récepteur du facteur de croissance épidermique*

### 2003

→ AMM dans le traitement du CPNPC aux Etats-Unis (Iressa®)

### 2004

- Manque de preuves de l'efficacité du gefitinib sur la survie globale des patients en phase III
- En association avec la chimiothérapie ou en monothérapie dans le traitement des atteints d'un CPNPC
- Retrait du marché aux Etats-Unis

### 2009

- Résultats de l'essai de phase III (IPASS) ciblant des patients dont la tumeur présentait un statut EGFR muté (biomarqueur / cible thérapeutique)
- Critère principal : Survie sans progression
- **AMM « conditionné à la présence du biomarqueur » en Europe ( mutation EGFR exons 18 à 21)**

### 2016

- TKI de 3<sup>ème</sup> génération ciblant la mutation de résistance aux TKI EGFR de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>e</sup> génération (EGFR T790M)
- **AMM « conditionné à la présence du biomarqueur EGFR T790M**

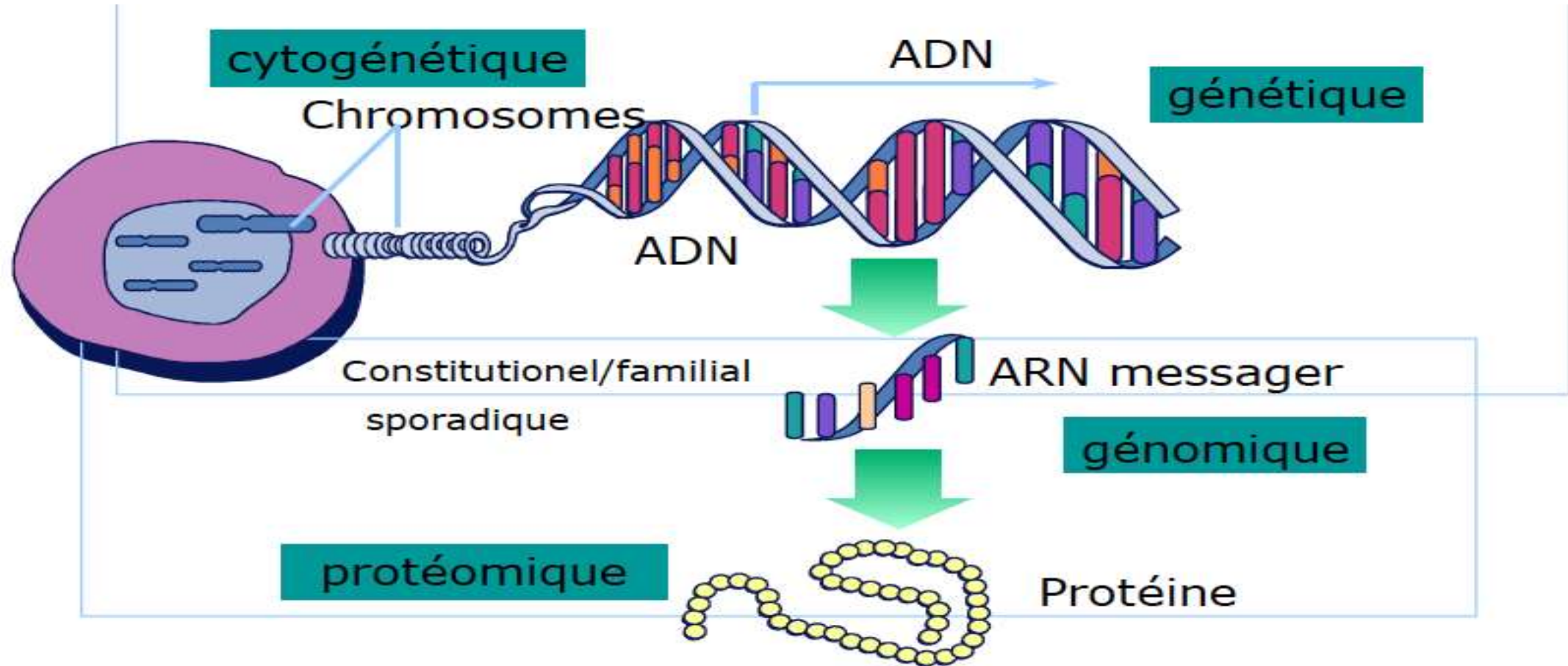


# La médecine de précision en oncologie

- Génétique du cancer

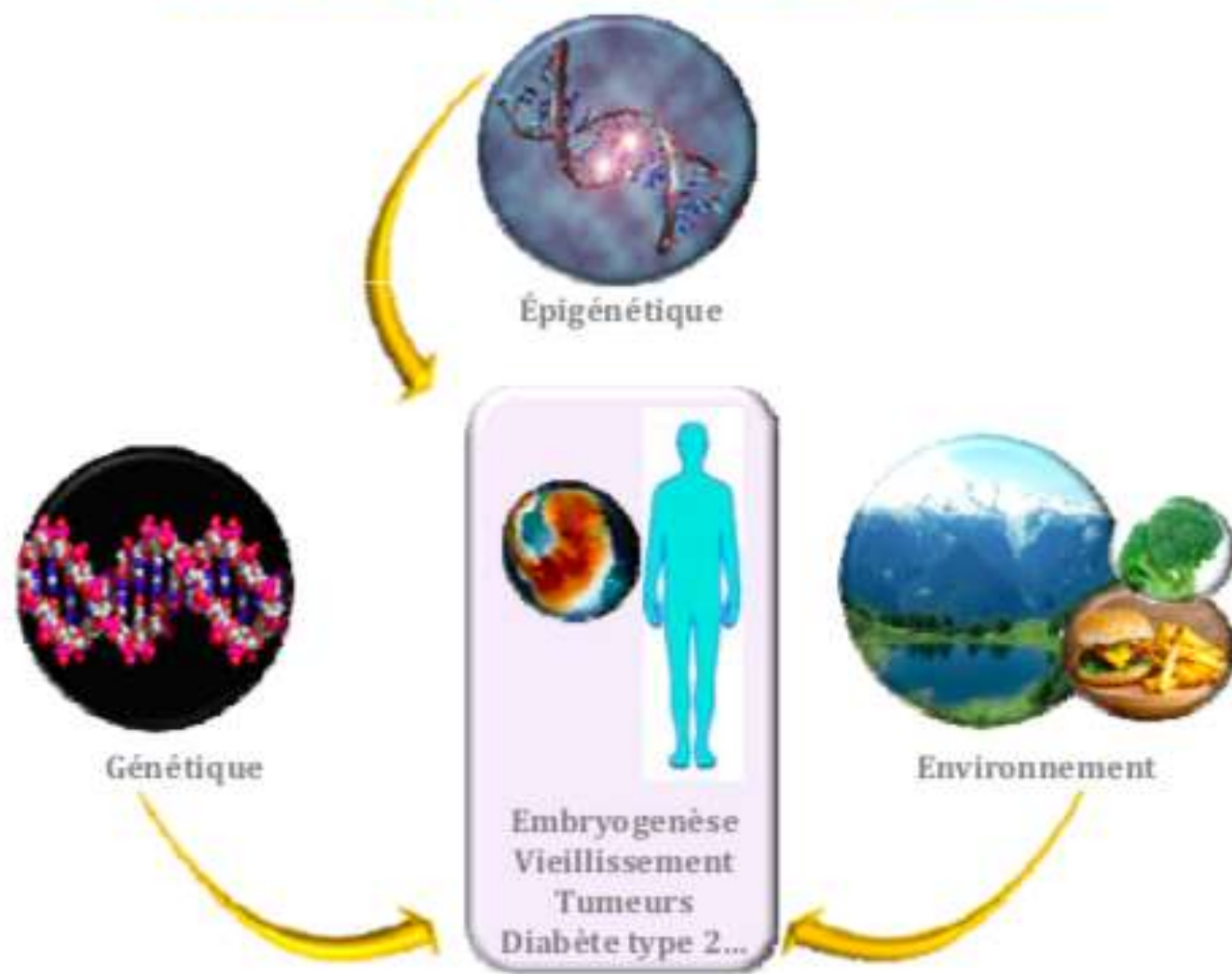
# La médecine de précision en oncologie (maladie multigénique)

## Gène / fonction protéique / fonction biologique



-> connaissance/technologies d'analyse/thérapeutiques

## Génétique, épigénétique et environnement



# Les séquences de la maladie cancéreuse

La cellule cancéreuse

**Présente des anomalies chromosomiques**

**Ne s'arrête plus en phase G1**

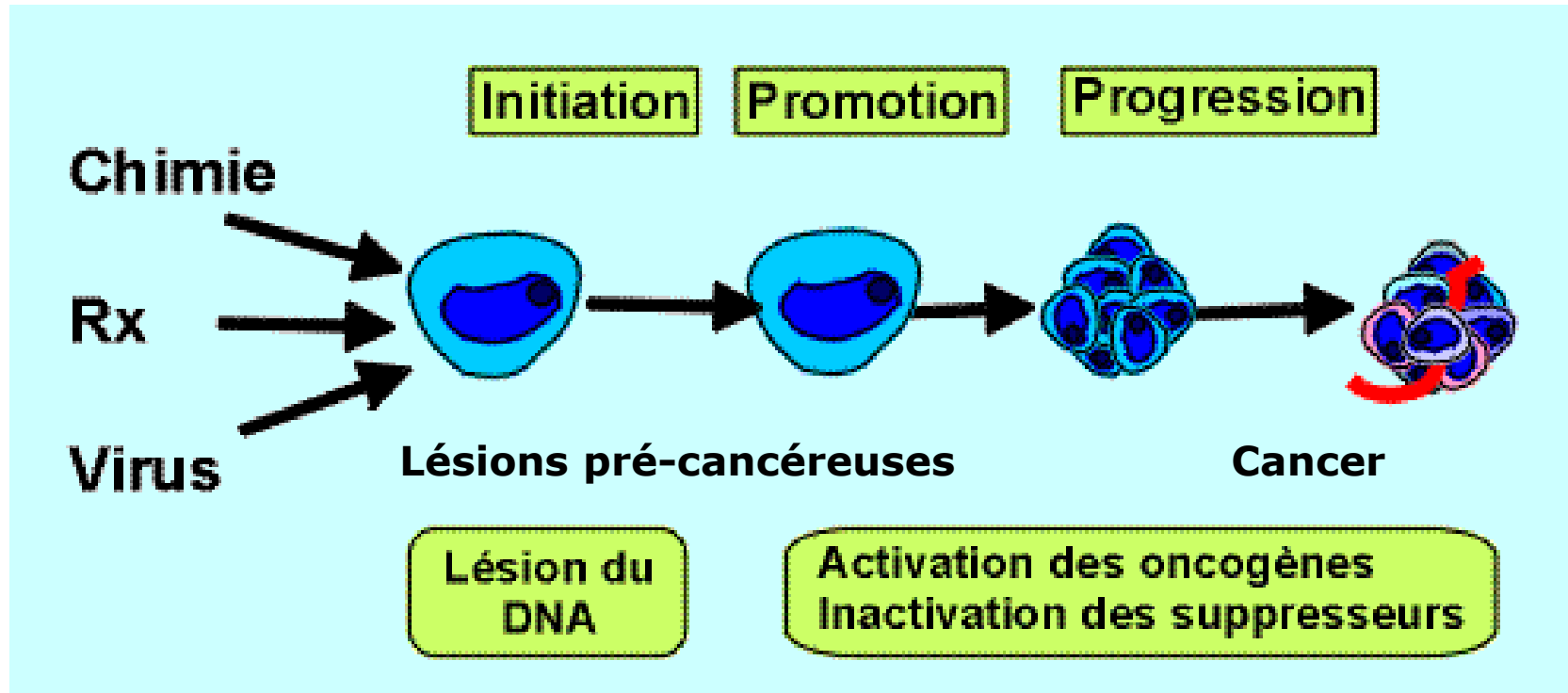
**Se divise sans signaux facteurs de croissance**

Présente au niveau microscopique

des altérations morphologiques

une perte de l'inhibition de contact

une perte d'adhérence cellulaire

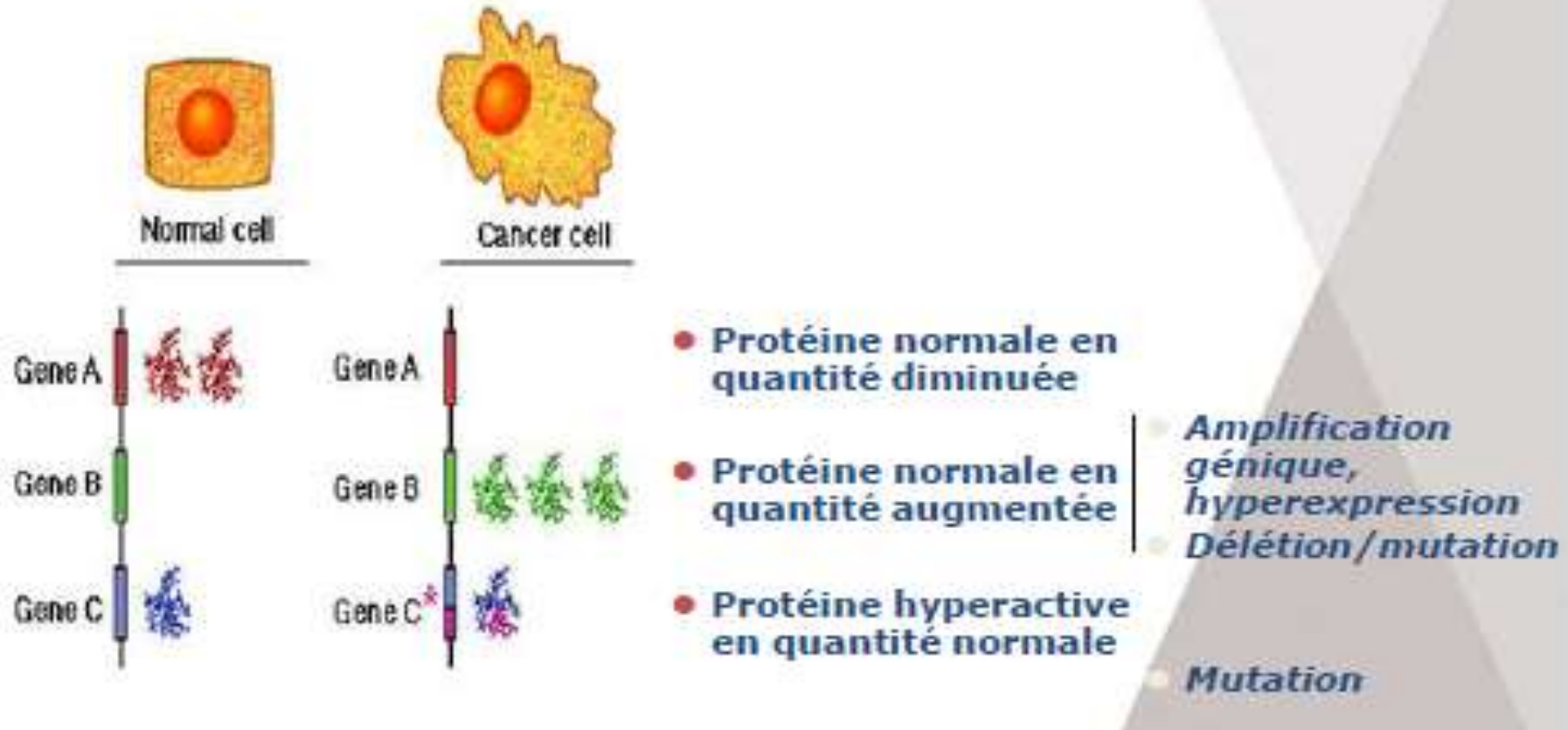


Chez un hôte avec ou sans prédisposition génétique à développer un cancer

# Différents types d'anomalies génétiques -> altérations des fonctions des protéines

## Généralités sur le Cancer

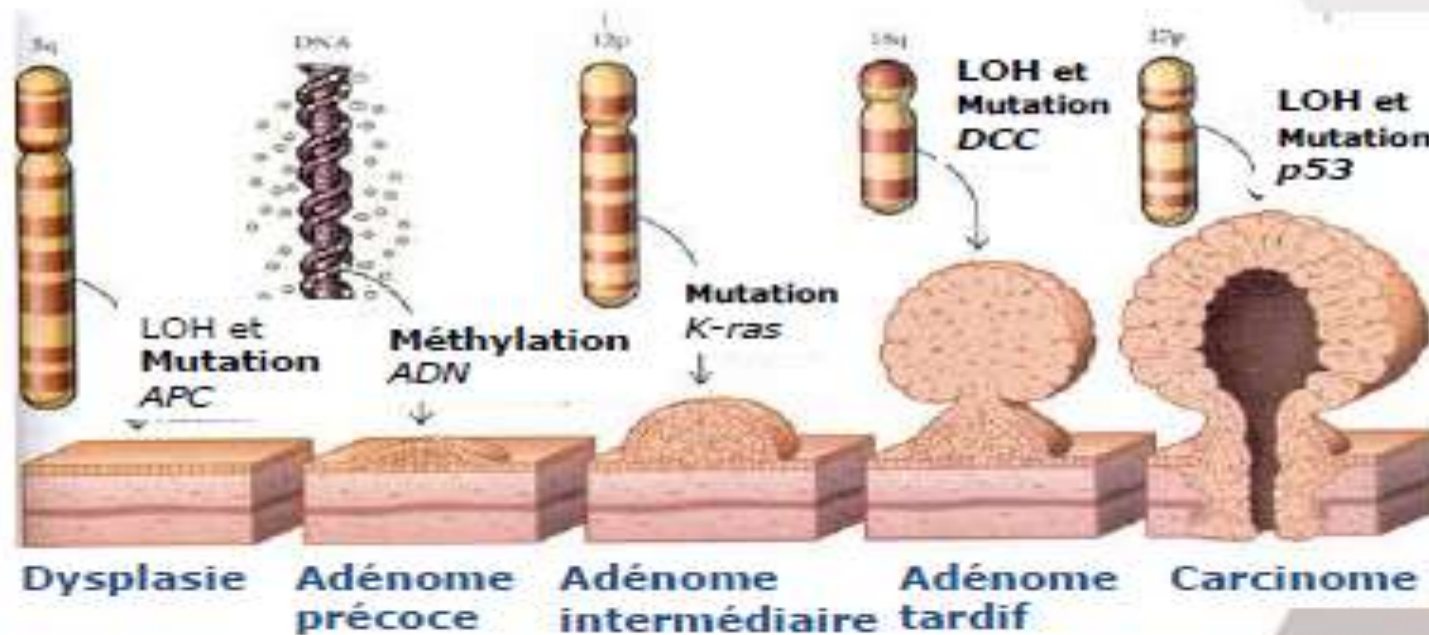
➤ *Le Cancer est une maladie multigénique*



Une modification génétique initiatrice -> accumulation d'anomalies génétiques fonctionnelles -> conséquences cellulaires et tissulaires

## Généralités sur le Cancer

### ➤ Les différentes étapes de la progression tumorale

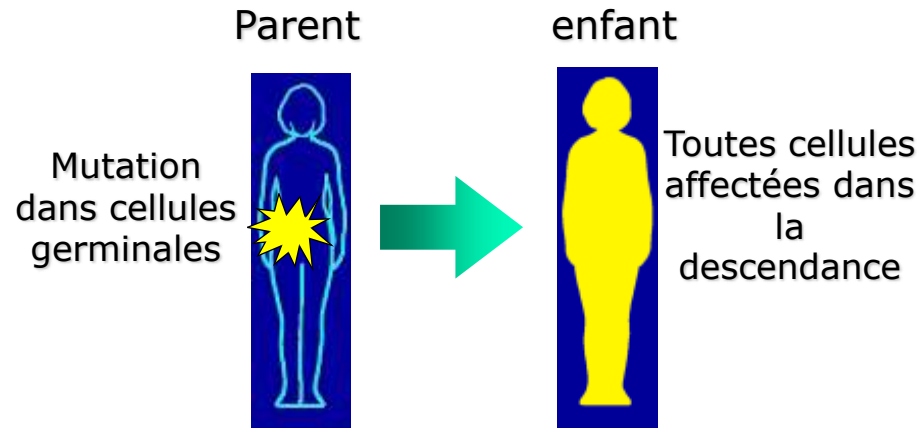


LOH : loss of heterozygosity

# Bases moléculaires du cancer

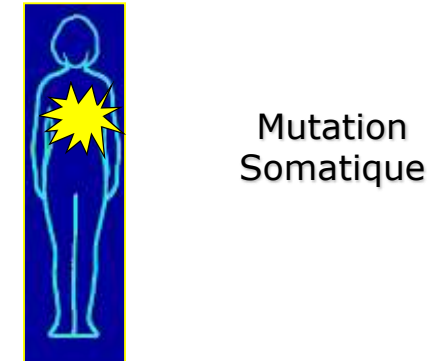
- Les anomalies génétiques constitutionnelles versus somatiques (prédisposition génétique / Cibles thérapeutiques)

## Mutation Germinale



- présent dans les cellules germinales
- est transmise
- responsable de cancers héréditaires (~5 %)

## Mutation Somatique



- Survient dans les tissus non-germinaux
- Non transmise
- responsable de cancers sporadiques (> 90 %)

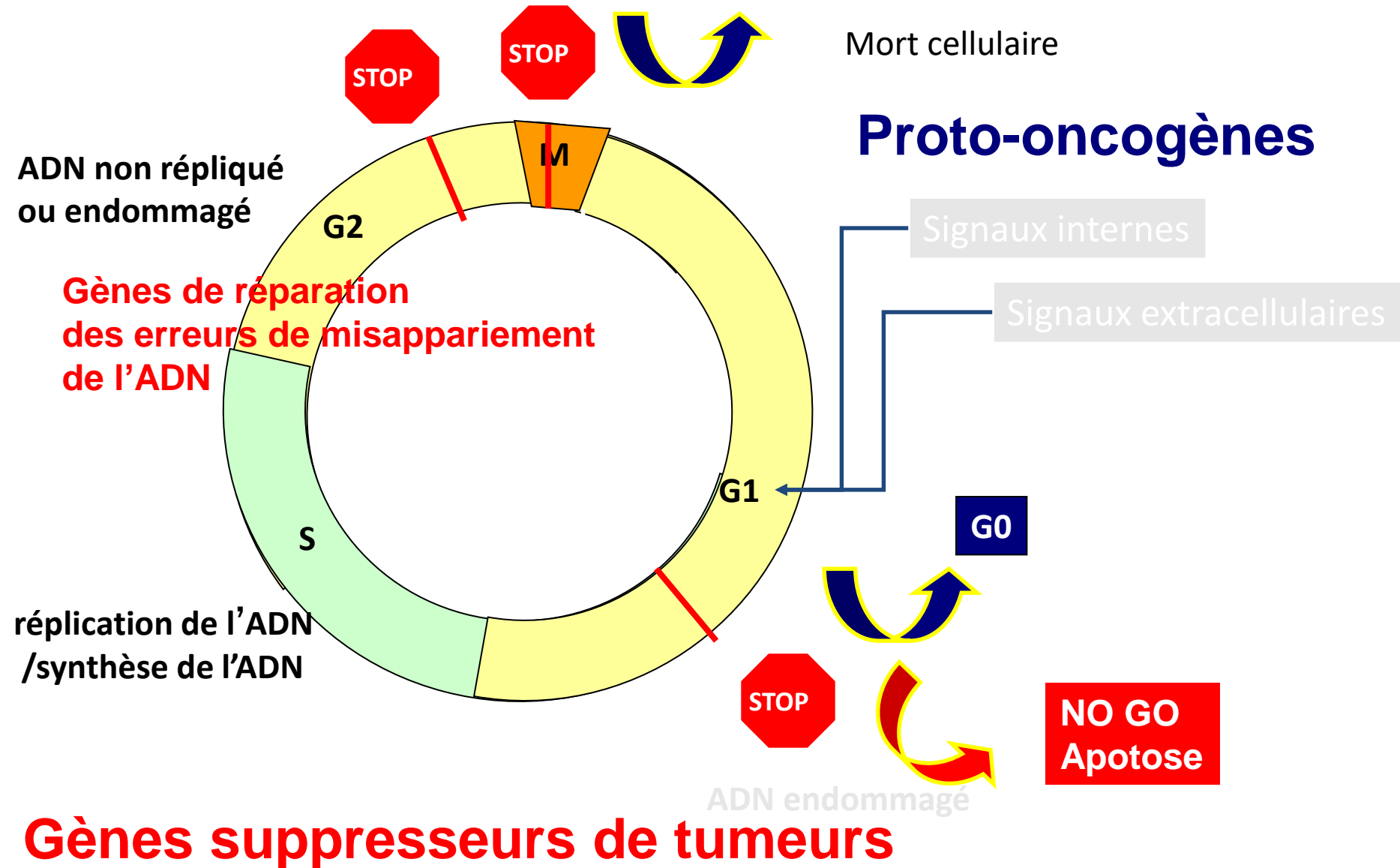
# Les gènes de cancer



## La division cellulaire est sous contrôle en permanence

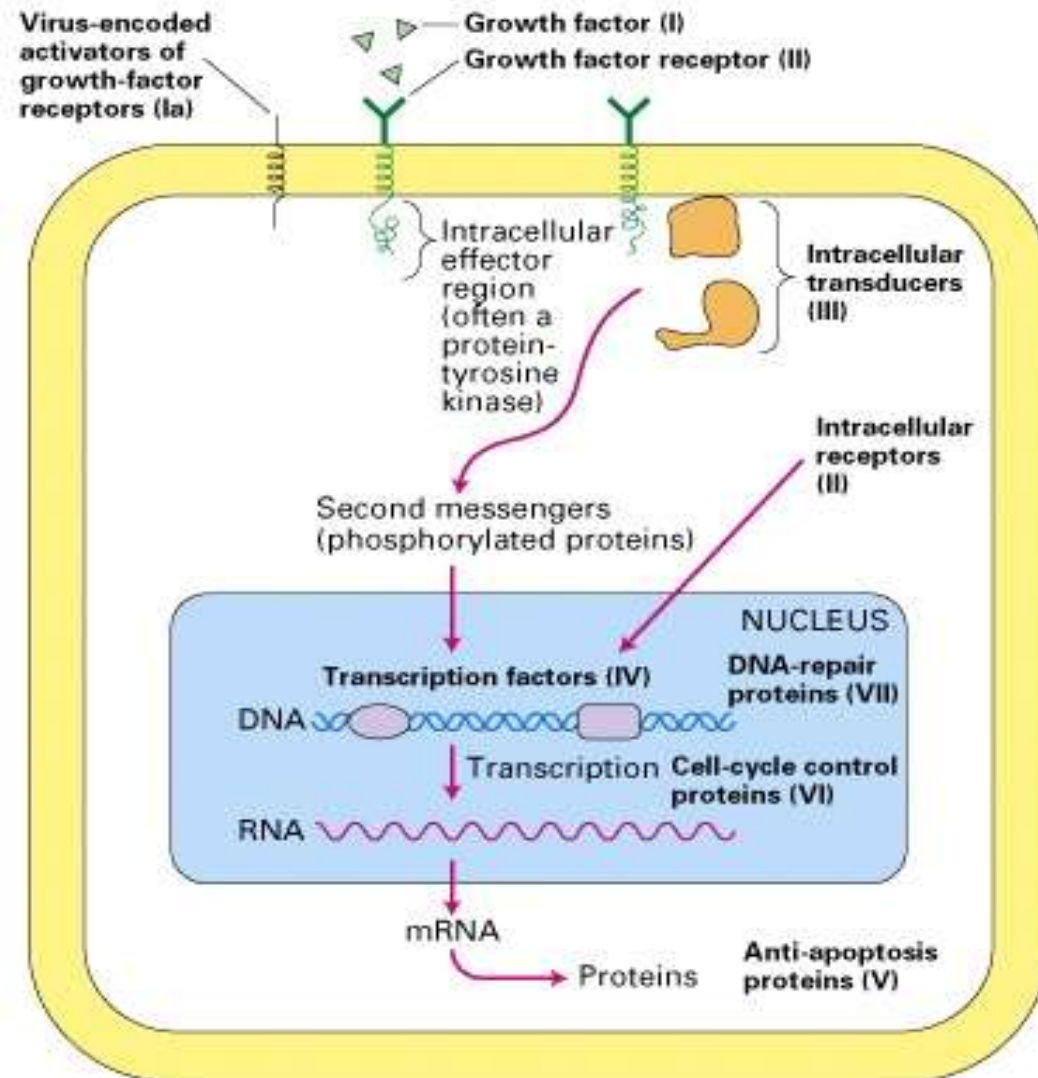
- Signaux protéiques on/off (milieu extracellulaire, intracellulaire) selon les besoins de la cellule
- > **voies de signalisation** (encodé par **proto-oncogènes**) :  
système ON
- Systèmes de **surveillance de l'intégrité** du génome et de **réparation des erreurs de séquence de l'ADN**
- -> encodé par des **gènes suppresseurs de tumeur**  
Système OFF
- **Apoptose**

