

XVIII<sup>es</sup> JOURNEES DE SENOLOGIE INTERACTIVE 2015  
CENTRE DES MALADIES DU SEIN DE L'HOPITAL SAINT- LOUIS

# LES VOIES DE SIGNALISATION POUR LES NULS

---

F. Ledoux, L. Teixeira, B. Tournant, P.  
Charveriat, H. Hocini, N. Sevenet

# Qu'est-ce qu'une voie de signalisation ?

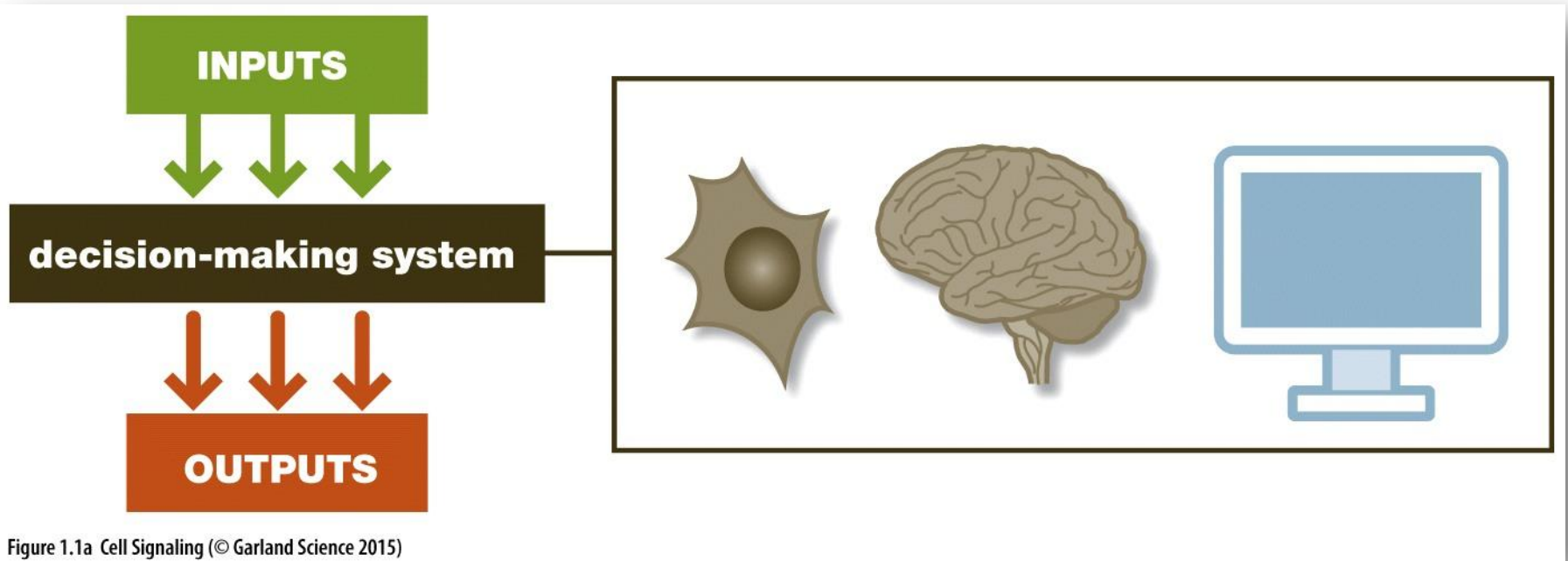


Figure 1.1a Cell Signaling (© Garland Science 2015)