# 1. Des points de contrôle du cycle cellulaire : les proto-oncogènes / oncogènes



## Proto-oncogènes, acteurs (positifs) du cycle cellulaire pour déclencher la réplication de l'ADN

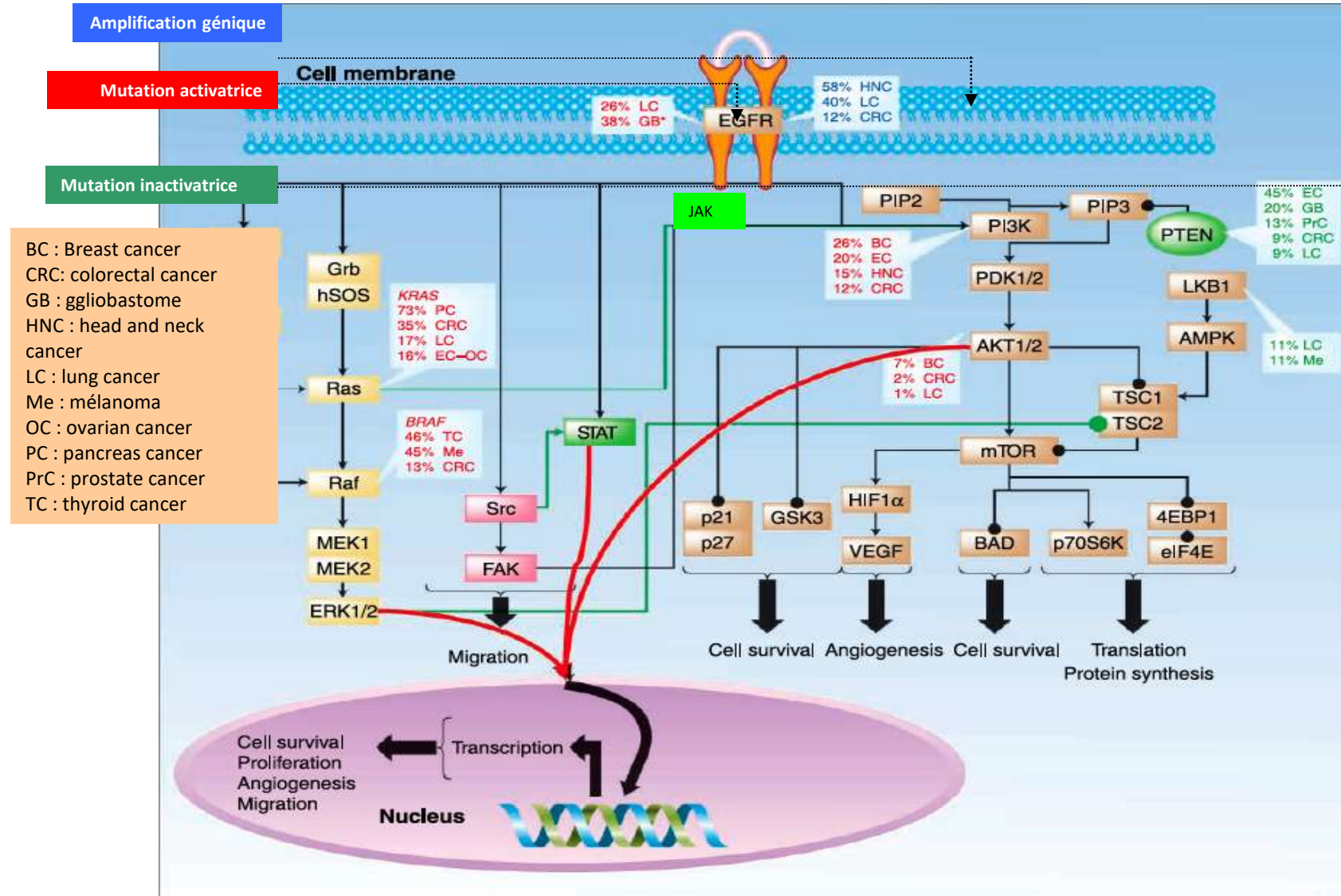
- types de protéines
  - Facteurs de croissance
  - Récepteurs Membranaires et Nucléaires
  - Protéines de transduction du signal
  - Facteurs de transcription
  - Facteurs pro et anti-apoptotiques
  - Protéines de contrôle du cycle: Cdk, proto-oncogènes, gènes suppresseurs de tumeurs (p53)



# Exemple de la voie de prolifération des MAP KINASES (EGFR/RAS)

## Nécessaires à l'introduction de la mitose

## Anomalies fréquentes dans cancers côlon, poumon, mélanome, ..

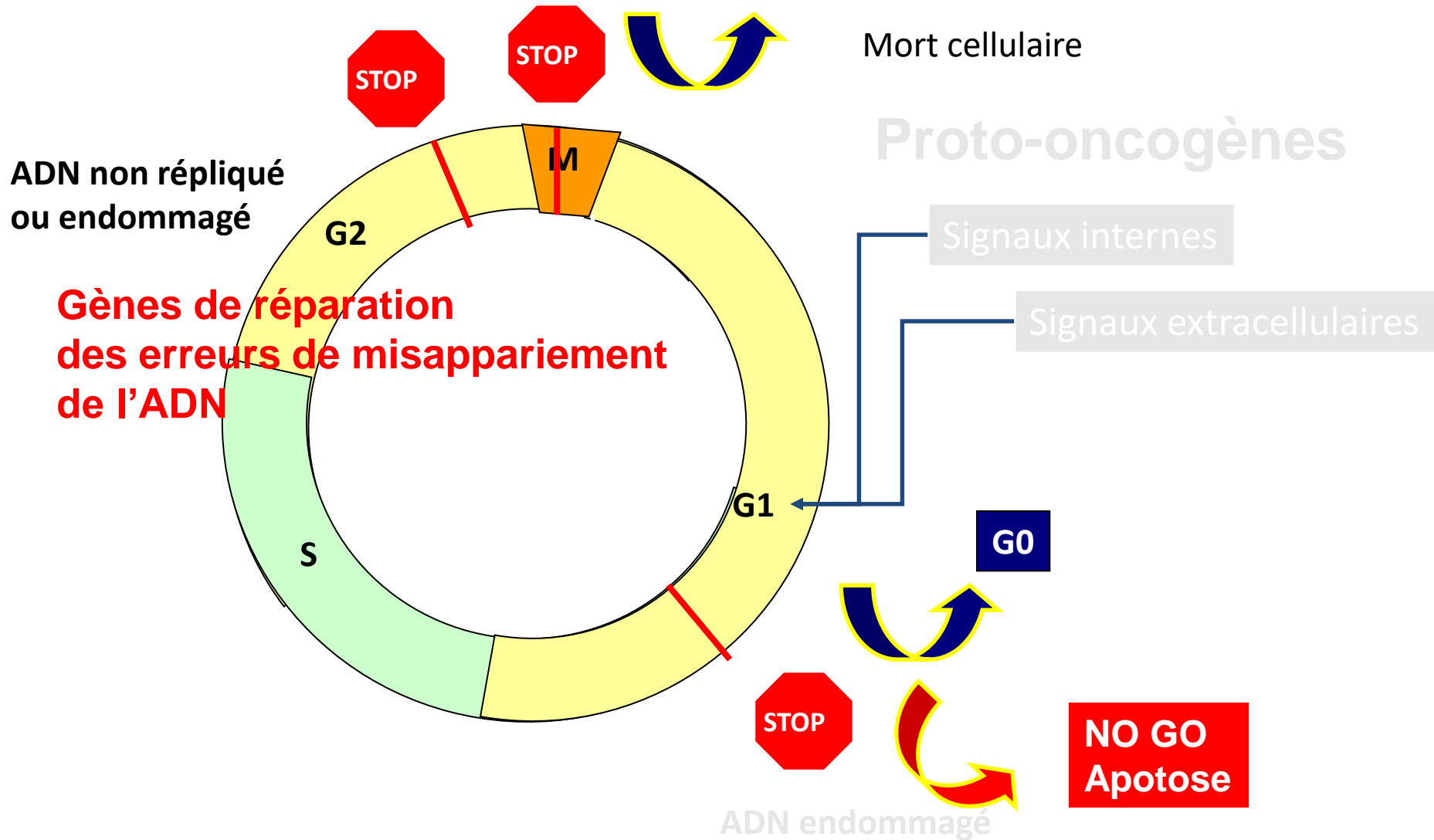


1. Laurent-Puig P., Lievre A., Blons H. Mutations and response to epidermal growth factor receptor inhibitors. Clin Cancer Res 2009;15:1133-9

2. Li W.X. Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling. Trends in cell biology 2008;18:545-551

## 2. Des points de contrôle du cycle cellulaire

### Gènes suppresseurs de tumeurs

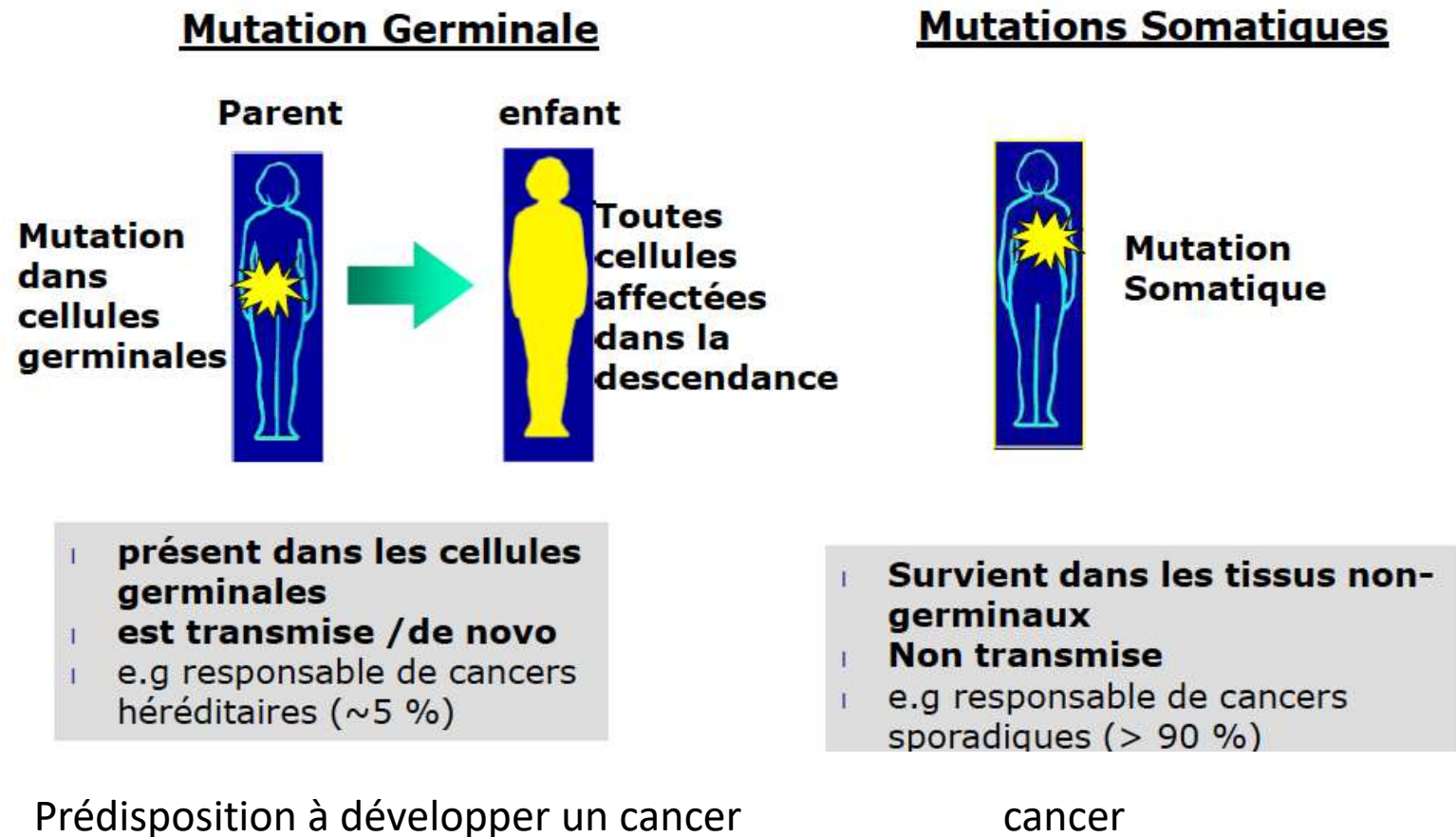


Contrôle de la prolifération / mort cellulaire

# Maladie monogénique / multigénique

-> conséquences sur expression et fonctions protéiques

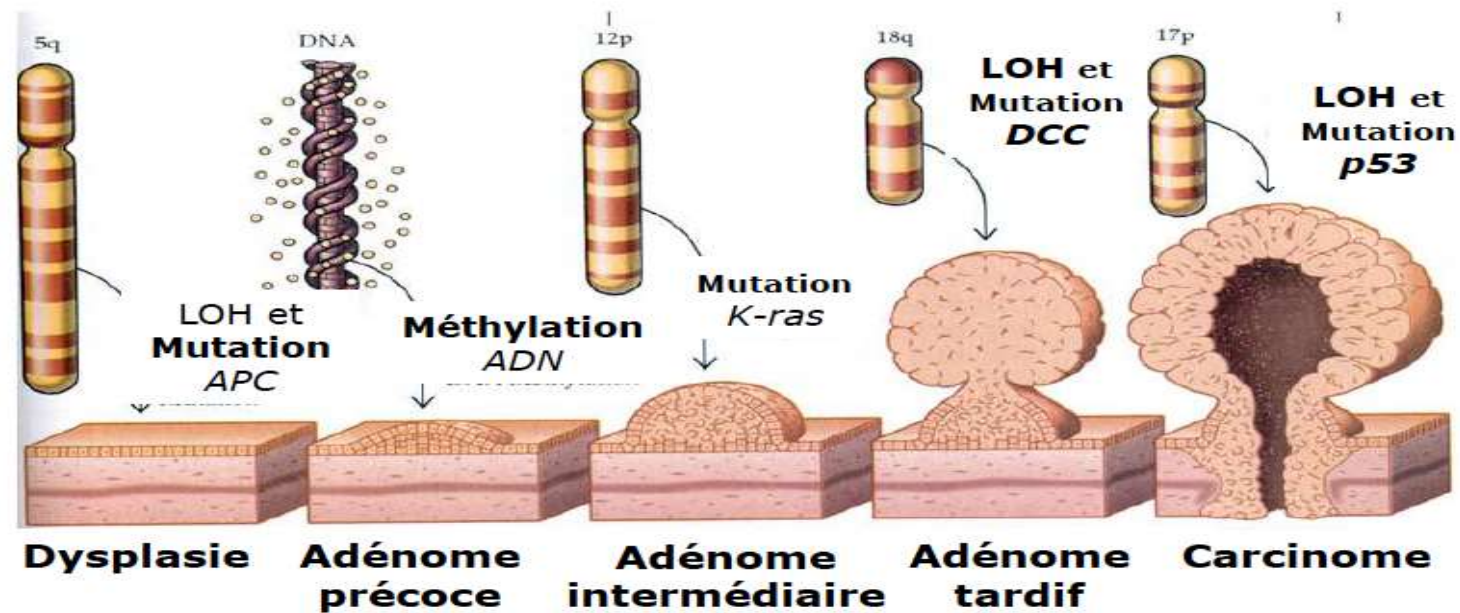
## ➤ Les marqueurs moléculaire / Génétique



-> Connaissance maladies / dépistage diagnostic/ prédiction thérapeutique

# Séquences des anomalies de gènes de cancer (oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur) exemple de la cancérogenèse colorectale

## ➤ La compréhension des bases moléculaires des maladies



- La compréhension des différentes étapes de la progression tumorale a permis un « démembrement » moléculaire des tumeurs.

*Adapté de Fearon ER. Cell 61:759, 1990*

**KRAS oncogène (1990) -> prédictif des anticorps monoclonaux anti-EGFR (2004)**

# Addiction oncogénique / médecine personnalisée

## Théranostic (thérapeutiques-diagnostic)

### Recherche fondamentale

~ 1975  
~ 1980  
~ 1990

Oncogènes / prolifération  
Gènes suppresseur tumeurs  
apoptose/angiogenèse

### Addiction oncogénique

Récepteurs  
Tyrosine kinase

CIBLES

moléculaires

### Thérapeutiques ciblées

2000 Herceptin/Sein (HER2)  
2001 Imatinib/LMC (BCR/ABL)  
2004 (20% ->88% OS à 6 ans)  
Cetuximab/Côlon (KRAS)  
Panitumumab/anti-EGFR  
2009 Gefitinib/ADKm poumon (EGFR) / erlotinib  
Première ligne CT

Médecine personnalisée (de précision)

Agence européenne du Médicament: environ 15 molécules (en 2011)

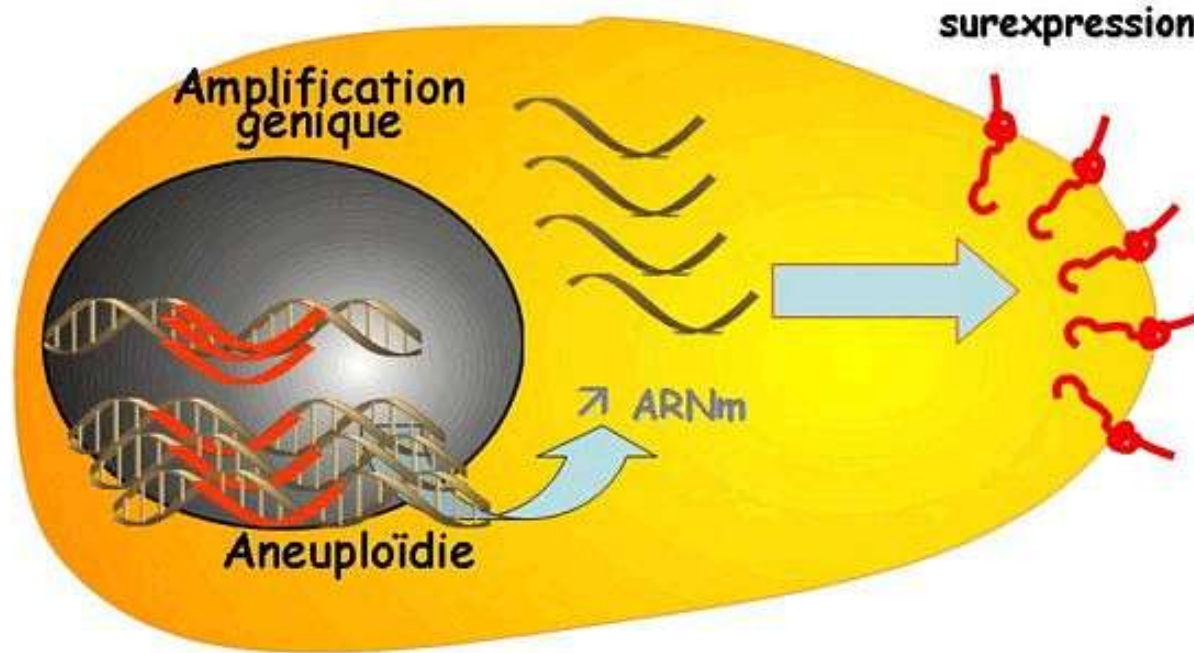
Thérapeutiques ciblées : 57% du budget des anticancéreux (France)

Environ 40 en 2017





# Une thérapie ciblée... n'est active que si la cible est exprimée !

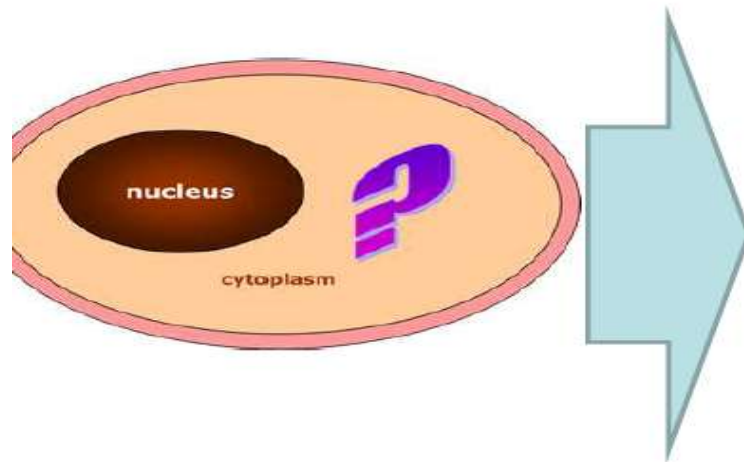


**Ciblage moléculaire: gène EGFR , ARN et Protéine**

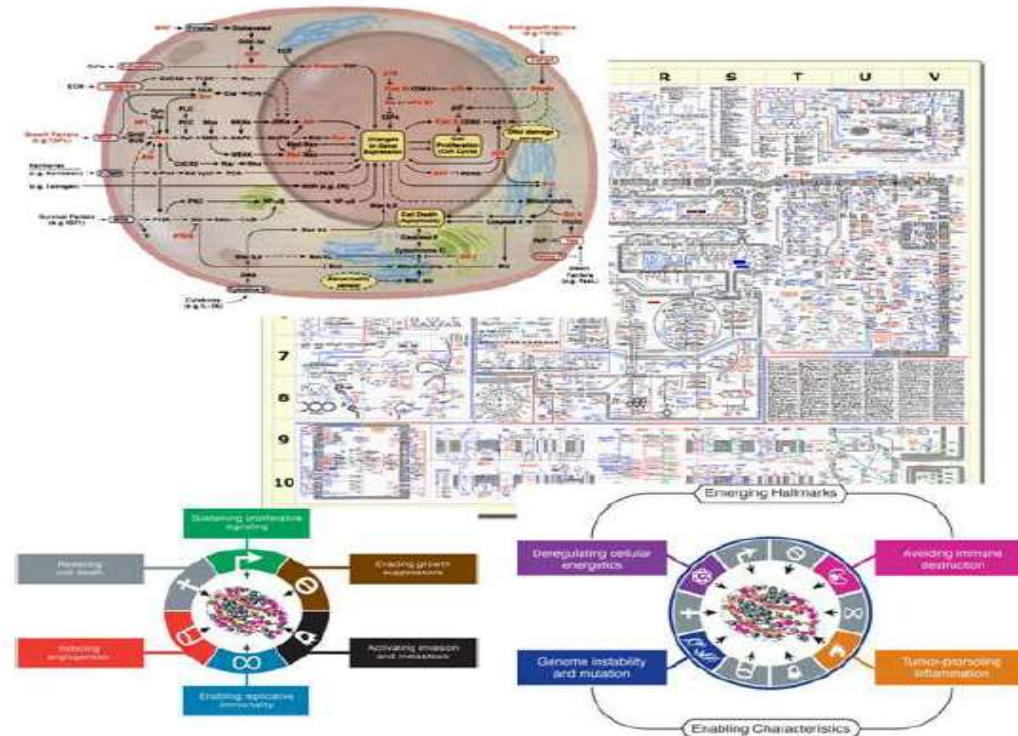
Inhibition de l'addiction oncogénique -> mort cellulaire  
Intérêt de rechercher la cible (biomarqueur) chez chaque individu

# Un approfondissement des connaissances biologiques et physiopathologiques

La cellule en 1975



La cellule en 2000



Weinberg & Hanahan, The hallmarks of cancer Cell 2000; 100: 57-70.