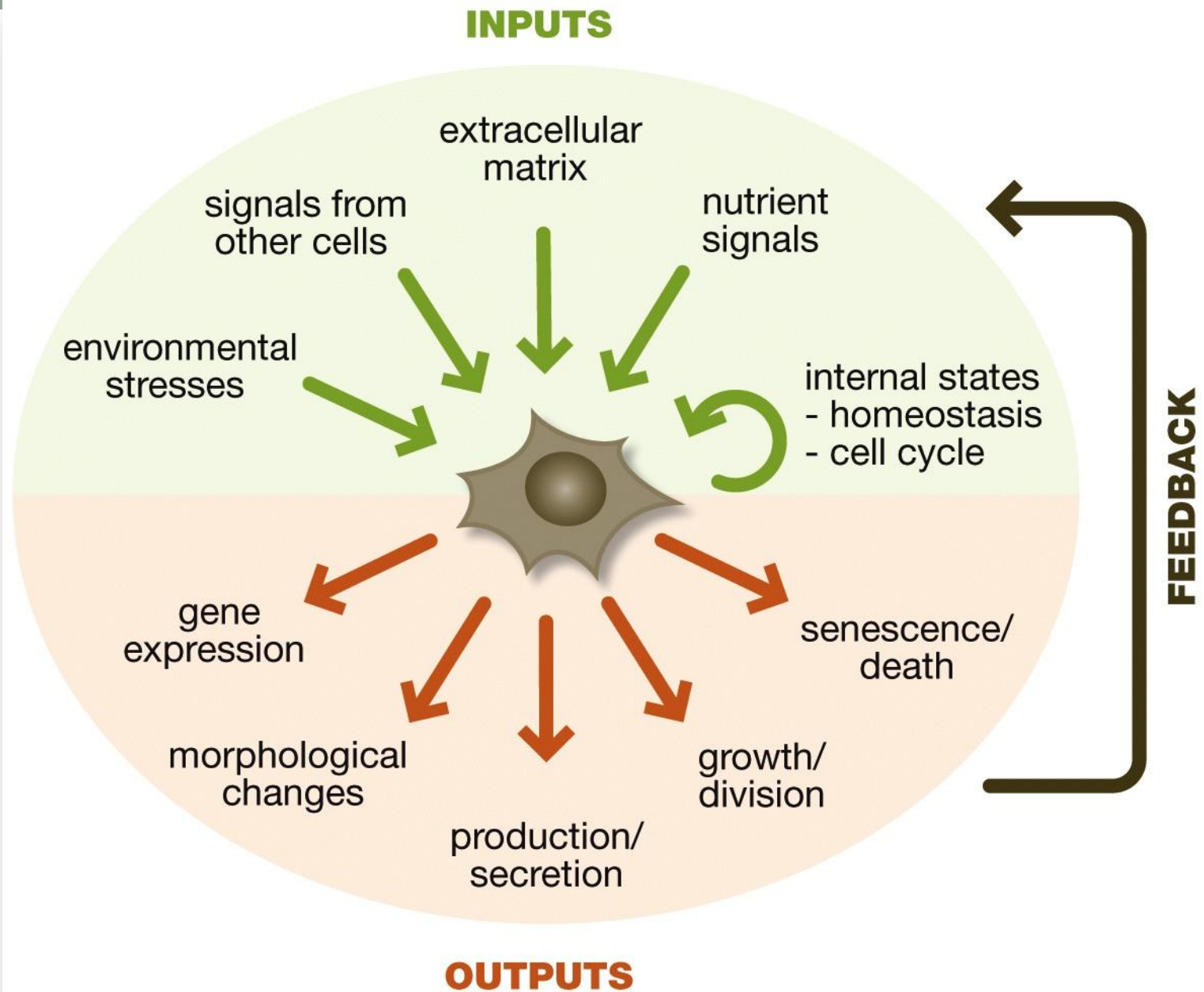


Figure 1.2 Cell Signaling (© Garland Science 2015)

# Des voies de signalisation pour ...

- Transmettre une information (stimulus, -i)
- Entraîner une modification cellulaire (métabolisme, processus physiologique, ...)
- Re-transmettre l'information
- Cette information doit être correctement comprise (intégrée) par la cellule puis délivrée de manière contrôlée dans le temps et l'espace
- Importance de la spécificité des voies malgré leur « complexité »
- Nécessité de feedback (régulation négative/positive)