➤ **des réseaux biologiques complexes**

# Plan

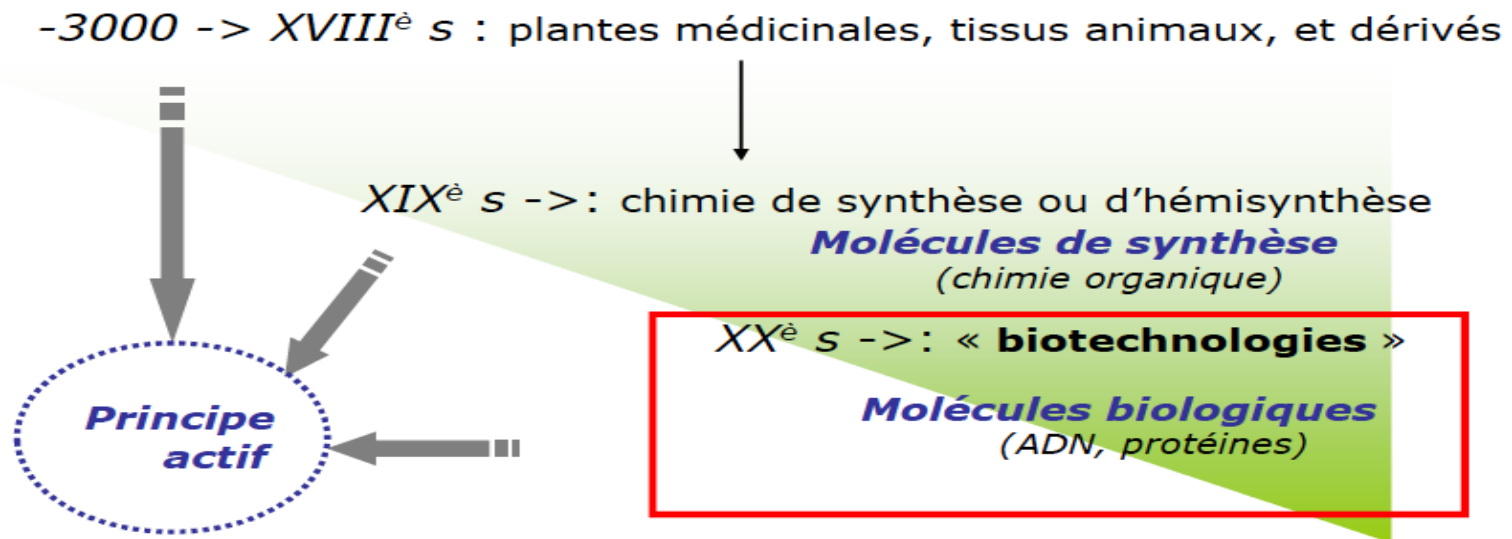
- Innovations /Développement de médicaments
  - Thérapies ciblées/ Anticorps monoclonaux, TKI

# Innovation thérapeutique

## ➤ **Histoire (courte) de la thérapeutique**

- *Les grandes étapes de l'histoire des médicaments : d'un principe actif dans un milieu complexe (ex : extrait végétal) à la molécule biologique active (ex : anticorps).*

*Préhistoire* : « Médecine » empirique



# Innovation thérapeutique

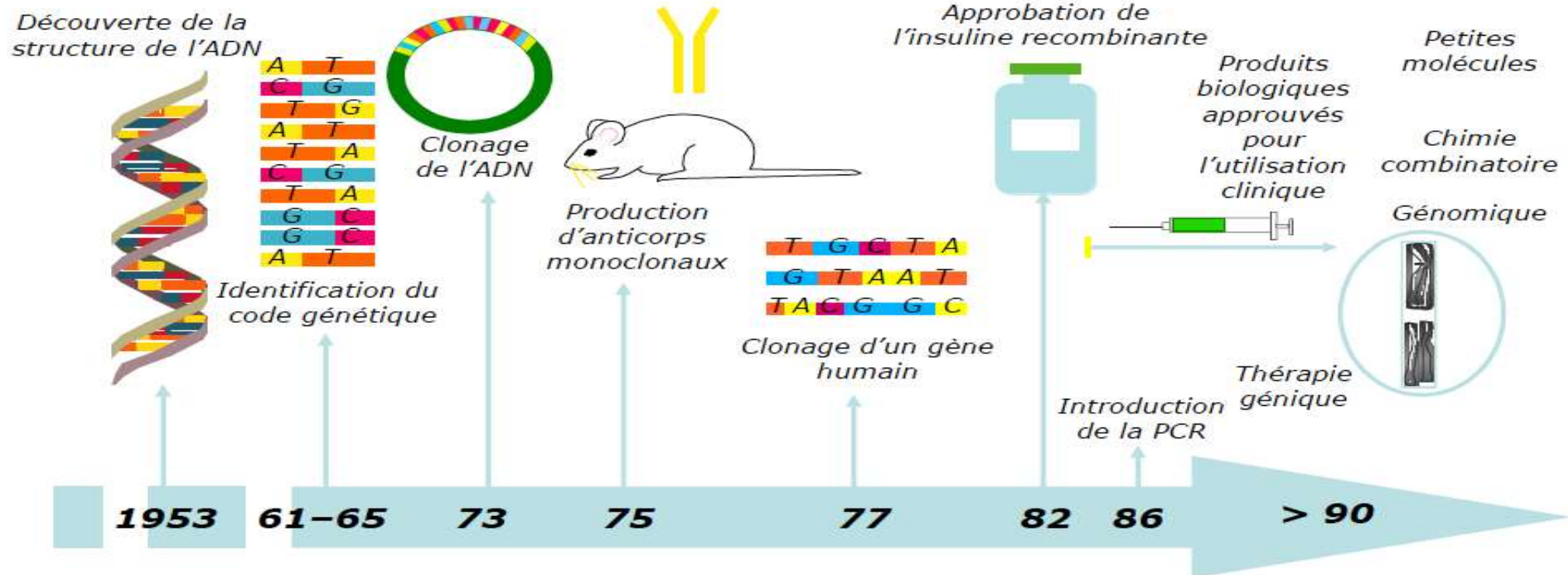
## ➤ **Histoire (courte) de la thérapeutique**

- La biotechnologie trouve ses racines aux débuts de l'agriculture (**fermentation**). Au XIX siècle, elle devient une « science » en démontrant le rôle de la **cellule vivante** dans la transformation biochimique.
- A partir de 1950, le développement de la technologie de **l'ADN recombinant** fonde la biotechnologie contemporaine.

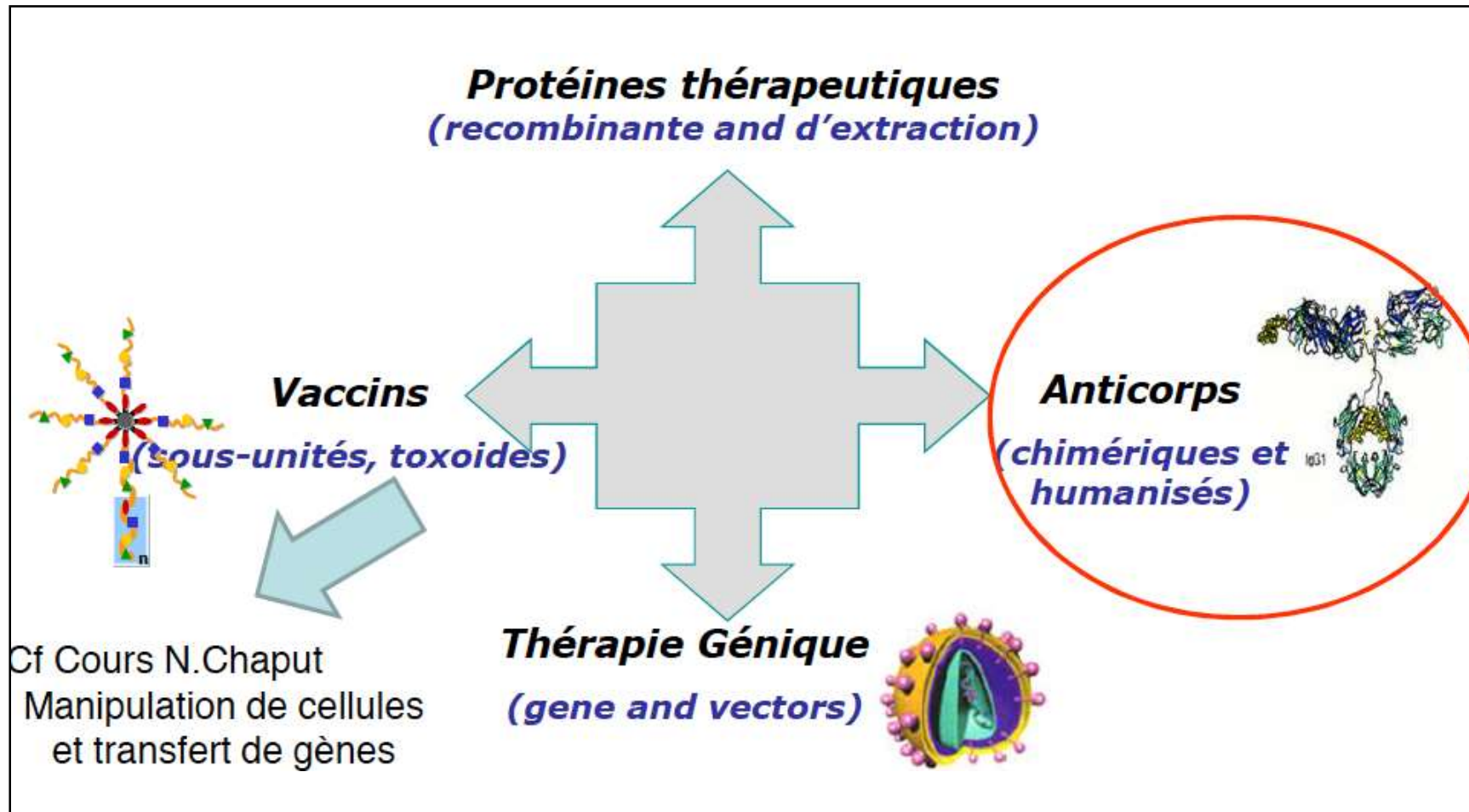
<b>&lt; -3000</b>	La fermentation alcoolique ( <i>Egypte, Bible</i> )
<b>VI<sup>e</sup> siècle</b>	Brassage, fermentation du pain
<b>Vers 1680</b>	Microscope : observation des cellules ( <i>Leuwenhoek</i> )
<b>1860-1890</b>	Premiers procédés de culture ( <i>Pasteur, Koch</i> )
<b>1900-1920</b>	Utilisation d'enzymes pour applications techniques ( <i>Rohm, Takamine</i> )
<b>1929</b>	Découverte de la pénicilline ( <i>A Fleming</i> )
<b>1949</b>	Utilisation des transformations microbiennes à l'échelle industrielle
<b>1954</b>	Structure de l'ADN ( <i>Watson &amp; Crick</i> )
<b>1973</b>	Recombinaison génétique ( <i>Cohen &amp; Boyer</i> )
<b>1975</b>	Anticorps monoclonaux ( <i>Kohler &amp; Milstein</i> )
<b>2000</b>	Séquençage du génome humain

# Innovation thérapeutique

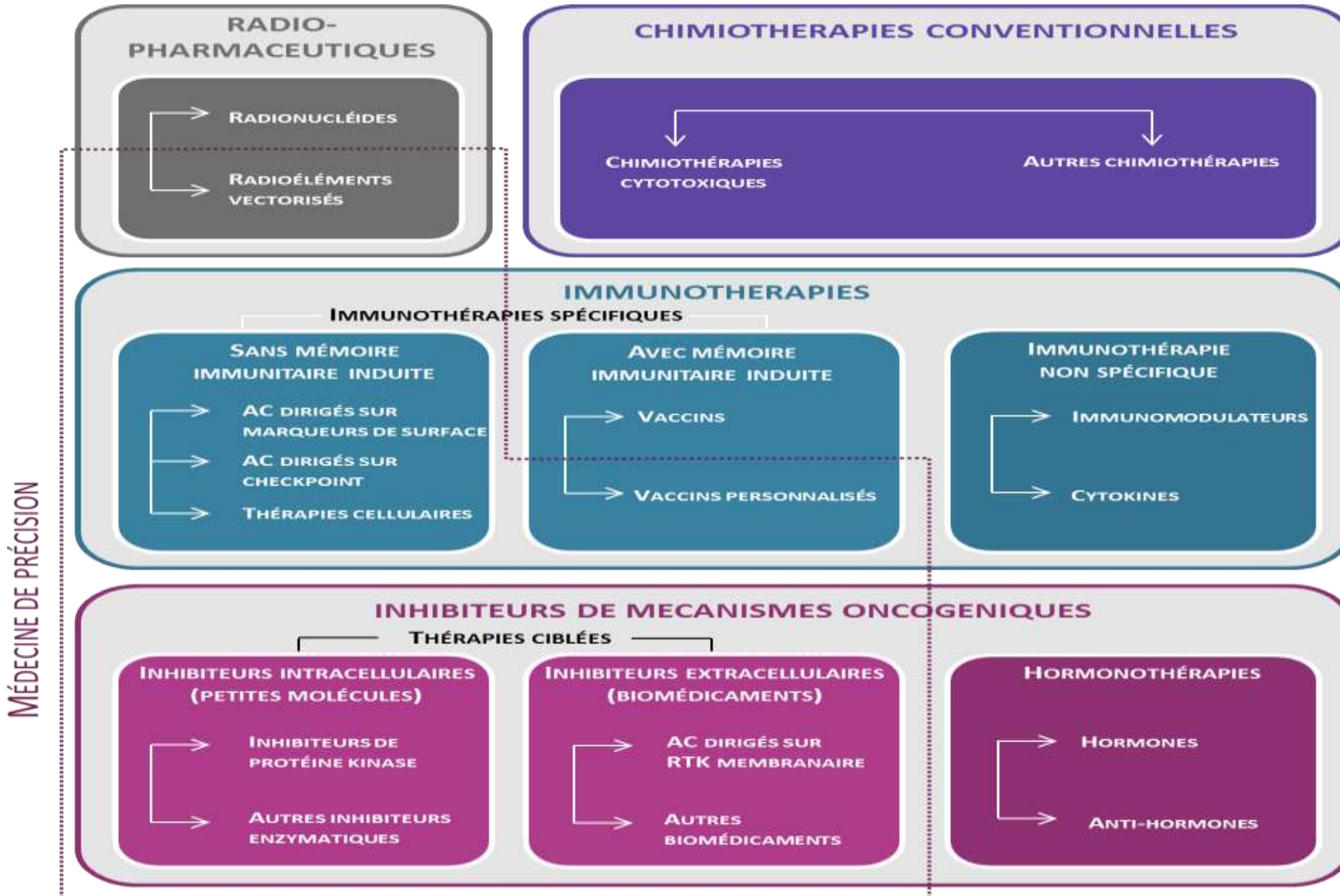
- L'ADN : molécule « mémoire » des êtres vivants
- Le génie génétique : manipulation et utilisation de l'ADN



# Thérapeutiques issues des biotechnologies

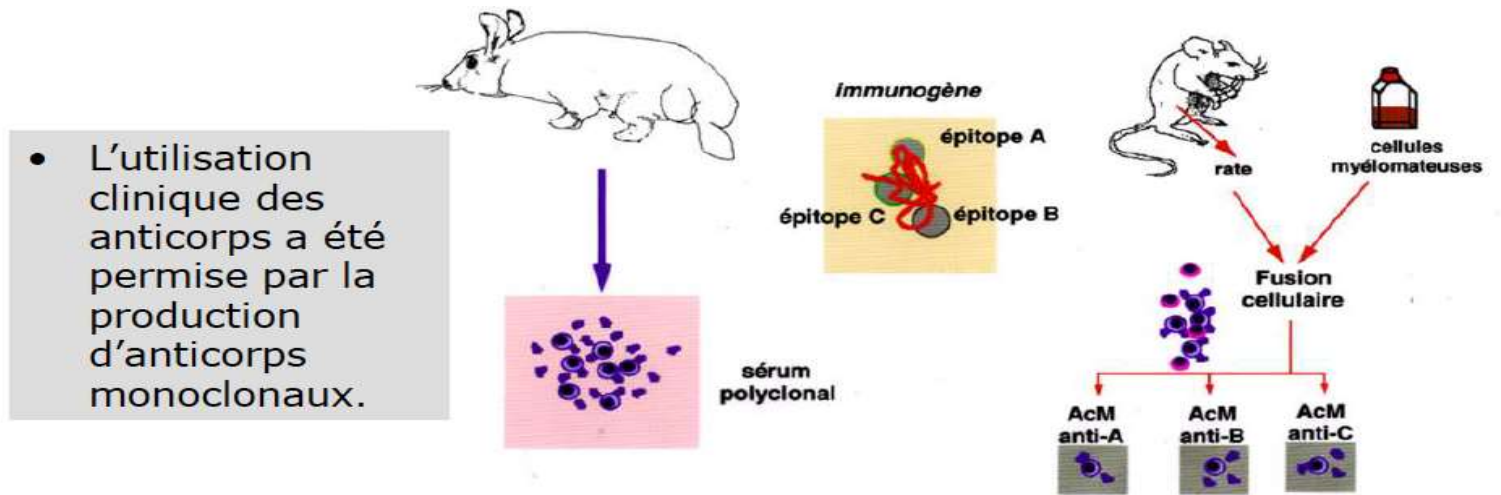


# Classes thérapeutiques plus « ciblées » sur les caractéristiques individuelles de la tumeur





# Les anticorps thérapeutiques

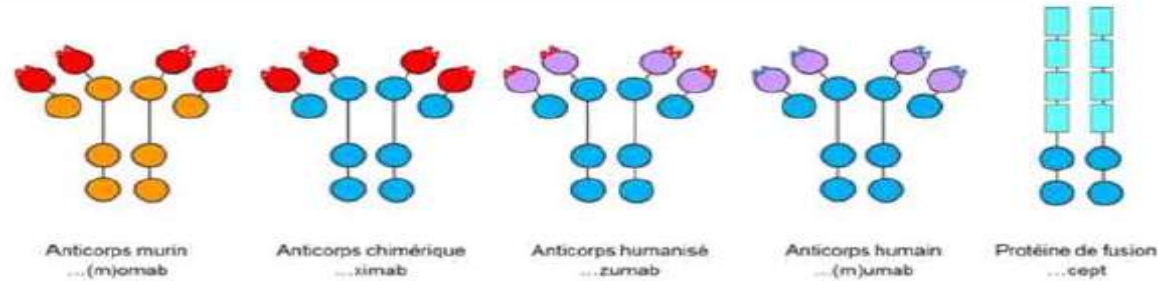
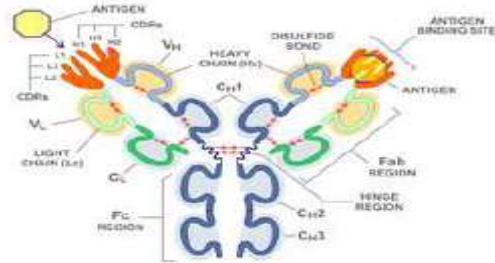


	<b><i>Polyclonal</i></b>	<b><i>Monoclonal</i></b>
<b>Avantages</b>	Faible coût Production rapide	Monospécifique Reproductible
<b>Inconvénients</b>	Non reproductible Non spécifique	Onéreux Production longue

Inoculation d'un antigène ou d'un haptène à un animal de laboratoire –  
> production de plasmocytes libérant des anticorps contre cet antigène.  
Conjugaison à des protéines immunogéniques.

# Les anticorps thérapeutiques

- L'ingénierie génétique a résolu les problèmes d'immunogénicité.

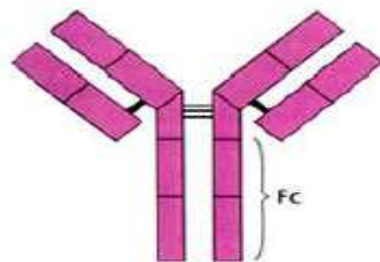


Type	Anticorps	Immunogénicité
Ac monoclonaux (murins)	xx <b>MO</b> mab <i>Edrocolomab</i> (EpCAM) <i>Tositumomab</i> (CD20)	80 % 70 %
Ac chimériques (muFv + huFc)	xx <b>XI</b> mab <i>Cetuximab</i> (EGFR) <i>Rituximab</i> (CD20)	5 % < 1 %
Ac humanisés (muCDR+ huFc)	xx <b>ZU</b> mab <i>Alemtuzumab</i> (CD52) <i>Trastuzumab</i> (HER2)	2 % < 0.1 %
Ac humains	xx <b>MU</b> mab <i>Panitumumab</i> (EGFR)	< 1 %
Prot. recombinante	Xxx <b>cept</b> <i>Aflibercept</i> (VEGF Trap)	faible

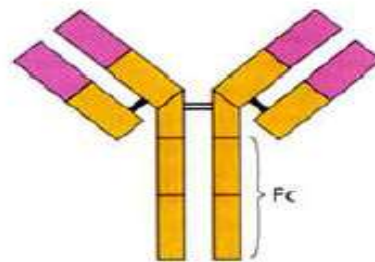
# Les anticorps thérapeutiques

- Un fragment d'anticorps a une demi-vie plus courte que l'Ac entier ; son élimination rapide évite les effets secondaires (hémorragie).

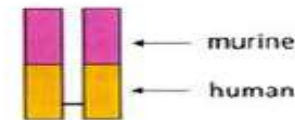
Nom	Nature	Cible	Mécanisme d'action	Indications cliniques
<b>Abciximab</b> (Reopro®)	ChimR IgG1 Fab	GPIIb	Empêche l'interaction plaquettes (GPIIb/IIIa) au récepteur $\alpha_v\beta_3$	Complications ischémiques au cours des interventions cardiaques



murine 7E3 IgG



chimeric 7E3 IgG



chimeric 7E3 Fab  
abciximab  
ReoPro

# Les anticorps thérapeutiques

- Principales utilisation des anticorps

## ***Applications***

### **Diagnostic**

- immunoanalyse, biocapteurs
- immunoscintigraphie

### **Thérapeutique**

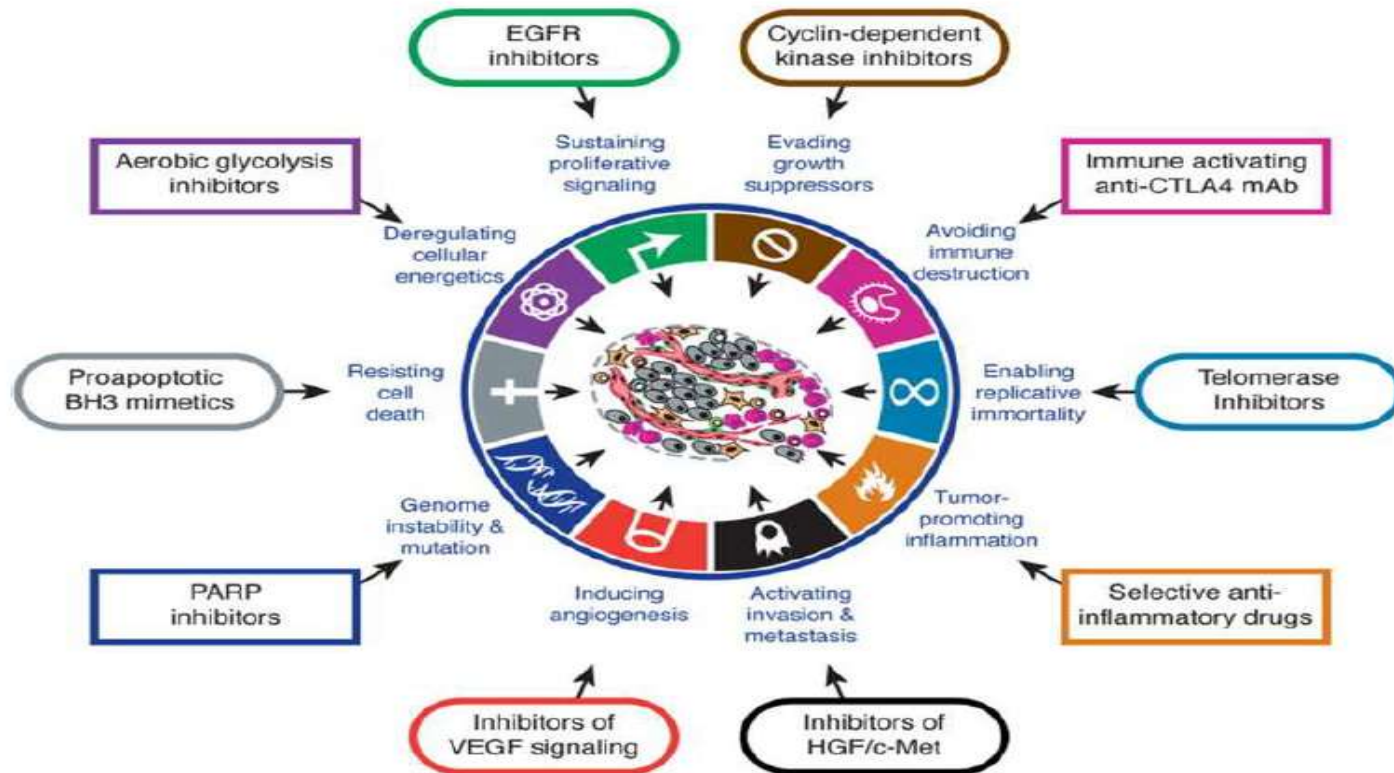
- cancer
- transplantation et greffe
- maladies immunologiques
- maladies infectieuses
- maladies cardiovasculaires

## ***Exemples***

*Trastuzumab, Bevacizumab, Rituximab*  
*Daclizumab (CD25), Basiliximab (CD25),*  
*Rituximab, Omalizumab, Efalizumab (CD11a)*  
*Polivizumab (VRS)*  
*Abciximab (GPIIB/IIIa)*

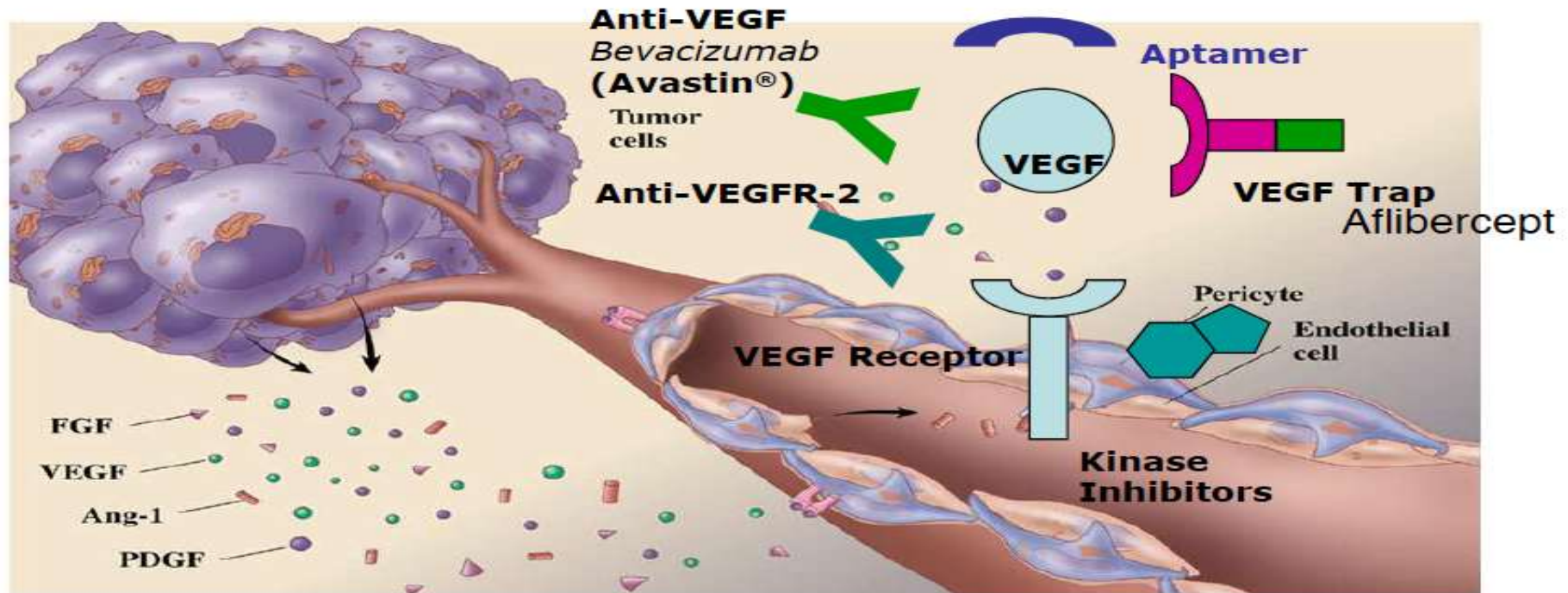
# Des anticorps monoclonaux, inhibiteurs de tyrosine kinase contre différentes voies cellulaires

➤ **des réseaux biologiques complexes, mais des cibles thérapeutiques**



# Les anticorps thérapeutiques

- Un anticorps dirigé contre un facteur de croissance (VEGF) de l'angiogénèse est capable de bloquer ce processus.



# Des caractéristiques intéressantes

- Les biomédicaments de nature protéique (protéines recombinantes) présentent des **caractéristiques** et des **propriétés** très **différentes** de celles des molécules de synthèse issues de la chimie organique.

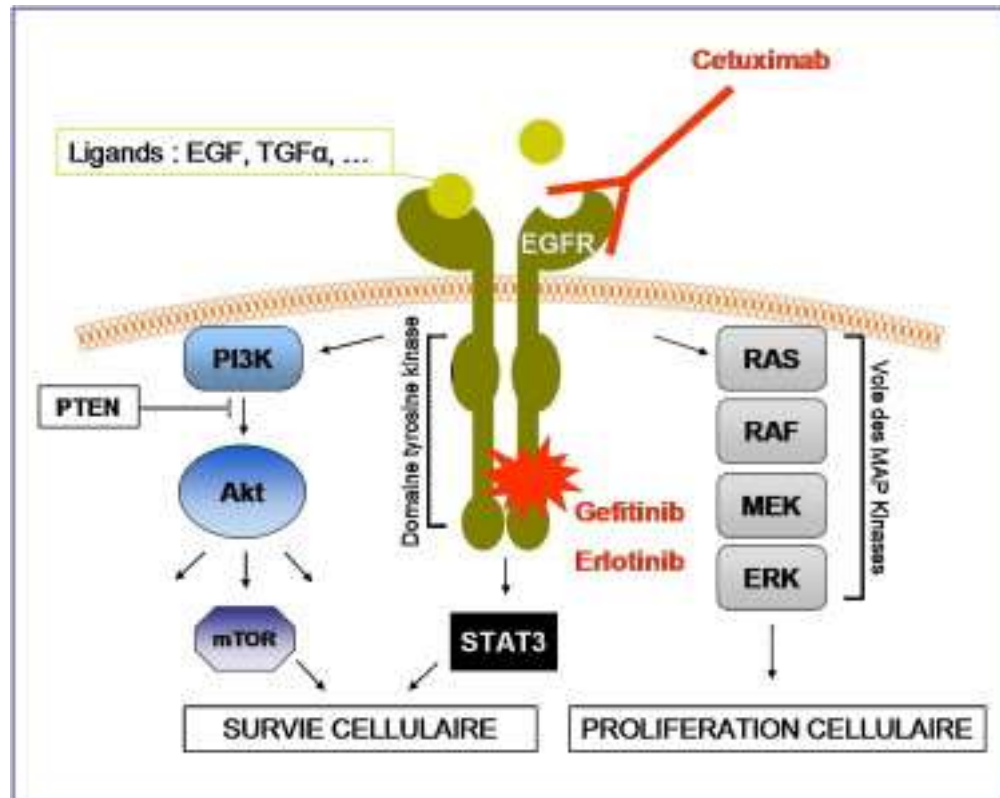
	<b>Petite molécule</b>	<b>Macromolécule</b>
<b>Cible</b>	Domaine Tyr-kinase	Ectodomaine du récepteur
<b>Spécificité</b>	+++	++++
<b>Liaison</b>	Rapidement réversible	Récepteur internalisé, lent
<b>Administration</b>	Orale, quotidienne	Intraveineuse, hebdomadaire
<b>Distribution</b>	Large	Plus restreinte
<b>Toxicité</b>	Rash, diarrhée, poumon	Rash, allergie
<b>ADCC</b>	Non	Possible

<sup>a</sup>Courtesy of N.J. Meropol and from N. Damjanov and N. Meropol, *Oncol. (Huntington)* 18:479–488, 2004.

# Les inhibiteurs de tyrosine kinases (TKI)



Les inhibiteurs de tyrosine kinase se fixent sur le site catalytique pour empêcher la fixation de l'ATP

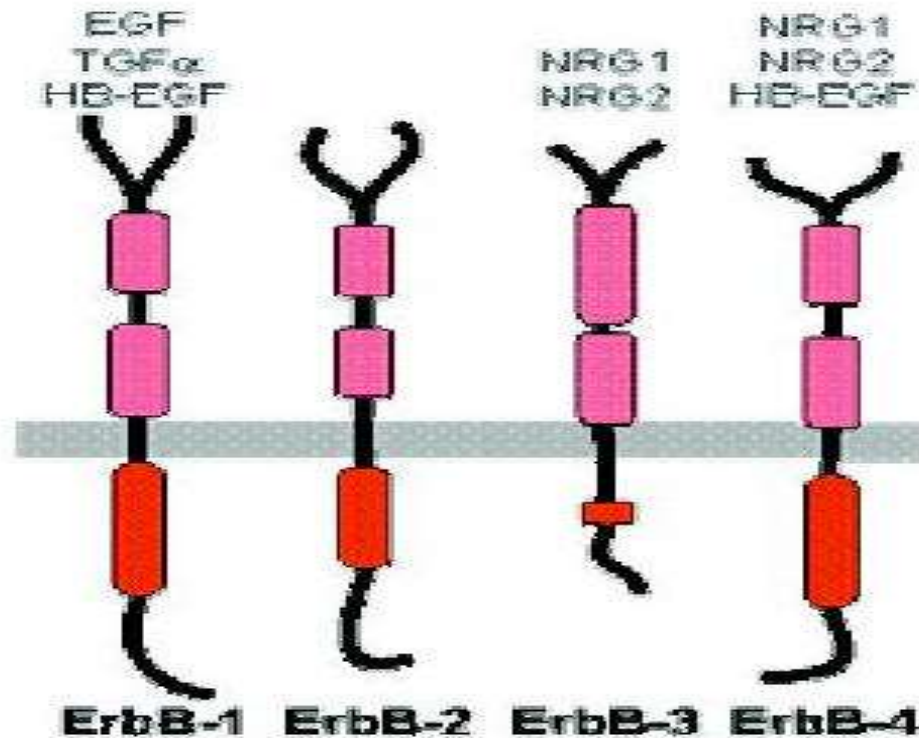


Exemples

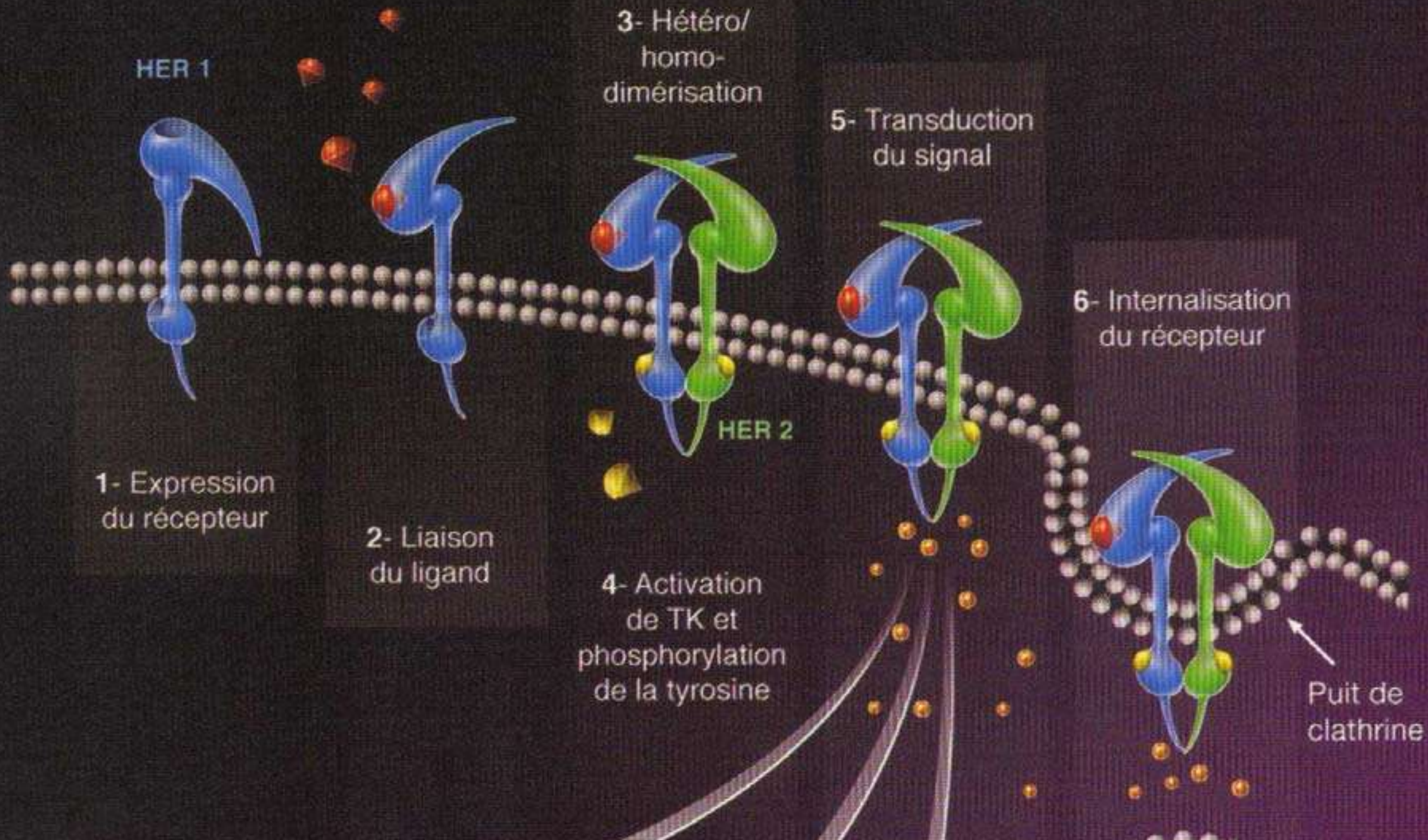
- Géfitinib IRESSA® (HER 1)
- Erlotinib TARCEVA® (HER 1)
- Lapatinib TYVERB® (HER 2)
- ....

2. Les anticorps monoclonaux

## Récepteurs de la famille HER (ou erb-B)



Tous ces récepteurs ont une activité tyrosine kinase



# Récepteurs à tyrosine kinase dans l'angiogenèse

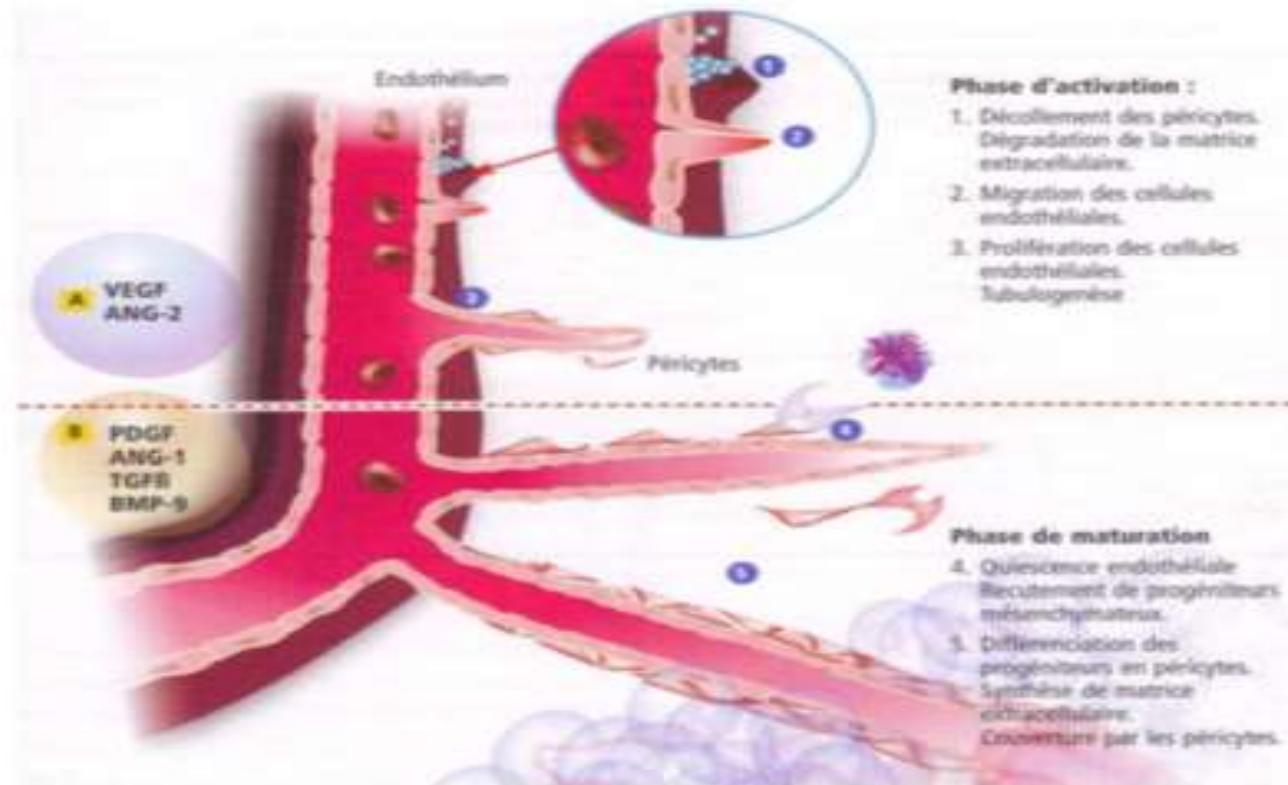
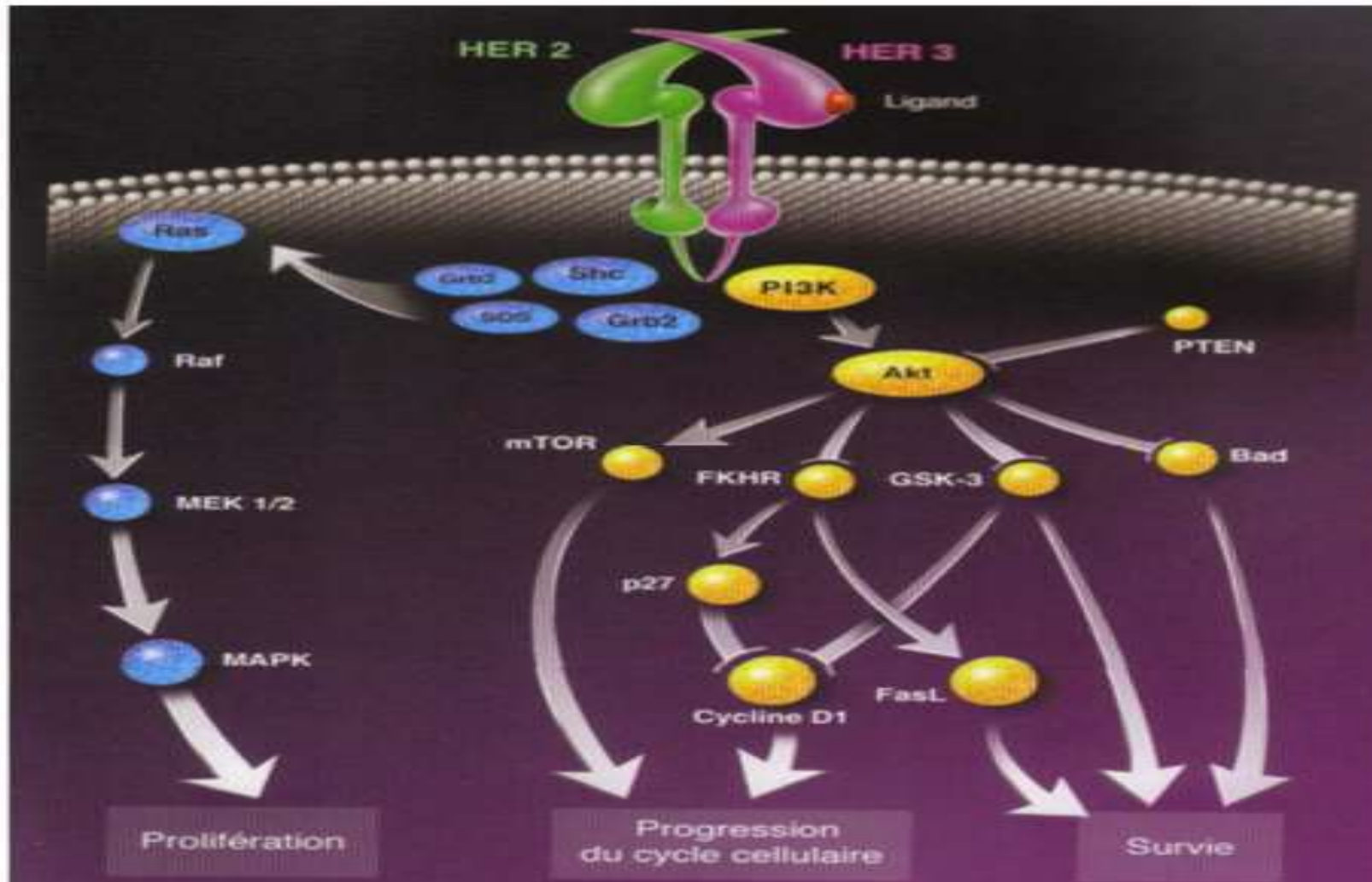


Figure 12 : Evénement

acteurs moléculaires des deux phases de l'angiogenèse (Feige JJ, 2009)

## Les voies de transduction du signal des MAPkinases et de la PI3 Kinase



Les voies de transduction du signal des MAP kinases et de la PI3 kinase (d'après Lin NU, Winer EP, 2004)

# Les immunothérapies

JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

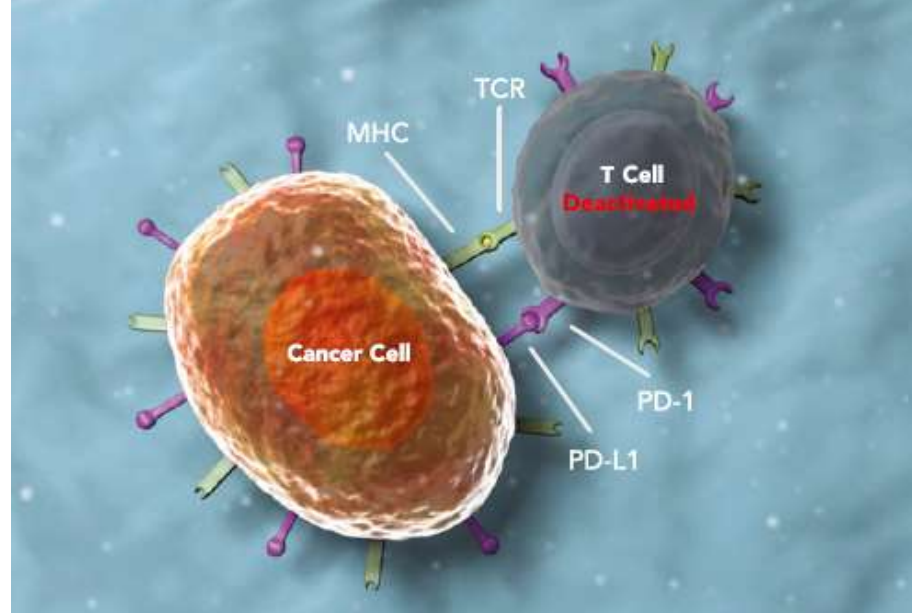
ASCO SPECIAL ARTICLE

## Clinical Cancer Advances 2017: Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology

Harold J. Burstein,\* Lada Krilov, Jeanny B. Aragon-Ching,† Nancy N. Baxter,† E. Gabriela Chiorean,† Warren Allen Chow,† John Frederick De Groot,† Steven Michael Devine,† Steven G. DuBois,† Wafik S. El-Deiry,† Andrew S. Epstein,† John Heymach,† Joshua Adam Jones,† Deborah K. Mayer,† Rebecca A. Miksad,† Nathan A. Pennell,† Michael S. Sabel,† Richard L. Schilsky,‡ Lynn Mara Schuchter,† Nadine Tung,† Karen Marie Winkfield,† Lori J. Wirth,† and Don S. Dizon\*

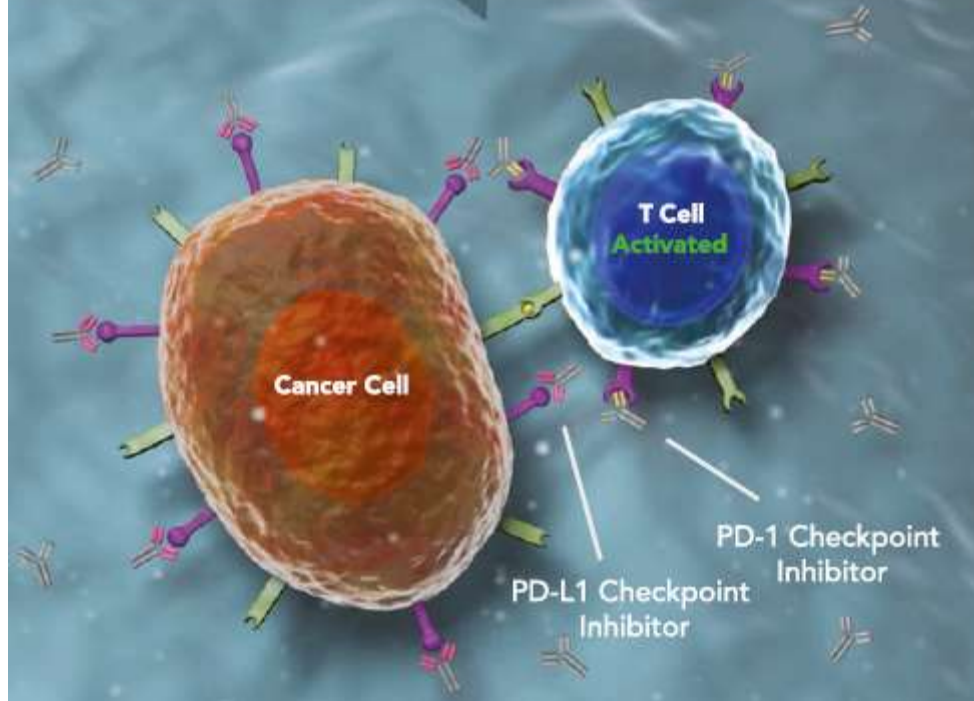
When a cancer cell encounters a T cell (a type of immune cell), the interaction between the major histocompatibility complex (MHC) and the T-cell receptor (TCR) molecules activates the T cell.

But when the PD-L1 checkpoint protein on the cancer cell attaches to the PD-1 checkpoint receptor on the T cell, the T cell is deactivated.



New immune checkpoint inhibitor therapies prevent the PD-L1 checkpoint protein from attaching to the PD-1 checkpoint receptor.

This allows the major histocompatibility complex (MHC) and T-cell receptor (TCR) interaction to activate the T cell and unleash the immune system to attack cancer.

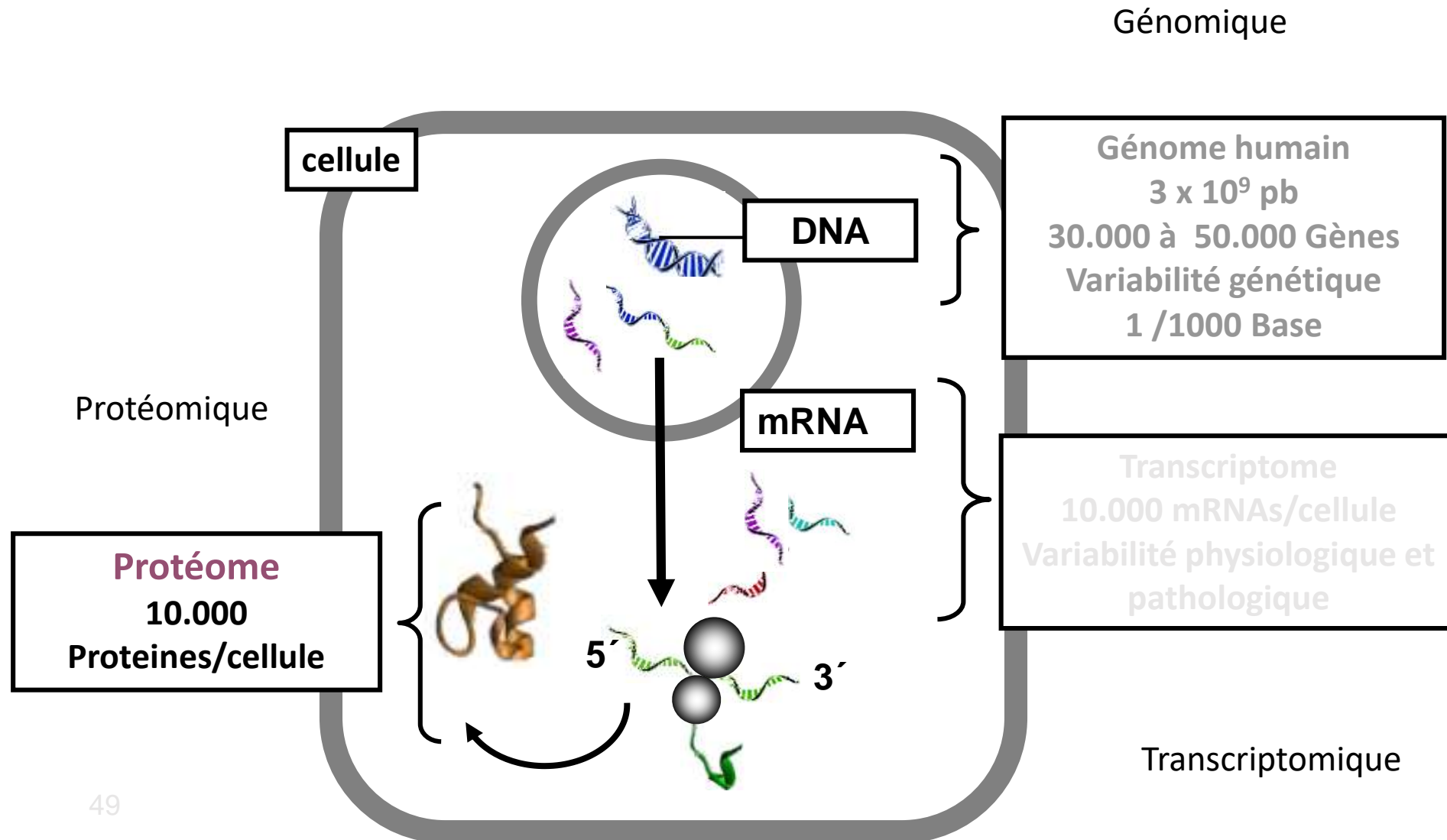


# Plan

- Caractérisation de plus en plus poussée du génome + Evolution des technologies d'analyse / bio-informatique
  - > Diagnostic in vitro innovant et organisé pour l'identification individuelle du biomarqueur

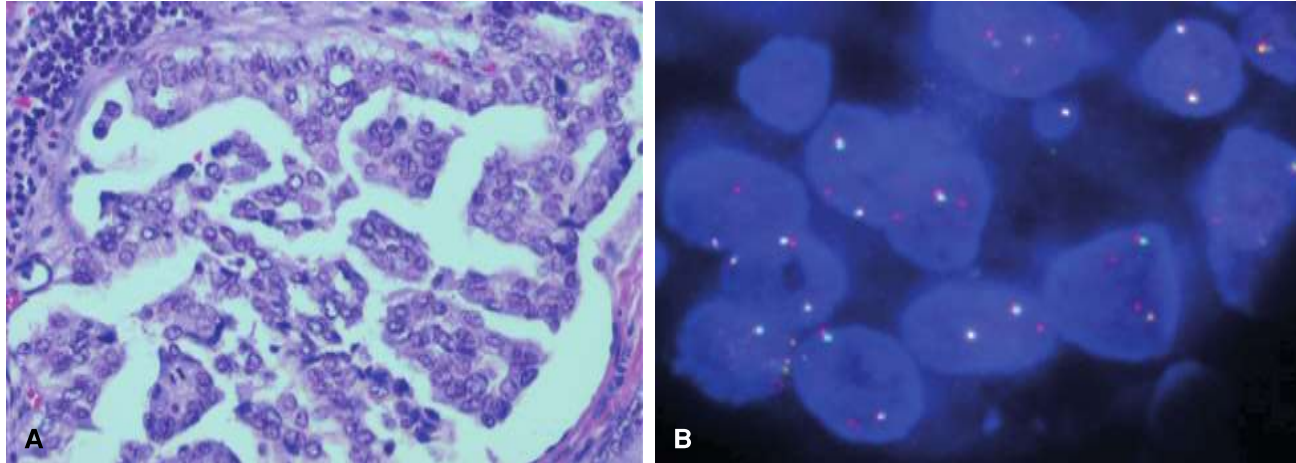


# Complexité du vivant: ADN->ARN-> Protéines



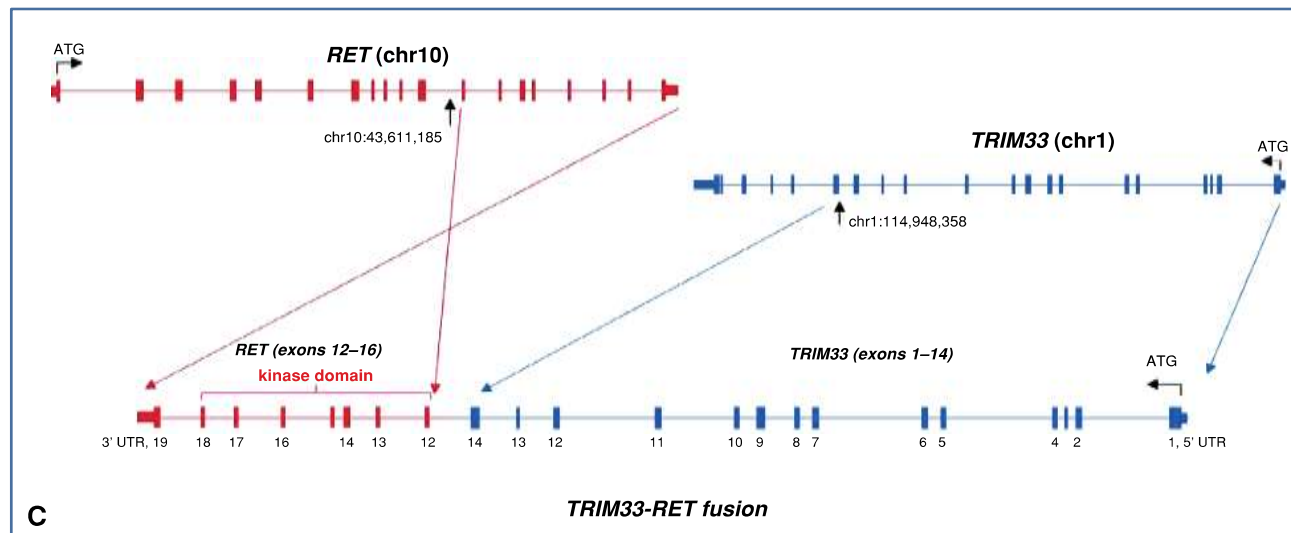
# Etudes complémentaires

immunohistochimie (Antigène-anticorps) : expression protéique



FISH  
Fluorescent  
In Situ Hybridization

Expression de gène  
Amplification d'un gène  
Fusion de gène



# BIOLOGIE MOLECULAIRE

## Différentes techniques basées sur la PCR

**PCR (Polymerase Chain Reaction) + analyse du pdt amplification**

RT-PCR



**Puces à ADN**  
*Expression du génome*



PCR

+

Discrimination allélique  
*Recherche de **mutation ponctuelle***

Séquençage direct (Sanger)  
*Recherche de **mutation ponctuelle**,  
**insertions et délétions de paires de base***



**Séquençage massif parallèle (NGS)**

## PROGRES TECHNOLOGIQUES en soin

### Pyrosequencing



*équipements hospitaliers*

### ddPCR



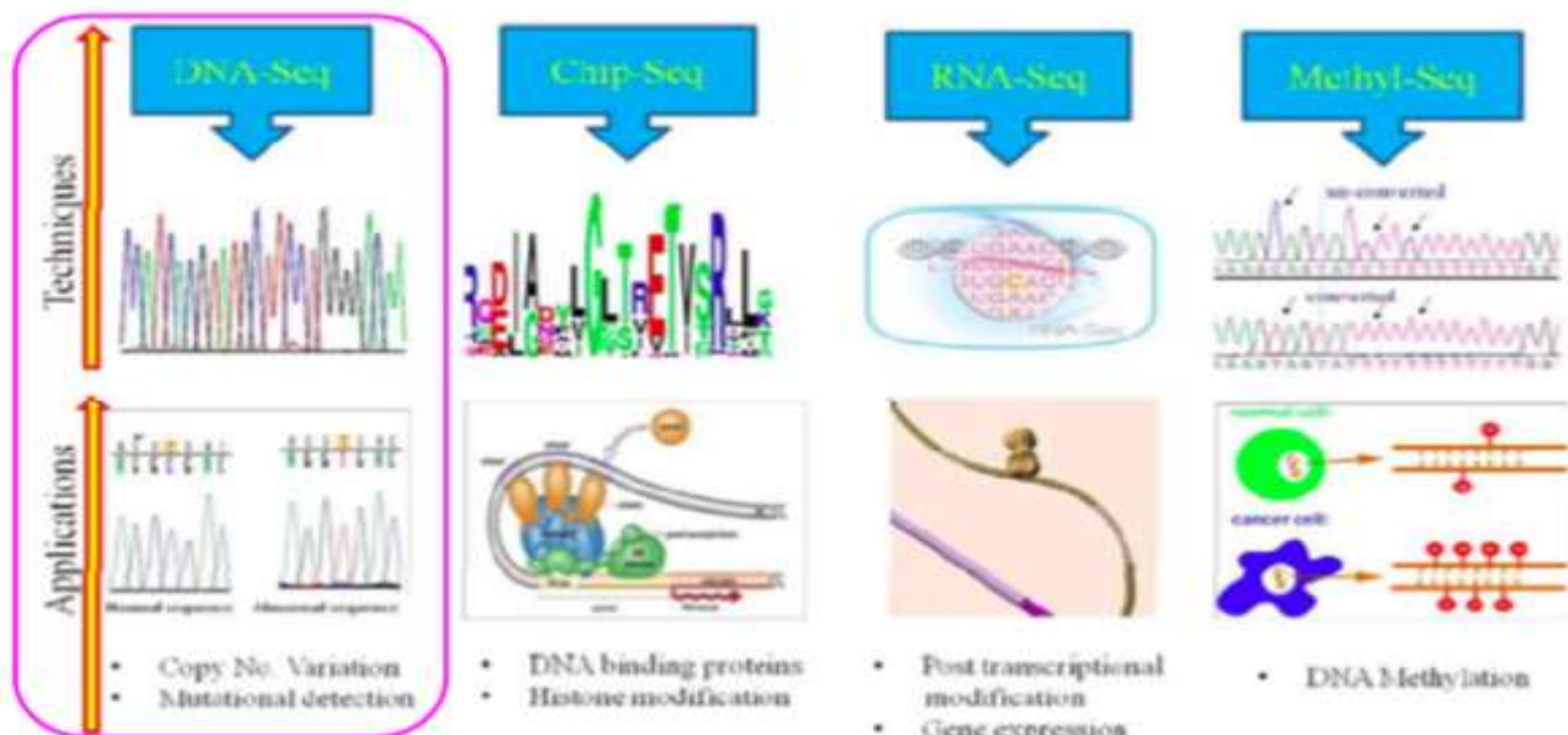
### NGS



### qPCR



## PROGRES TECHNOLOGIQUES en soin : NGS



Sequencing approaches in cancer treatment

Cell Press, 2014

D. Sekar<sup>1</sup>, K. Thiruganarubanathan<sup>2</sup>, P. V. J. Harini Idhar<sup>3</sup>, and S. Saravanan<sup>1,2</sup>





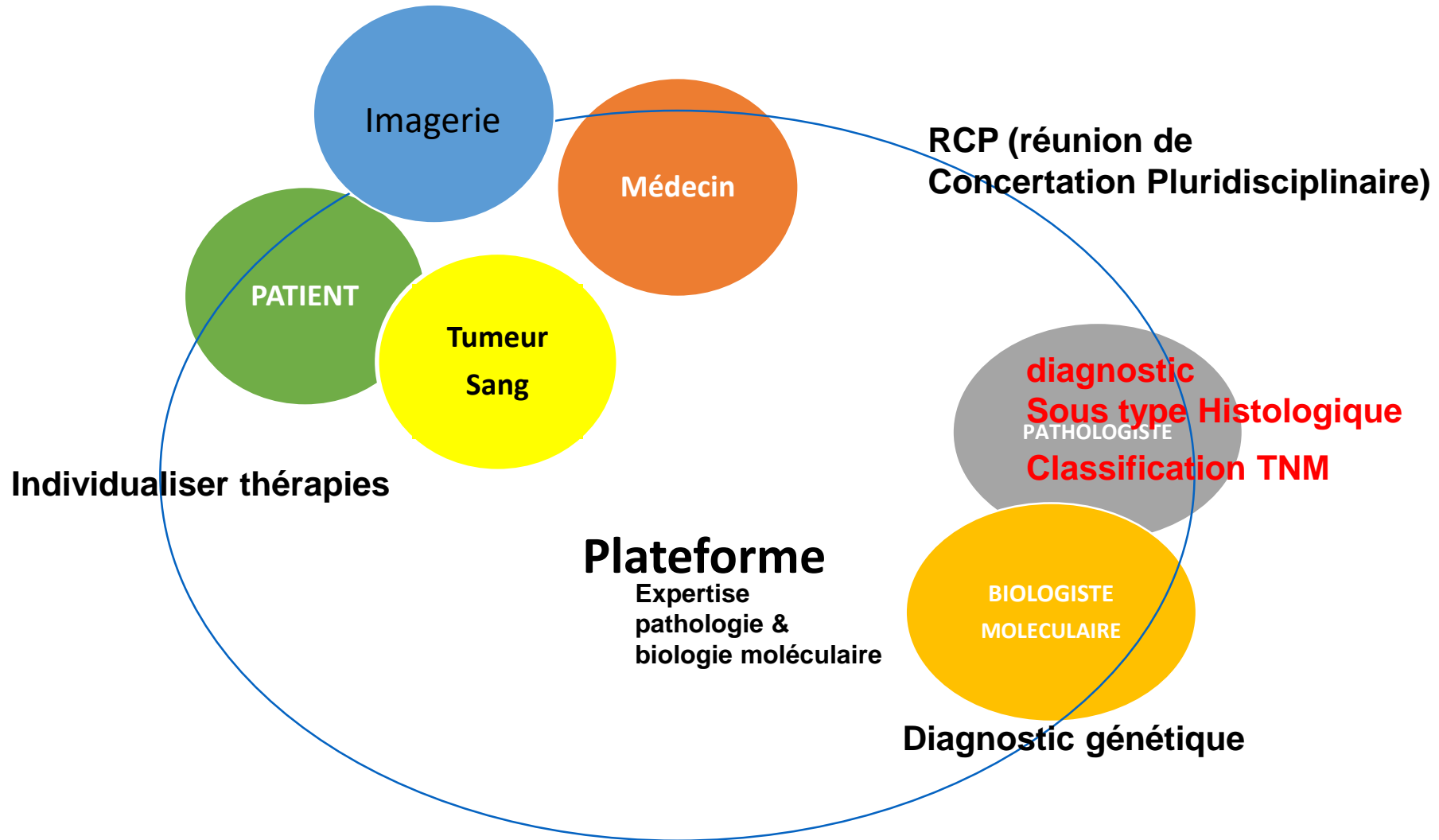
# Plan

- Le circuit, les prélèvements

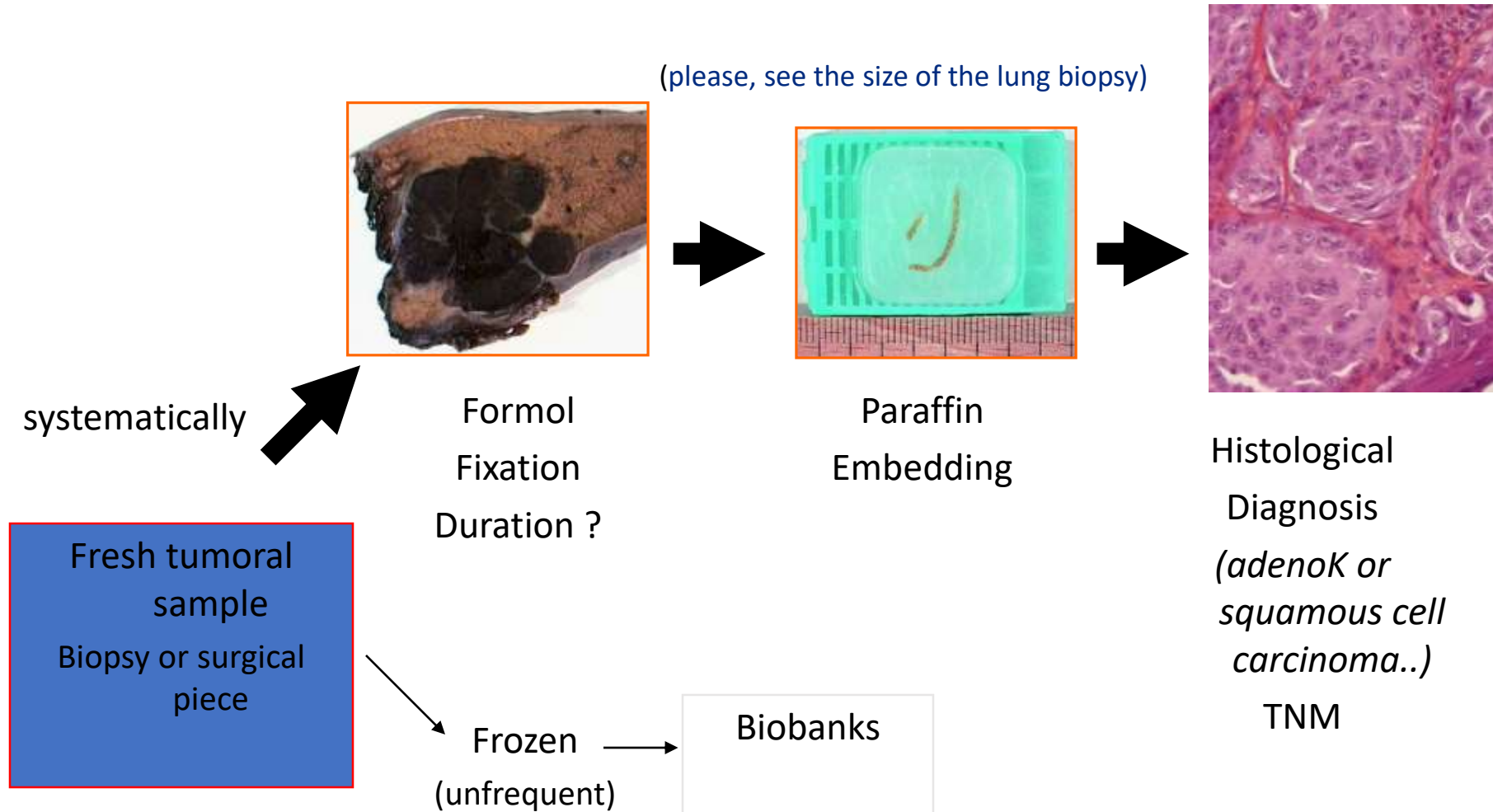


# Organisation et circuit du diagnostic

## Différents acteurs - délais



# Le circuit de l'échantillon

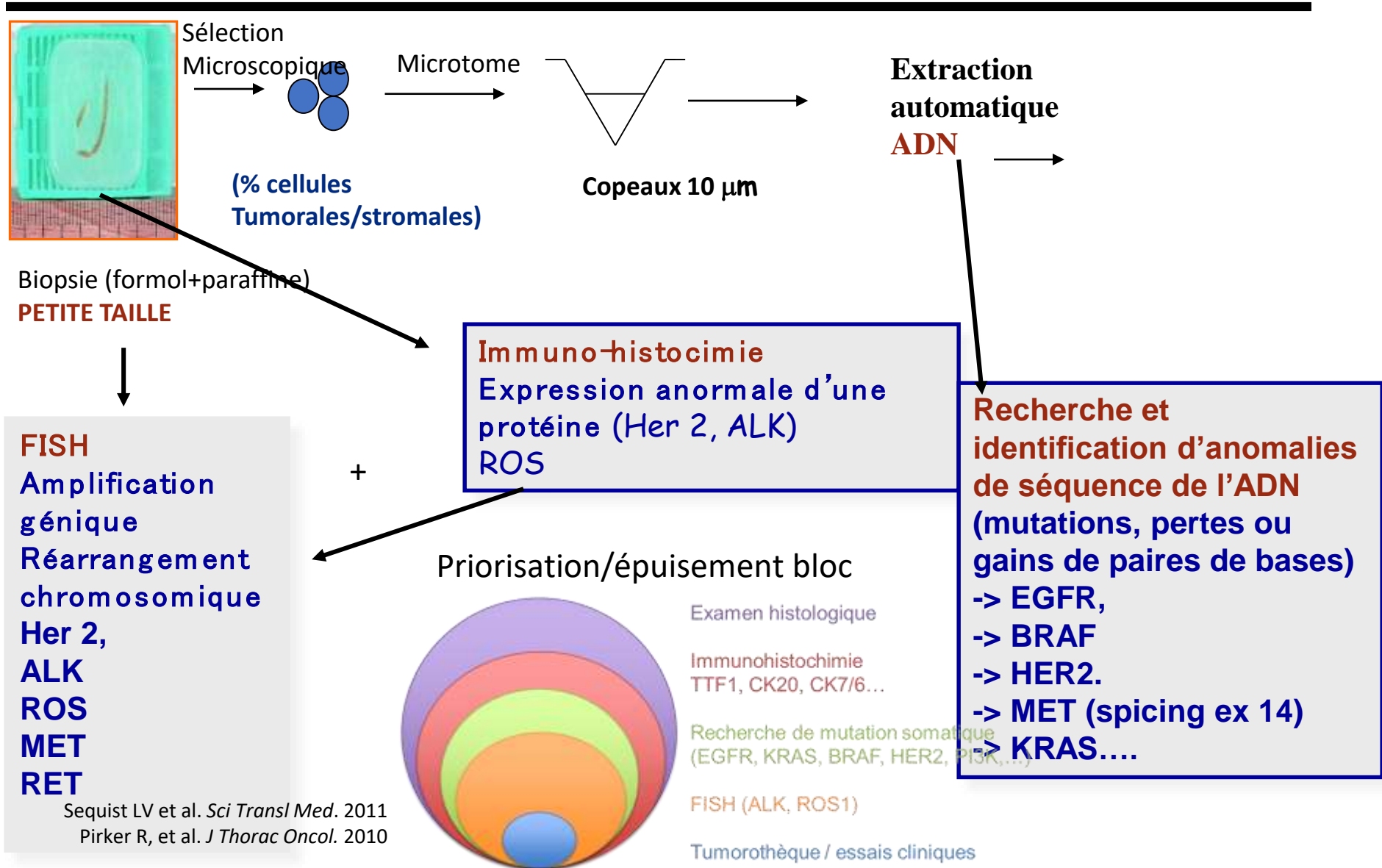


(please, see the size of the lung biopsy)

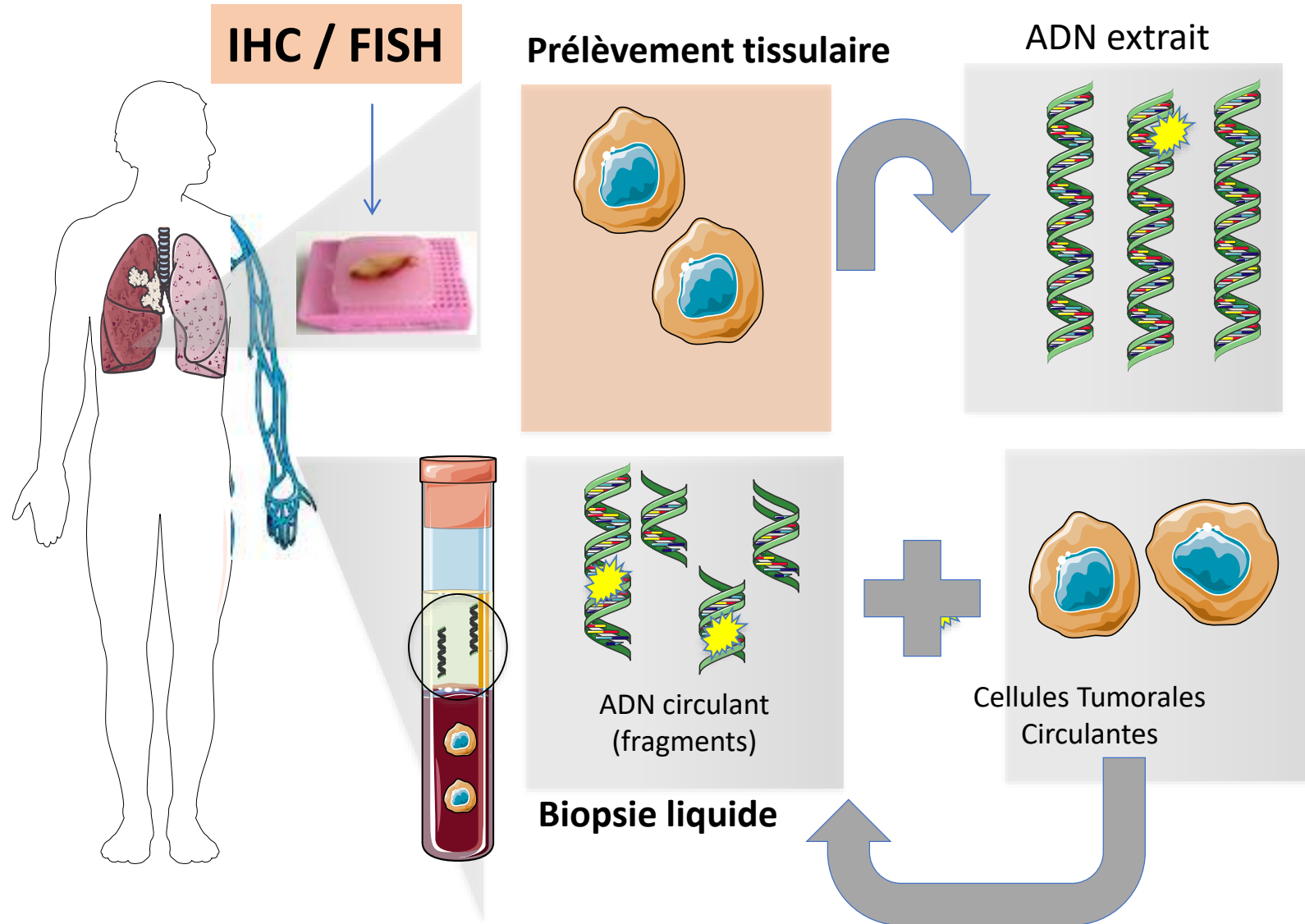
Sample size rarely allows biobanking

# Stratégie multidisciplinaire au quotidien

## GENETIQUE / CYTOGENETIQUE / PATHOLOGIE



# Recherche des biomarqueurs dans l'ADN circulant dans le plasma



Exemple

Cancer du poumon

Evolution de la médecine de précision

# Thérapies ciblées et Biomarqueurs

## Exemple : biomarqueur EGFR et inhibiteur TKI (gefinitib) / cancer du poumon non à petites cellules

*inhibiteur du récepteur du facteur de croissance épidermique*

### 2003

→ AMM dans le traitement du CPNPC aux Etats-Unis (Iressa®)

### 2004

- Manque de preuves de l'efficacité du gefitinib sur la survie globale des patients en phase III
- En association avec la chimiothérapie ou en monothérapie dans le traitement du atteints d'un CPNPC
- Retrait du marché aux Etats-Unis

### 2009

- Résultats de l'essai de phase III (IPASS) ciblant des patients dont la tumeur présentait un statut EGFR muté (biomarqueur / cible thérapeutique)
- Critère principal : Survie sans progression
- **AMM « conditionné à la présence du biomarqueur » en Europe ( mutation EGFR exons 18 à 21)**

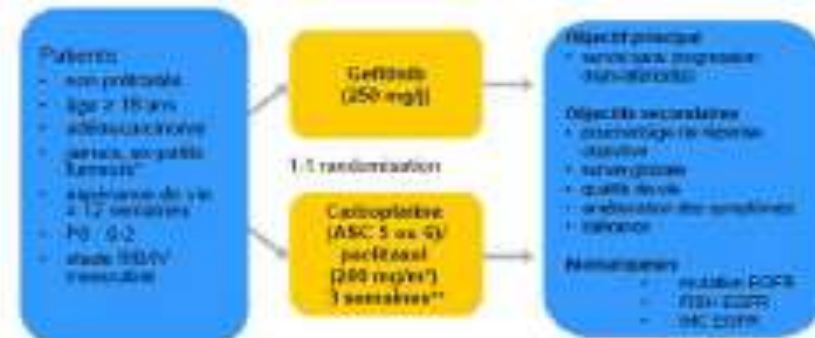
### 2016

- TKI de 3<sup>ème</sup> génération ciblant la mutation de résistance aux TKI EGFR de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>e</sup> génération (EGFR T790M)
- **AMM « conditionné à la présence du biomarqueur EGFR T790M**

### 2018

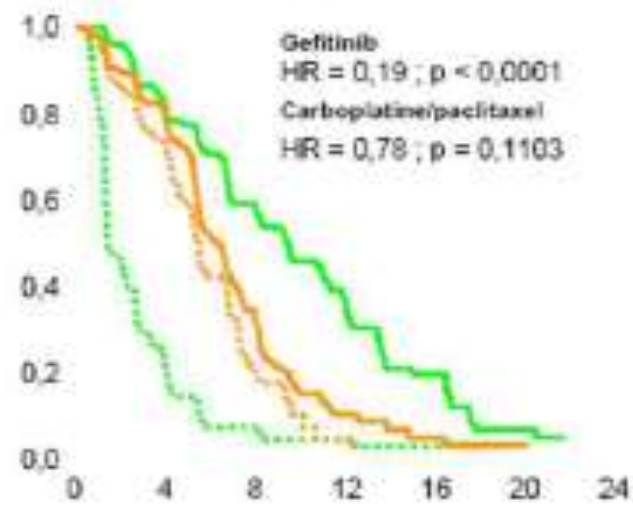
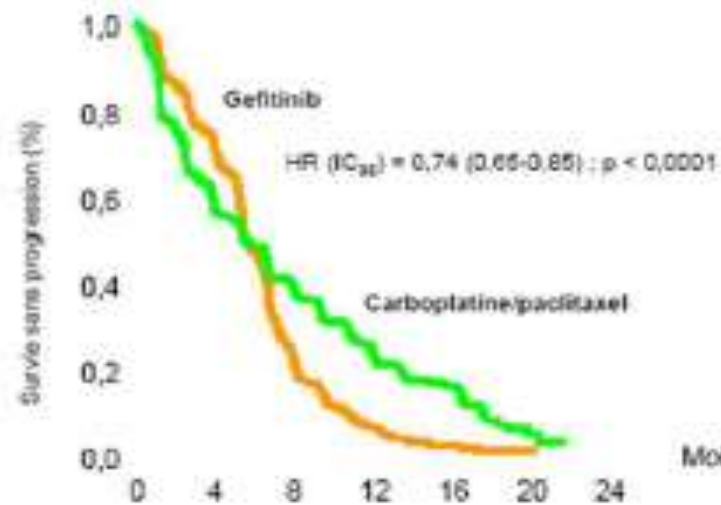
- TKI de 3<sup>ème</sup> génération (osimertinib)
- **AMM « conditionné à la présence du biomarqueur EGFR T790M – en première ligne**

# La preuve du concept de la thérapie ciblée bénéfique pour une sous classe de patients



\*Inclure DCIS  
 \*\* jusqu'à un maximum de 8 cycles  
 \*\* AUC 5  
 \*\* AUC 4

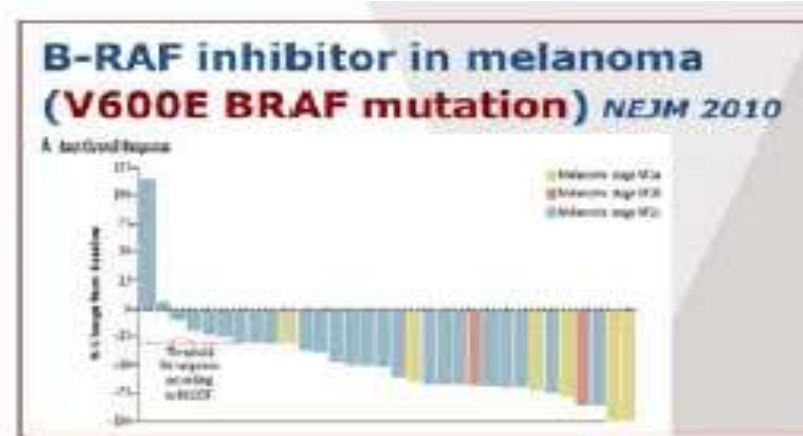
— Géfitinib EGFR M+ (n = 112)  
 — Géfitinib EGFR M- (n = 91)  
 — Carboplatine/paclitaxel EGFR M+ (n = 128)  
 — Carboplatine/paclitaxel EGFR M- (n = 85)



**Mutation EGFR / Poumon / Inhibiteur de la kinase EGFR  
 => sélectionner les patients bénéficiant du traitement**

# Analyse de cohorte / réponses individuelles

exemples de tumeurs avec une addiction oncogénique addiction ciblable par un inhibiteur spécifique.



Waterfall plot

Réponse thérapeutique individuelle / progression

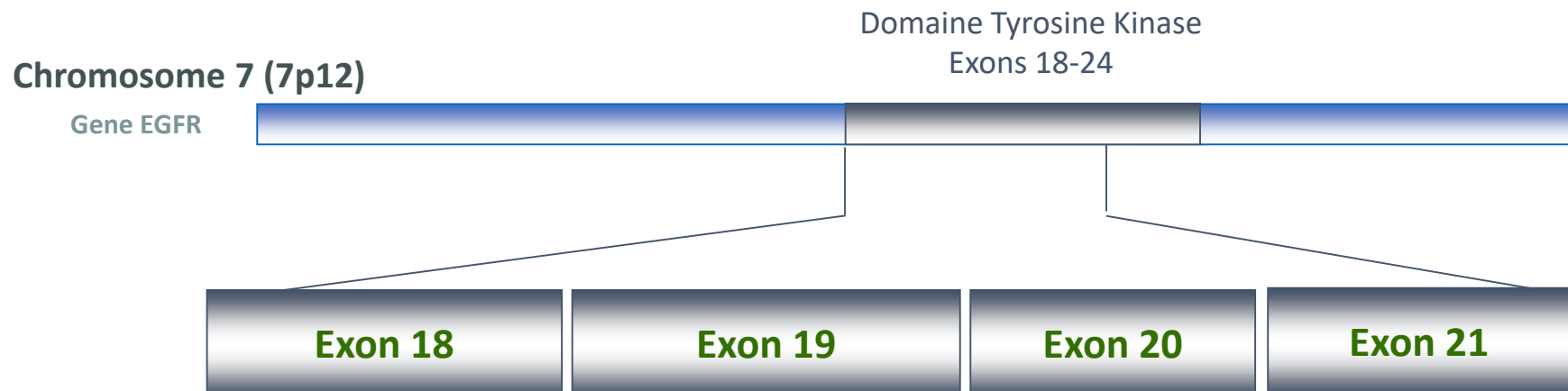
Intensité de la réponse individuelle



# La recherche d'anomalies génétique du gène *egfr* avant la prescription d'une chimiothérapie

## La cible Le Biomarqueur

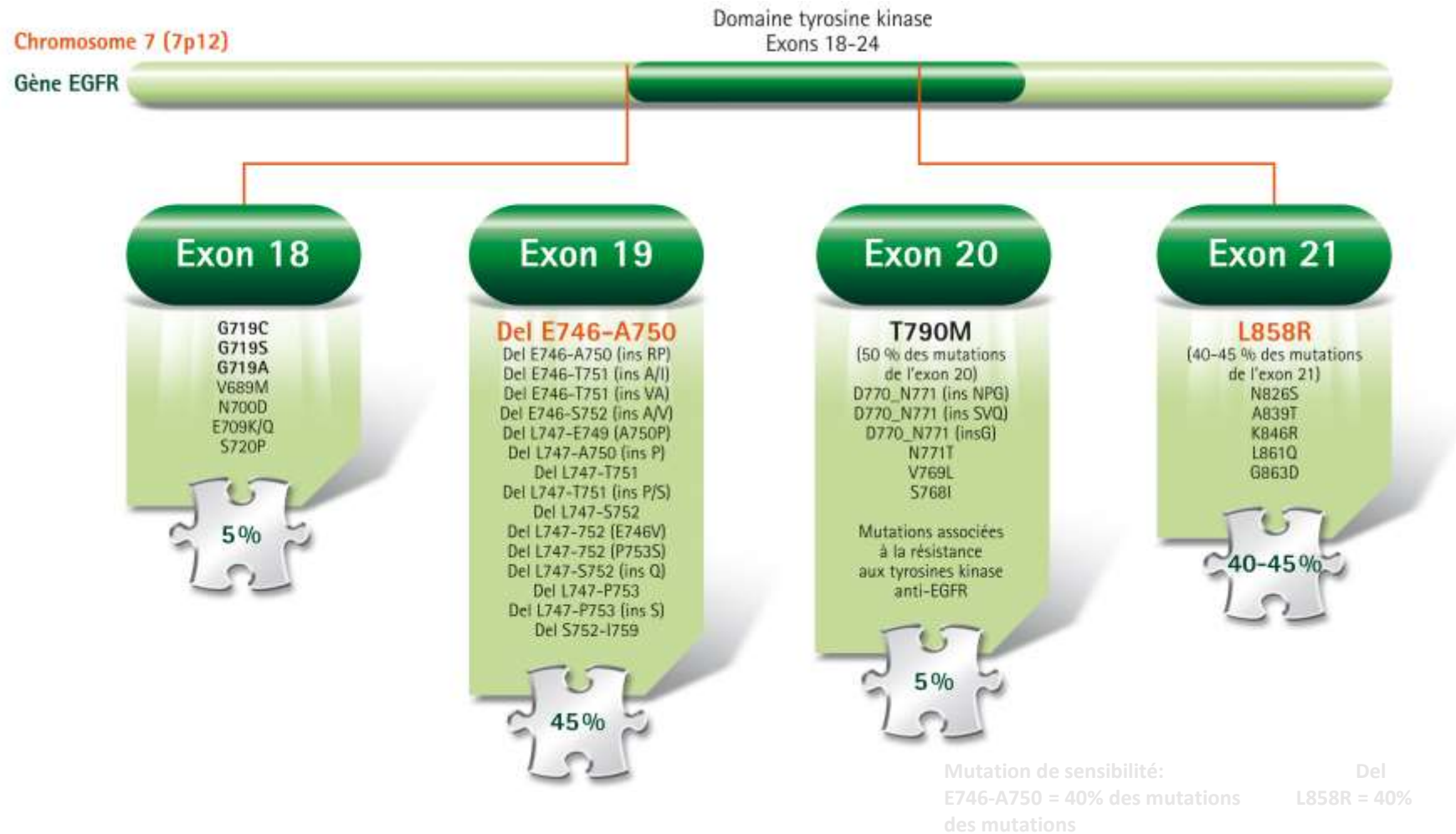
Mise en évidence au niveau du gène codant pour l'EGFR (porté sur le chromosome 7) d'anomalies génétiques sur les exons 18 à 21 associées à un meilleur pronostic des patients traités



La recherche s'effectue après extraction de l'ADN tumoral à partir de biopsies ou pièces opératoires

# Le spectre des mutations de l'EGFR

➤ Une prévalence de 10 à 16,5% de mutations dans la population caucasienne



D'après Sharma SV, et al. <sup>(1)</sup>

**Mutation de résistance:**  
**T790M = moins de 3%**

1. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. Nat Rev Cancer 2007;7:169-81  
2. Blons H, Côté JF, Le Corre D, et al. Epidermal growth factor receptor mutation in lung cancer are linked to bronchioloalveolar differentiation. Am J Surg Pathol 2006;30:1309-15.  
3. Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. N Engl J Med 2009;361:958-67.

# Tests diagnostics pour l'identification des biomarqueurs

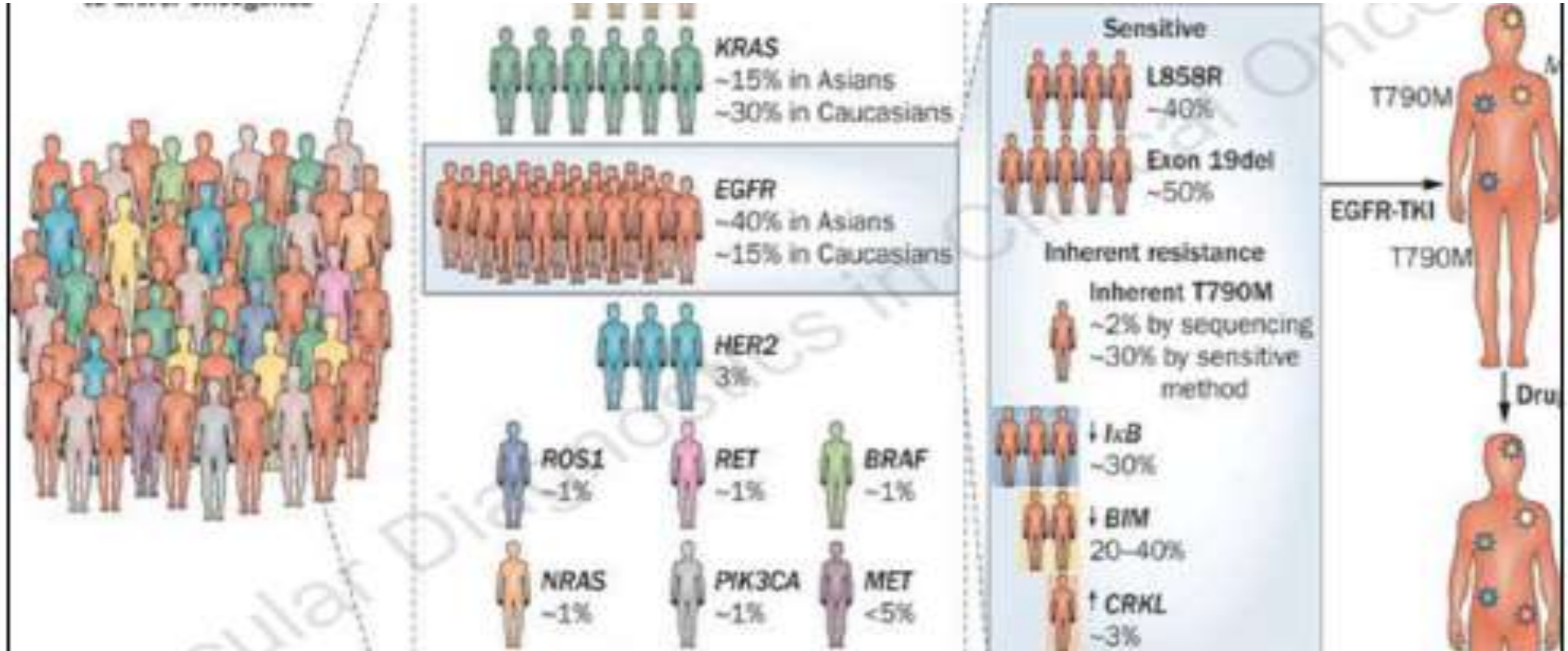
- **Modèles de développement:**

- Tests « maisons », développés par les plateaux de bio-pathologie médicale ou les plateformes de génétique moléculaire : NGS
- Kits commerciaux, développés par les industriels de bio-technologie  
→ *les tests diagnostiques compagnons*

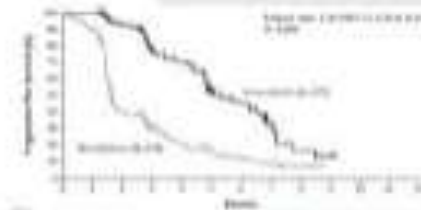
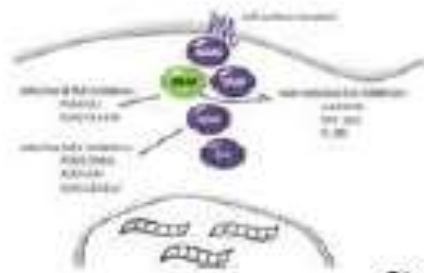
- **Définition**

- Dispositif médical de diagnostic *in vitro*
- Basé sur un biomarqueur prédictif
- Qui a pour finalité de fournir des informations essentielles
- Pour assurer une utilisation efficace et sûre d'un traitement spécifique.

# Plusieurs thérapies ciblées dans le cancer du poumon



# Autorisation de mise sur le marché



Chapman et al. VEMURAFENIB IN MELANOMA WITH BRAF PLOID MUTATION: A PHASE III, PLACEBO-CONTROLLED, RANDOMIZED TRIAL

## EMA recommandations Vemurafenib

(ZELBORAF)

On 15 December 2011, the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) adopted a positive opinion :

« ...Vemurafenib is indicated in monotherapy for the treatment of adult patients with BRAF V600 mutation-positive unresectable or metastatic melanoma ... »

## Dabrafenib en 2013 EMA recommandations idem.

(TAFINLAR)

Indication conditionnée à la présence de la cible dans la tumeur

# Coordination des étapes du développement d'un médicament avec celle du développement d'un test de diagnostic basé sur un biomarqueur

-> **Test Compagnon** : celui qui a fait la preuve de l'efficacité thérapeutique au cours des essais et a permis l'AMM

## Liste des cibles moléculaires et des thérapies ciblées (données INCa)

Mécanismes oncogéniques	THÉRAPIES CIBLÉES	
	Inhibiteurs intracellulaires	Inhibiteurs extracellulaires
<b>ALK</b>	crizotinib, ceritinib	
<b>BCR-ABL</b>	imatinib, bosutinib, dasatinib, nilotinib, ponatinib	
<b>BTK</b>	ibrutinib	
<b>CDK</b>	palbociclib	
<b>KIT</b>	imatinib, sunitinib, regorafenib (bosutinib, dasatinib, nilotinib, ponatinib, sorafenib, pazopanib, lenvatinib, cabozantinib)	
<b>EGFR</b>	erlotinib, gefinitib, afatinib, osimertinib (vandetanib)	cetuximab, panitumumab
<b>HEDGEHOG</b>	vismodegib	
<b>HER</b>	lapatinib (afatinib)	trastuzumab, trastuzumab emtansine, pertuzumab
<b>JAK</b>	ruxolitinib	
<b>MEK</b>	trametinib, cobimetinib	
<b>m-TOR</b>	temsirolimus, everolimus	
<b>PARP</b>	olaparib	
<b>PDGFR</b>	imatinib, bosutinib, dasatinib, nilotinib, ponatinib, sorafenib, sunitinib, regorafenib, pazopanib, lenvatinib, nintedanib	
<b>PI3K</b>	idelalisib	
<b>BRAF</b>	vemurafenib, dabrafenib (sorafenib, regorafenib)	
<b>RANK</b>		denosumab
<b>RET</b>	ponatinib, sunitinib, regorafenib, lenvatinib, vandetanib, cabozantinib	
<b>VEGF/VEGFR</b>	axitinib, sorafenib, sunitinib, pazopanib, nintedanib, regorafenib lenvatinib, vandetanib, cabozantinib, (ponatinib)	bevacizumab, aflibercept, ramucirumab
<b>MET</b>	cabozantinib (crizotinib)	
<b>ROS1</b>	crizotinib	

# Exemples d'AMM conditionnées à la présence d'un biomarqueur

Molécules (nom de marque)	AMM en Europe	AMM aux Etats-Unis	Cible	AMM conditionnées à la présence d'un biomarqueur dans leur indication
Ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla)	Yes	Yes	HER2	Amplification du gène ou surexpression de la protéine HER2
Afatinib (Gilotrif)	Yes	Yes	EGFR, HER2	EGFR délétion de l'exon 19 ou substitution de l'exon 21 (mutation L858R)
Aldesleukin (Proleukin)	Yes	No	-	-
Alectinib (Alecensa)	Yes	No	ALK	ALK
Alemtuzumab (Campath)	Yes	Yes	CD52	-
Atezolizumab (Tecentriq)	Yes	No	PD-L1	-
Axitinib (Inlyta)	Yes	Yes	KIT, PDGFR $\beta$ , VEGFR1/2/3	-
Belimumab (Benlysta)	Yes	Yes	BAFF	-
Belinostat (Beleodaq)	Yes	No	HDAC	-
Bevacizumab (Avastin)	Yes	Yes	VEGF ligand	-
Blinatumomab (Blincyto)	Yes	Yes	ABL	BCR-ABL1 Absence du chromosome Philadelphie
Bortezomib (Velcade)	Yes	Yes	Protéasome	
Bosutinib (Bosulif)	Yes	Yes	ABL	BCR-ABL1 Présence du chromosome Philadelphie
Brentuximab vedotin (Adcetris)	Yes	Yes	CD30	-
Cabozantinib (Cabometyx [tablet], Cometriq [capsule])	Yes	Yes	FLT3, KIT, MET, RET, VEGFR2	Présence de la mutation RET
Carfilzomib (Kyprolis)	Yes	Yes	Protéasome	-
Ceritinib (Zykadia)	Yes	Yes	ALK	ALK
Cetuximab (Erbix)	Yes	Yes	EGFR	Absence de mutations sur les exons 2 à 4 du gène KRAS et NRAS



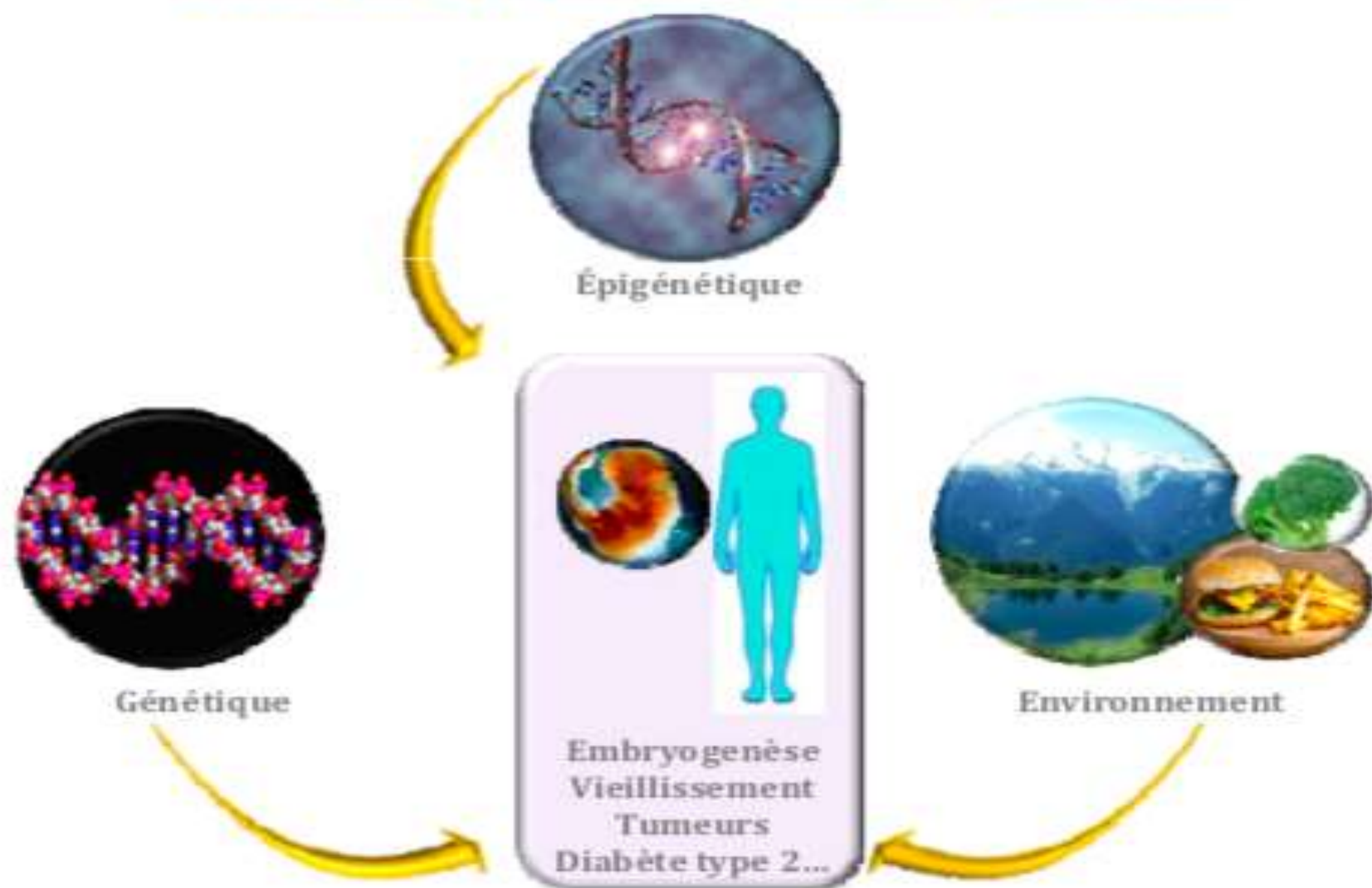
# Exemples de tests compagnons

Molécule	Test de diagnostic compagnon	Compagnie
Ado-trastuzumab emtansine	HERCEPTEST HER2 FISH PharmDx Kit	Dako Denmark A/S
Afatinib	therascreen EGFR RGQ PCR Kit	Qiagen Manchester, Ltd.
Cetuximab	cobas® KRAS Mutation Test therascreenKRAS RGQ PCR Kit DAKO EGFR PharmDx Kit	Roche Molecular Systems, Inc. Qiagen Manchester, Ltd. Dako North America, Inc.
Crizotinib	VENTANA ALK (D5F3) CDx Assay VYSIS ALK Break Apart FISH Probe Kit	Ventana Medical Systems, Inc. Abbott Molecular Inc.
Dabrafenib	THxID™ BRAF Kit	bioMérieux Inc.
Erlotinib	cobas® EGFR Mutation Test cobas® EGFR Mutation Test v2	Roche Molecular Systems, Inc
Gefitinib	therascreen® EGFR RGQ PCR Kit	Qiagen Manchester, Ltd.
Imatinib	KIT D816V Mutation Detection by PCR for Gleevec Eligibility in Aggressive Systemic Mastocytosis (ASM)	ARUP Laboratories, Inc.
	PDGFRB FISH for Gleevec Eligibility in Myelodysplastic Syndrome /Myeloproliferative Disease (MDS/MPD)	
	DAKO C-KIT PharmDx	Dako North America, Inc.
Olaparib	BRACAnalysis CDx™	Myriad Genetic Laboratories, Inc.
Osimertinib	cobas® EGFR Mutation Test v2	Roche Molecular Systems, Inc

- Nouveaux biomarqueurs  
La méthylation des gènes /

Tumeurs cérébrales

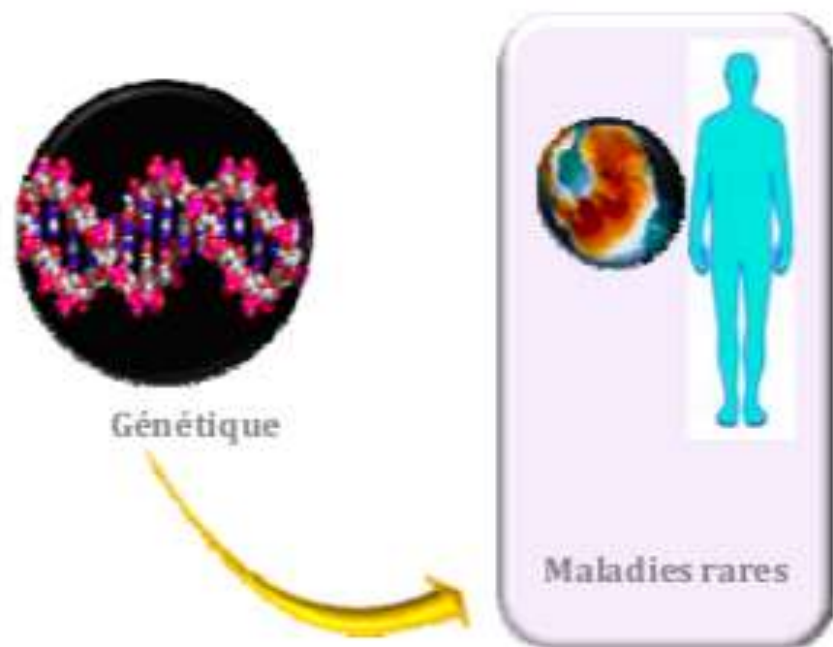
# Génétique, épigénétique et environnement



## Génétique, épigénétique et environnement

### Maladies rares génétiques

→ Analyse en séquençage NGS (DNA-seq) : panels de gènes / WES / WGS



**Variants** : SNV, CNV, SV

Classification des variants (ACMG) :

- ✓ bénin (1) ou probmt bénin(2)
- ✓ pathogène (5) ou probmt pathogène (4)
- ✓ **signification inconnue (VSI) (3)**

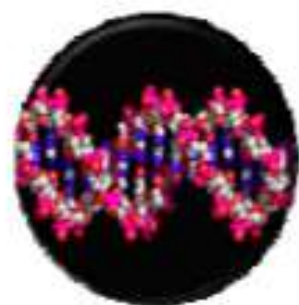
**Objectif** : reclasser les VSI

poser un diagnostic de certitude  
mettre fin à l'errance diagnostique

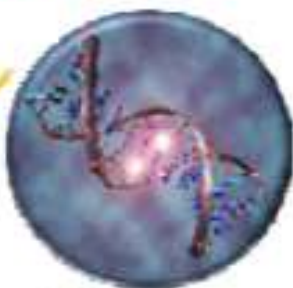
→ *tests fonctionnels*  
*ou biomarqueurs associés*

## Génétique, épigénétique et environnement

Maladies rares génétiques



Génétique



Épigénétique



Maladies rares

### Les acteurs

- ❑ Modifications chimiques de l'ADN (**méthylation**)
- ❑ Modifications post-traductionnelles des histones
- ❑ ARN non codants

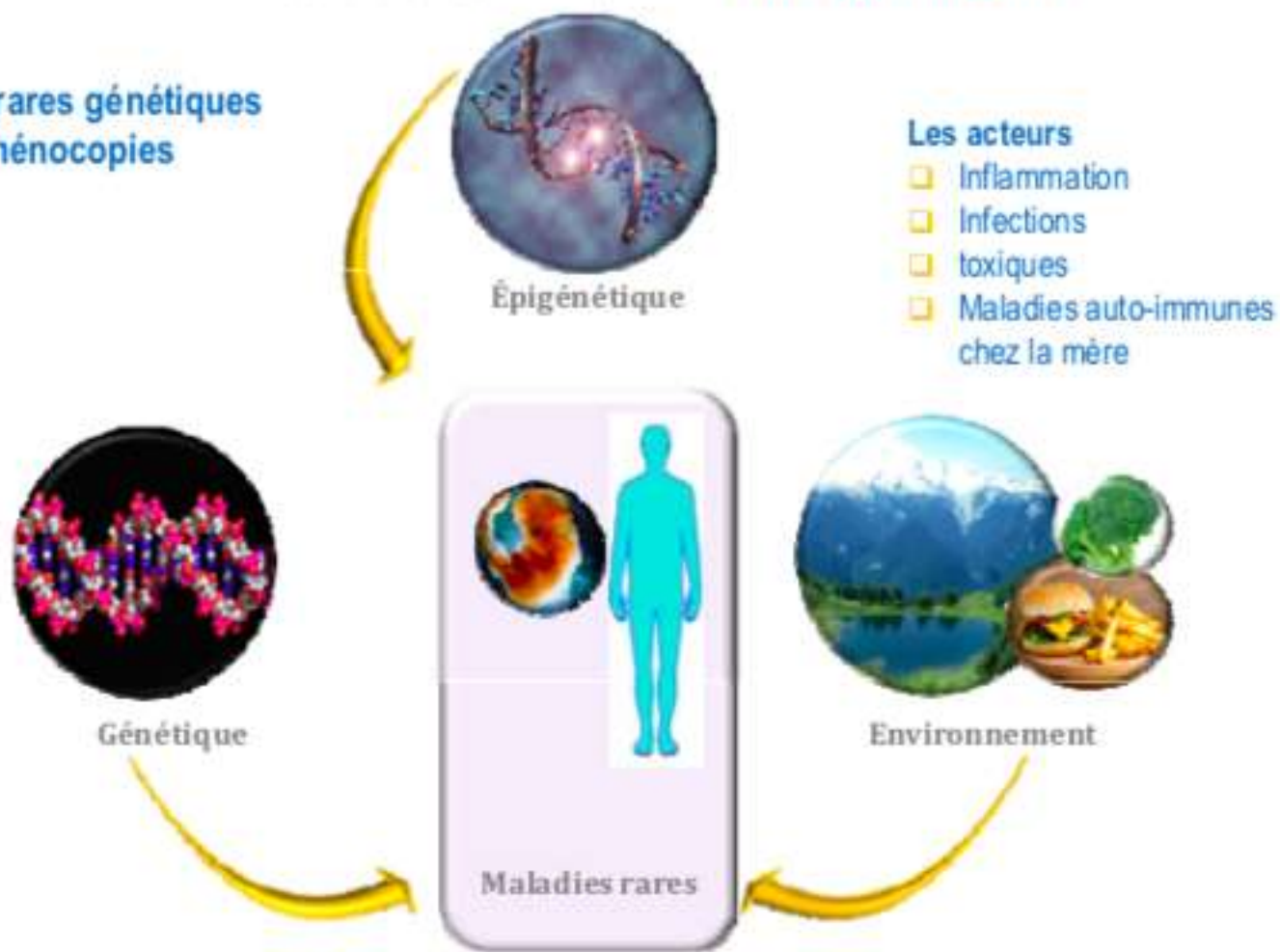
← Etude méthylome

← *KDM, KMT*

← Etude miRNA

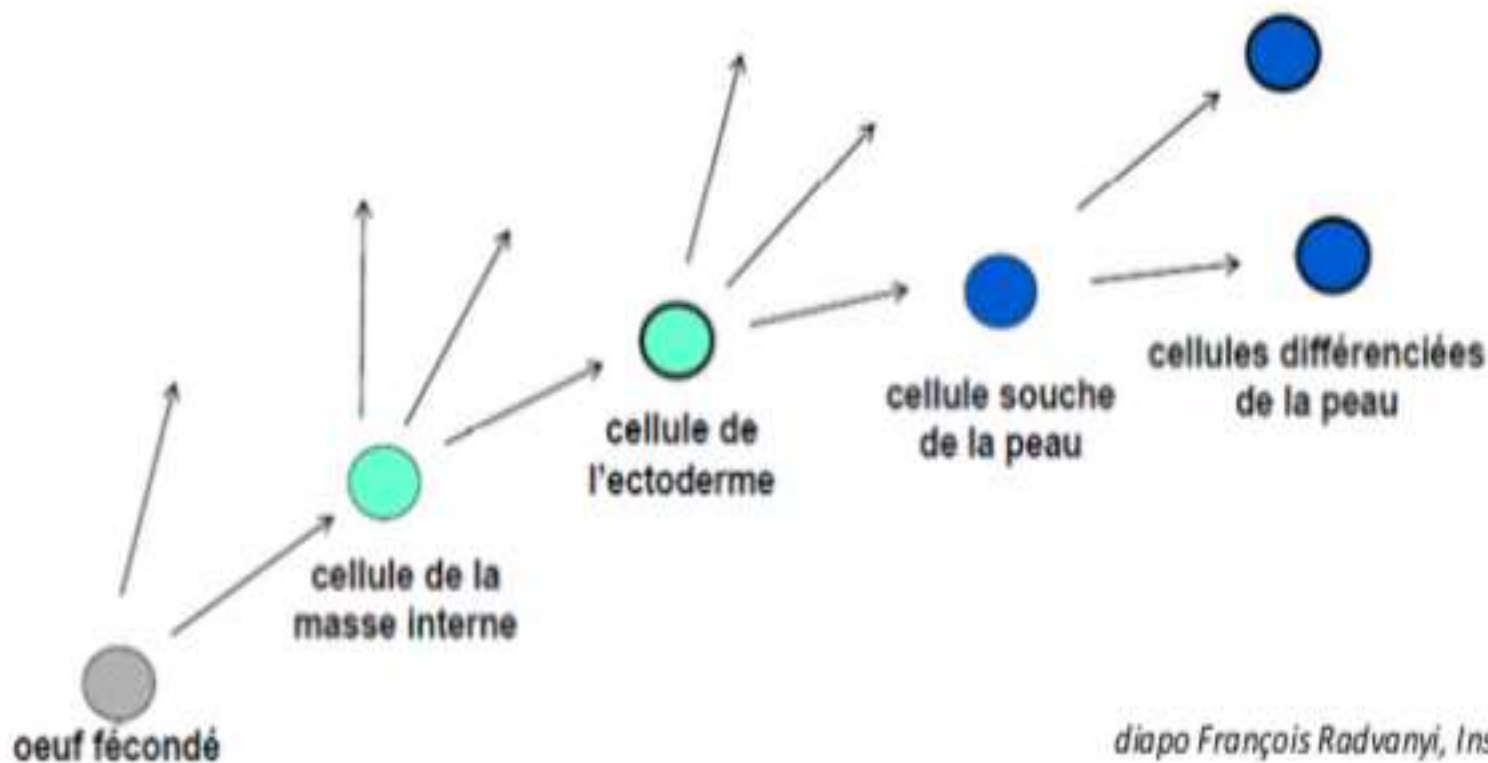
# Génétique, épigénétique et environnement

Maladies rares génétiques  
et phénocopies



## De l'œuf fécondé aux différentes cellules de l'organisme

---



*diapo François Radvanyi, Institut Curie*

**Les différentes étapes du développement sont associées à des modifications épigénétiques qui forgent l'identité d'une cellule**

---

# EPIGÉNÉTIQUE

Mécanisme **HÉRITABLE** et **RÉVERSIBLE** influant sur l'expression du gène, ou l'intégrité et la stabilité génomique, sans altération de la séquence de l'ADN.

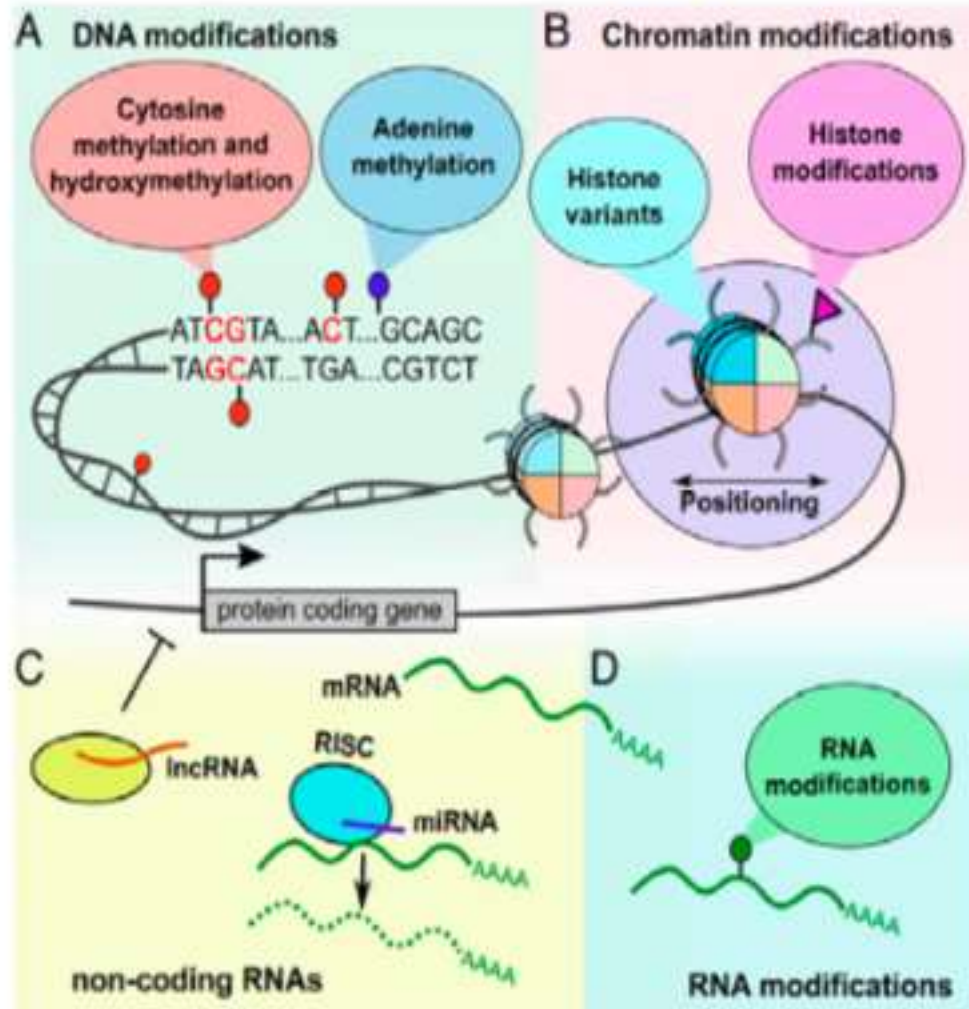




## MODIFICATIONS DE L'ADN : GÉNÉTIQUE VS EPIGÉNÉTIQUE

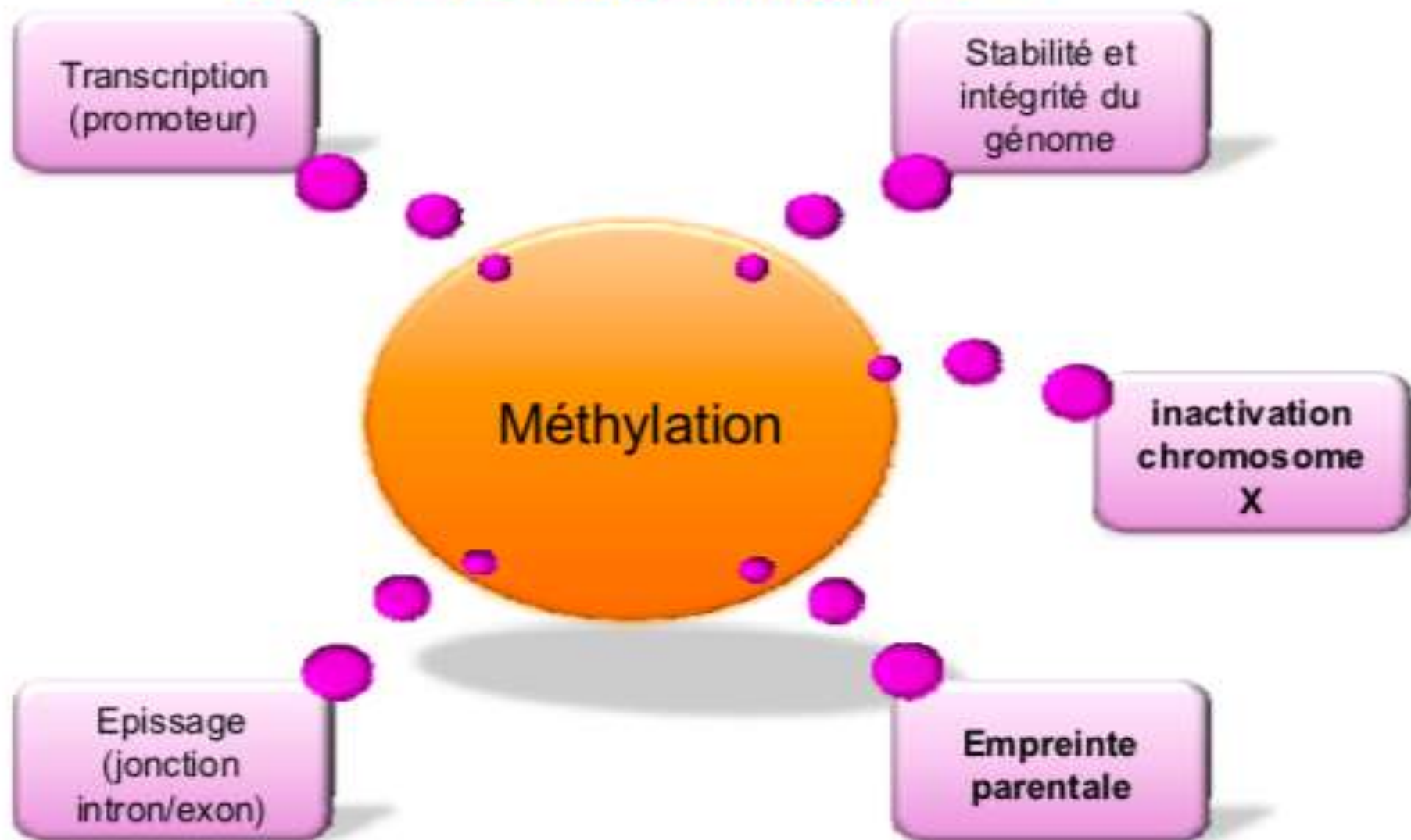
Génétique	Epigénétique
Modification de la séquence de l'ADN	Pas de modification de la séquence de l'ADN
Héritable = transmissible	Héritable = transmissible
<b>Irréversible</b>	<b>Réversible</b>

## Modifications épigénétiques de l'ADN



*Aristizabal MJ et al.  
PNAS sept 2020*

## 5mC : Fonctions moléculaires



# 5mC: un des acteurs en EPIGÉNÉTIQUE

## Répartition sur le génome humain

### □ Méthylation de l'ADN (5mC) :

- sur dans l'ensemble du génome : 70% à 80% des CpG sont méthylés
- % méthylation diffère en f<sup>o</sup> des tissus/âge/environnement
- classification des promoteurs selon la densité en CpG
- **Ilôts CpG**
  - zones riches en dinucléotide CG, fréqmt associées aux régions 5' des gènes des vertébrés
  - C+G > 55% ( ≈ 70% C+G contre 40% dans le reste du génome humain)
  - Taille ≥ 200pb (1-2 kb)
- souvent associée à formation de l'hétérochromatine, inhibition recombinaison homologue et répression de l'expression des gènes
- action directe sur l'expression des gènes en empêchant fixation de protéines qui contrôlent la transcription.

*(Law and Jacobsen, 2010; Portela and Esteller, 2010; Suzuki and Bird, 2008)*

### □ Hydroxyméthylation de l'ADN (5hmC) : majoritairement dans le cerveau

*(Weber et al, 2007)*

# 5mC: un des acteurs en EPIGÉNÉTIQUE

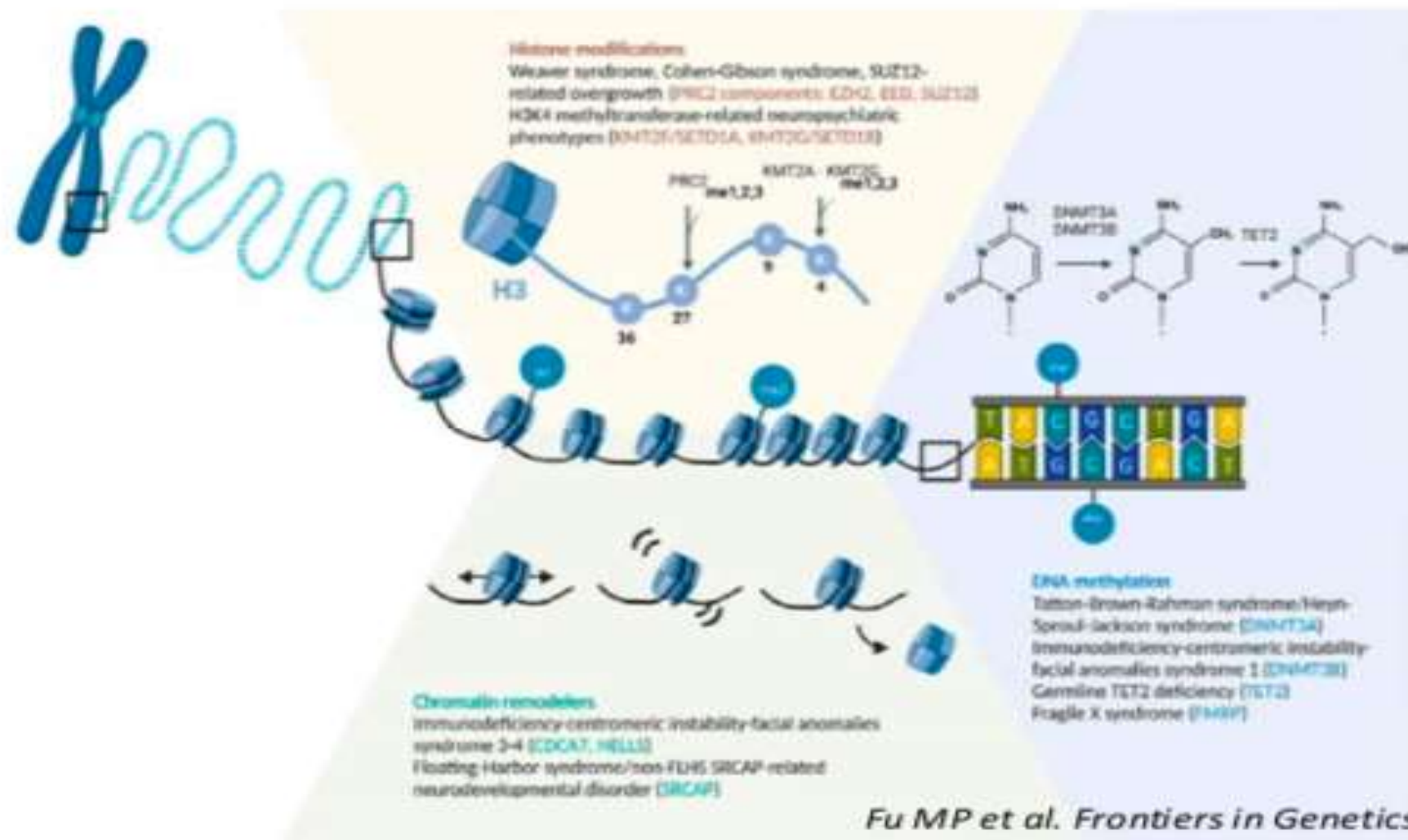
## intérêt en santé

- ❑ **Episignatures 5mC** : « DNA methylation based classification »  
changements de méthylation à de multiples loci à travers le génome  
→ Elles peuvent être spécifiques d'un syndrome ou d'une tumeur particulière
- ❑ **Epivariations 5mC (ou épivariants)**  
changements de méthylation à un locus unique

On distingue :

- **épivariations primitives** : erreurs dans l'établissement ou la maintenance d'un état épigénétique  
Ex : syndrome de Lynch sporadique  
épivariation constitutionnelle gène *MLH1* = hyperméthylation promoteur *MLH1*
- **épivariations secondaires** : résultent d'un changement de séquence ADN  
Ex : syndrome de l'X Fragile (*FRAXA*)  
expansion CGG dans le gène *FMR1* = hyperméthylation promoteur *FMR1*

## RDEOs : Rare diseases of epigenetic origin



# Episignatures dans les RDEOs



The American Journal of Human Genetics 102, 156–174, January 4, 2018

## Genomic DNA Methylation Signatures Enable Concurrent Diagnosis and Clinical Genetic Variant Classification in Neurodevelopmental Syndromes

Erfan Aref-Eshghi,<sup>1,2</sup> David L. Rodenhiser,<sup>3</sup> Laila C. Schenkel,<sup>1</sup> Hanxin Lin,<sup>1,2</sup> Cindy Skinner,<sup>4</sup> Peter Ainsworth,<sup>1,2</sup> Guillaume Paré,<sup>2</sup> Rebecca L. Hood,<sup>6</sup> Dennis E. Bulman,<sup>7</sup> Kristin D. Kernofan,<sup>7</sup> Care4Rare Canada Consortium,<sup>1,2,5</sup> and Bekim Sadikovic<sup>1,2,5</sup>

14 episignatures (v1\_2018)

The American Journal of Human Genetics 104, 685–700, April 4, 2019

## Diagnostic Utility of Genome-wide DNA Methylation Testing in Genetically Unsolved Individuals with Suspected Hereditary Conditions

Erfan Aref-Eshghi,<sup>1,2</sup> Eric Melanie Napier,<sup>6</sup> Lauren Jennifer Kerkhof,<sup>7</sup> Alan Natalya Karp,<sup>8</sup> Chitra P. Hansin Lin,<sup>1,2</sup> David L. and Bekim Sadikovic<sup>1,2,5</sup>

42 epi-signatures (v2\_2020)

The American Journal of Human Genetics 106, 1–15, March 5, 2020

## Evaluation of DNA Methylation Episignatures for Diagnosis and Phenotype Correlations in 42 Mendelian Neurodevelopmental Disorders

Erfan Aref-Eshghi,<sup>1</sup> Jennifer Kerkhof,<sup>1</sup> Victor E. Pedro,<sup>7</sup> Groupe DE France,<sup>2</sup> Mouna Barat-Houari,<sup>4</sup> Peter Lacombe,<sup>9</sup> Julien Van-Gils,<sup>9</sup> Patricia Fergelot,<sup>9</sup> Sandeau,<sup>9</sup> François Lecoquierre,<sup>9</sup> Nicolas Chatron,<sup>10</sup> Damien Sanlaville,<sup>10</sup> Thauvin-Robinet,<sup>11,12</sup> Frédéric Laumonnier,<sup>13,14</sup> Gens,<sup>14</sup> Peter Henneman,<sup>14</sup> Raoul C. Hennekam,<sup>14</sup>



Genet Med. 2021 Feb 26. doi: 10.1038/s41436-021-01130-z.

## Clinical epigenomics: genome-wide DNA methylation analysis for the diagnosis of Mendelian disorders

Bekim Sadikovic<sup>1,2,5</sup>, Michael A. Levi<sup>1,2</sup>, Jennifer Kerkhof<sup>1,2</sup>, Erfan Aref-Eshghi<sup>1,2</sup>, Laila Schenkel<sup>1,2</sup>, Alan Stuart<sup>1,2</sup>, Haley McCorkley<sup>1,2</sup>, Peter Henneman<sup>1,2</sup>, Andrea Venema<sup>1,2</sup>, Charles E. Schwartz<sup>1,2</sup>, Roger E. Stevenson<sup>1,2</sup>, Steven A. Skinner<sup>1,2</sup>, Barbara R. Dufford<sup>1,2</sup>, Robin S. Fletcher<sup>1,2</sup>, Tazee B. Babi<sup>1,2</sup>, Victoria Mok Siu<sup>1,2</sup>, Junjo L. Granadillo<sup>1,2</sup>, Jennifer Masters<sup>1,2</sup>, Mike Kadane<sup>1,2</sup>, Michael J. Fritz<sup>1,2</sup>, Mike M. van Hest<sup>1,2</sup>, Marcel M. A. M. Marrons<sup>1,2</sup>, Raymond J. Louie<sup>1,2</sup>, Jennifer A. Lee<sup>1,2</sup>, Matthew L. Toddler<sup>1,2</sup> and Marijella Altier<sup>1,2</sup>

66 epi-signatures (v3\_2021)

## Modifications épigénétiques, applications cliniques

### Marqueurs

---

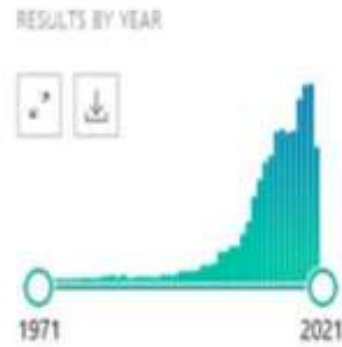
- prévoir l'apparition d'une tumeur,  
(tissu incriminé mais aussi autres tissus)
  
- diagnostiquer une tumeur  
(analyse de fluides biologiques: sang, urine, selles)  
Cologuard (2014) méthylation de NDRG4, BMP3 (Exact Sciences, USA)
  
- suivre l'apparition de récurrences
  
- classer les tumeurs



# MÉTHYLOME PAR PUCE INFINIUM EPIC (ILLUMINA)



- Analyse pangénomique quantitative de méthylation (>850k îlots CpG)
- Utilisation indispensable d'outils bio-informatiques et d'intelligence artificielle
- Accès libre et gratuit : algorithme « classifier » [www.moleculameuropathology.org](http://www.moleculameuropathology.org)
- Publications princeps : Sturm *et al.*, Cell 2016 puis Capper *et al.*, Nature 2018



D Capper *et al.* *Nature* **555**,  
469–474 (2018)

**nature**

Co-auteurs français :  
équipe Pascale Varlet

# EPISIGNATURES DES TUMEURS CEREBRALES

- Analyse pangénomique quantitative de méthylation (>850k îlots CpG)
- Accès libre et gratuit : algorithme « classifier » [www.molecularneuropathology.org](http://www.molecularneuropathology.org)  
D Capper *et al. Nature* 555,  
469–474 (2018)

nature

dkfz.

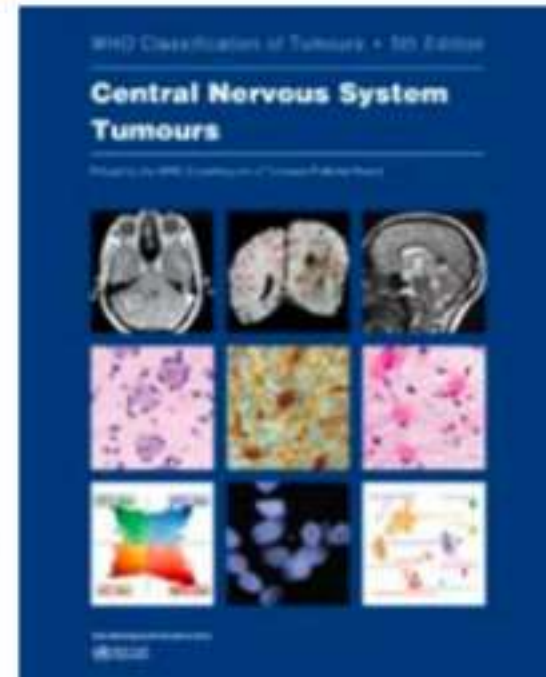


La Neuropathologie: discipline en pleine (r)évolution

2021 WHO CNS classification



45 types tumoraux incluent le méthylome  
comme critère essentiel ou nécessaire



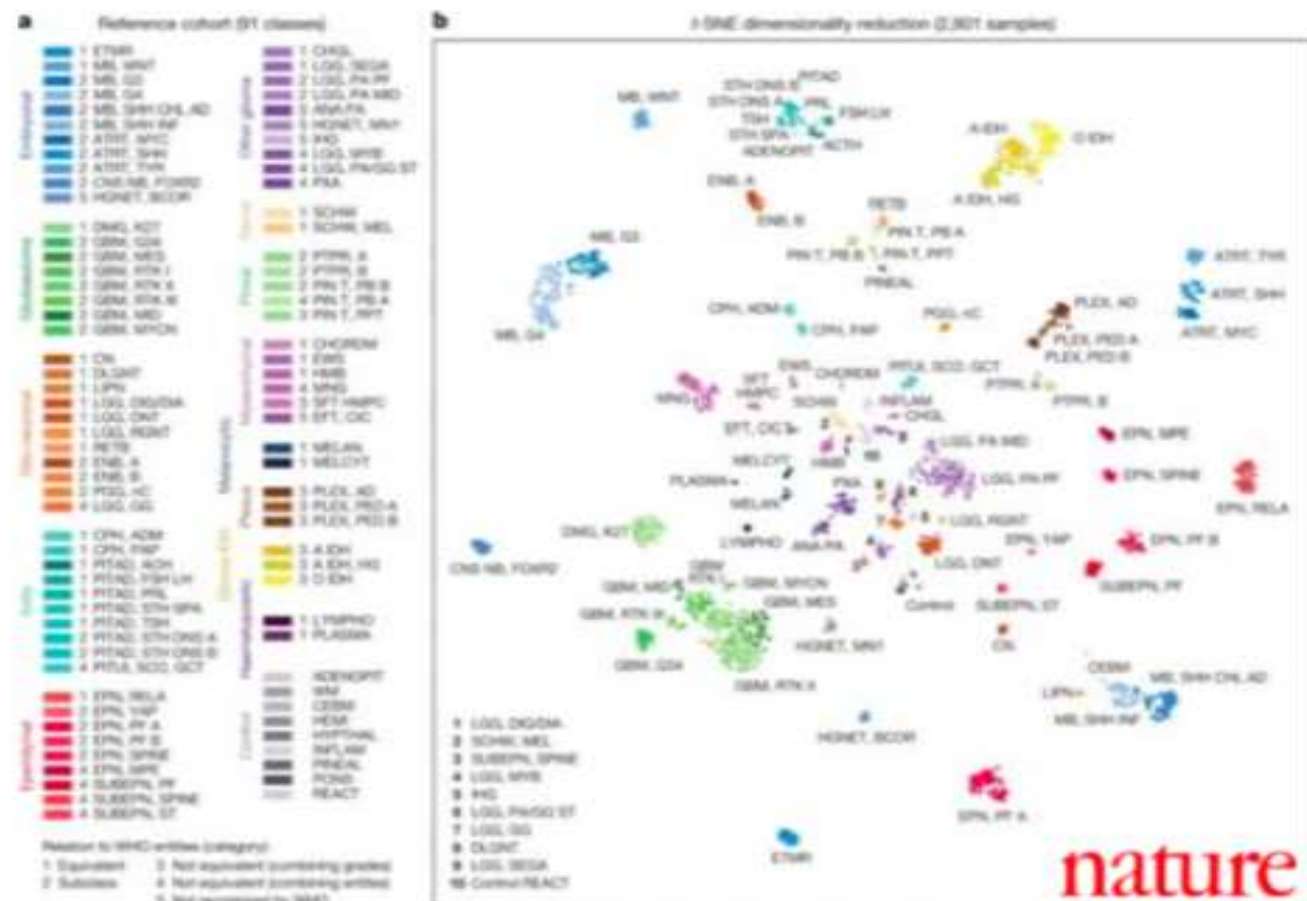
# EPISIGNATURES DES TUMEURS CEREBRALES



Co-auteurs français  
= équipe Pascale Varlet



Analyse statistique  
par t-SNE (stochastic neighbor  
embedding): visualisation de la  
position de la tumeur étudiée  
dans un cluster de référence



D Capper et al. Nature 555, 469–474 (2018)

# EPISIGNATURES DES TUMEURS CEREBRALES



Information échantillon anonymisé

1) Classification selon profil méthylation de la tumeur

SCORE INFORMATIF si > 0,9

reflète

- Cellule d'origine
- oncogenèse intrinsèque
- SV, CNV ou SNV pathogène

2) Profil de variation nombre de copies (CNV)

3) Profil de méthylation promoteur *MGMT*

CR intégré (anaph, DNaseq, methylome)



**RDEOs : Rare diseases  
of epigenetic origin**



**Tumeurs cérébrales**

Variants  
**constitutionnels**

**Cerveau**

Variants  
**somatiques**

Gènes impliqués dans la régulation épigénétique  
Histone modification ex *KMT2A/MLL*, ...  
Chromatin modeling ex *ATRX, SMARCB1*, ...

SNV, Indel, CNV, SV

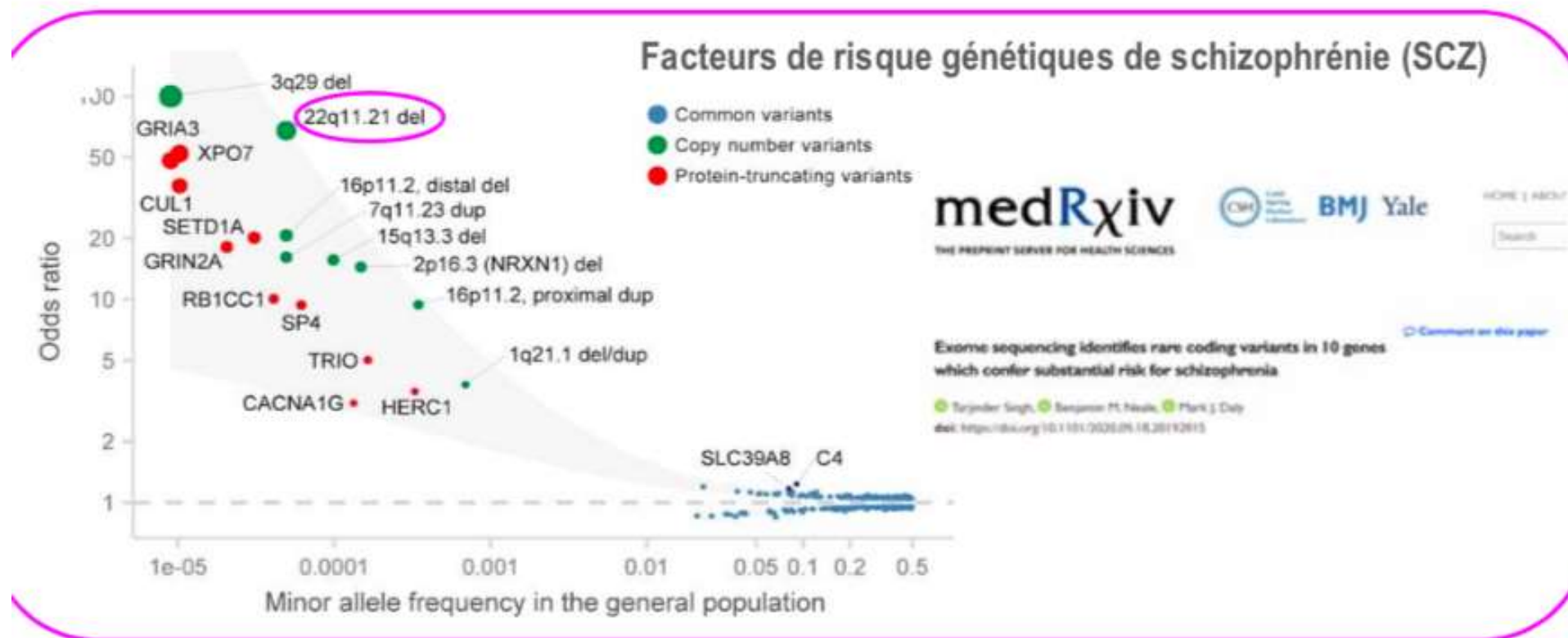
SNV, SV, fusions...

**Episignatures (5-mC)**

sang

Tumeur (FFPE)

# Apports du méthylome en soin : psychiatrie



## Screening for rare epigenetic variations in autism and schizophrenia

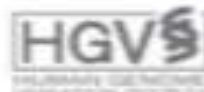
WILEY Human Mutation HGV

Paras Garg | Andrew J. Sharp

Received: 25 October 2018 | Revised: 19 February 2019 | Accepted: 6 March 2019

# Screening for rare epigenetic variations in autism and schizophrenia

WILEY Human Mutation



Paras Garg | Andrew J. Sharp 

Received: 25 October 2018 | Revised: 19 February 2019 | Accepted: 6 March 2019

Department of Genetics and Genomic Sciences, Mount Sinai School of Medicine, Hess Center for Science and Medicine, New York, New York

#### Correspondence

Andrew J. Sharp, Department of Genetics and Genomic Sciences, Mount Sinai School of Medicine, Hess Center for Science and Medicine, 1470 Madison Avenue, Room 8-116, Box 1496, New York, NY 10029.  
Email: andrew.sharp@mssm.edu

#### Funding information

National Human Genome Research Institute.  
Grant/Award Number: HG006696; NIH.  
Grant/Award Numbers: MH089606, 51000018522

## Abstract

While many studies have led to the identification of rare sequence variants linked with susceptibility to autism and schizophrenia, the contribution of rare epigenetic variations (epivariations) in these disorders remains largely unexplored. Previously we presented evidence that epivariations occur relatively frequently in the human genome, and likely contribute to a subset of congenital and neurodevelopmental disorders through the disruption of dosage-sensitive genes. Here we extend this approach, studying methylation profiles from 297 samples with autism and 767 cases with schizophrenia, identifying 84 and 268 rare epivariations in these two cohorts, respectively, that were absent from 4,860 population controls. We observed multiple features associated with these epivariations that support their pathogenic relevance, including (a) a significant enrichment for epivariations in schizophrenic individuals at genes previously linked with schizophrenia, (b) increased brain expression of genes associated with epivariations found in autism cases compared with controls, (c) in autism families, a significant excess of epivariations found specifically in affected versus unaffected sibs, (d) Gene Ontology terms linked with epivariations found in autism, including "D1 dopamine receptor binding." Our study provides additional evidence that rare epivariations likely contribute to the mutational spectra underlying neurodevelopmental disorders.

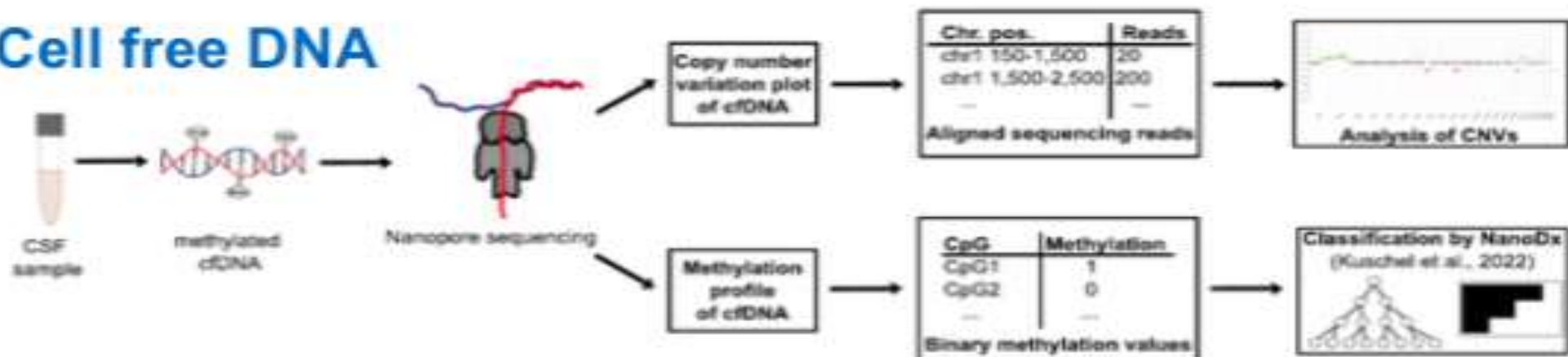


perspectives

# What's next ? Détection non invasive et plus rapide



## Cell free DNA



Chr. pos.	Reads
chr1 150-1,500	20
chr1 1,500-2,500	200
...	...

Aligned sequencing reads

CpG	Methylation
CpG1	1
CpG2	0
...	...

Binary methylation values

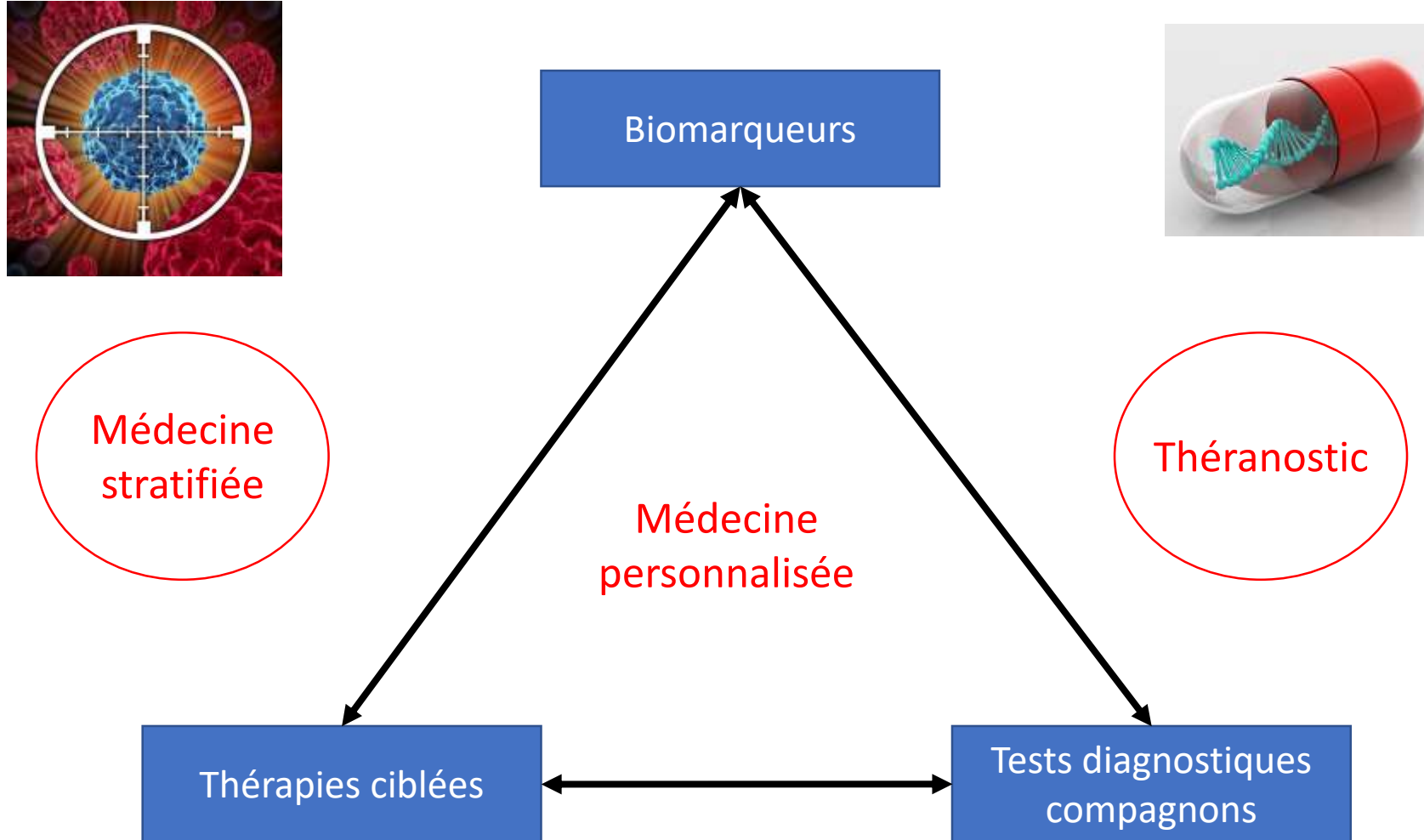
## Episignatures / Tumeurs cérébrales



CpG	Methylation
CpG1	1
CpG2	0
...	...
CpG450k	1

Binary methylation values of 450k CpG sites

# En résumé



**Innovation (biotechnologique, informatique, ...)**