# Dans une voie de signalisation cellulaire, il y a toujours 2 compartiments

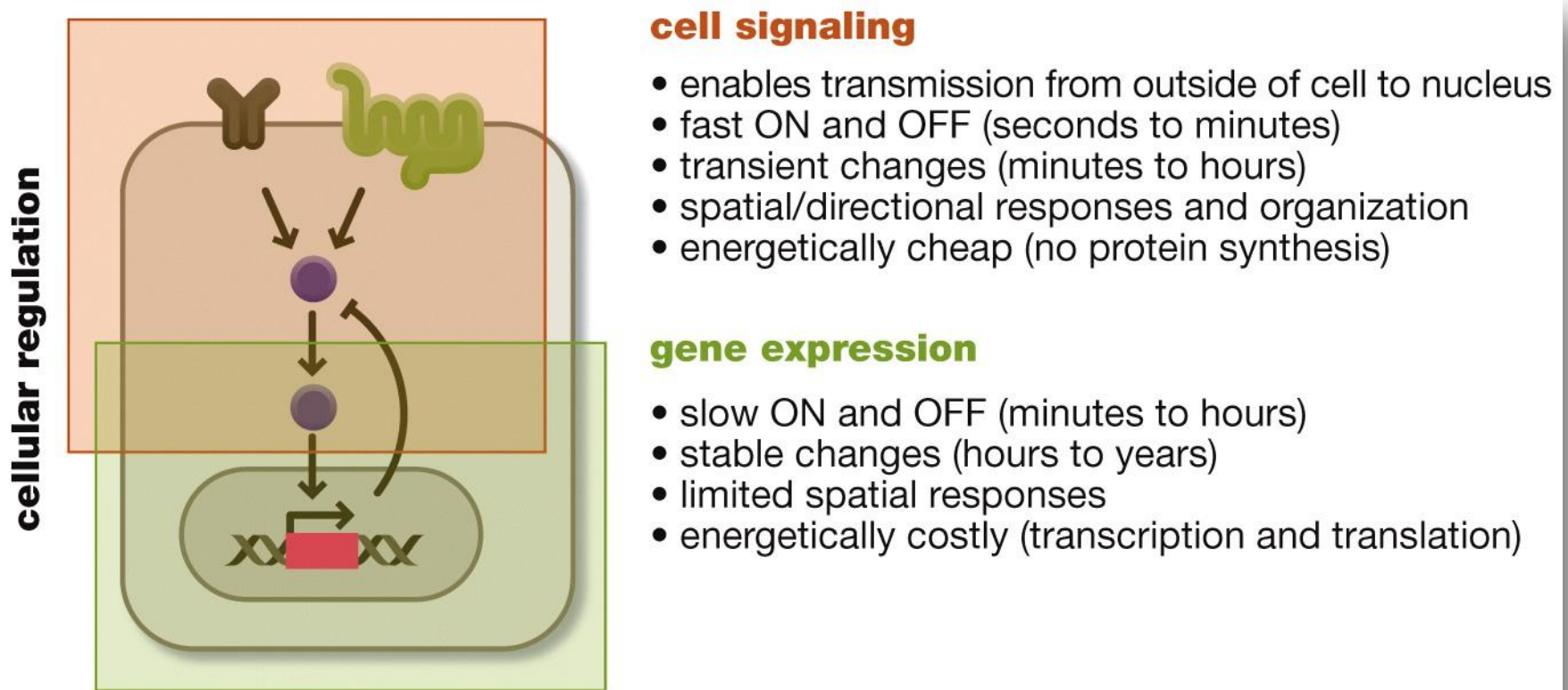


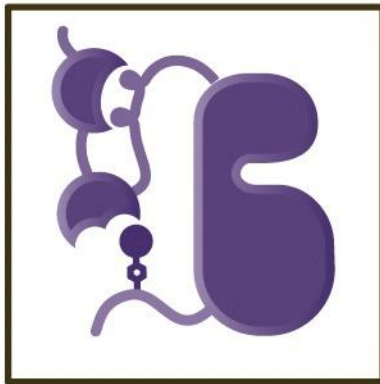
Figure 1.5 Cell Signaling (© Garland Science 2015)

molecular  
signaling device

network  
signaling device

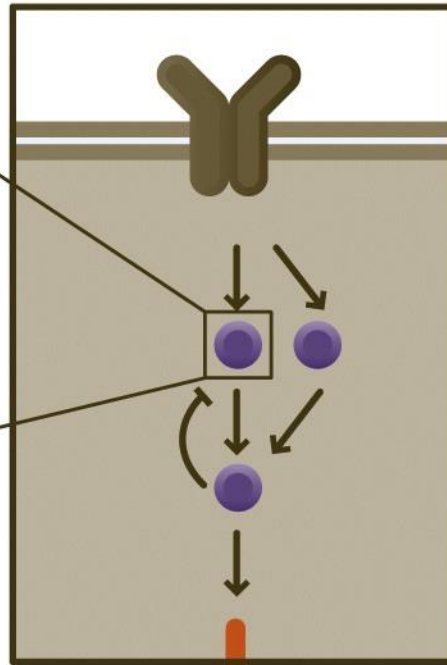
cellular  
signaling device

**INPUTS**



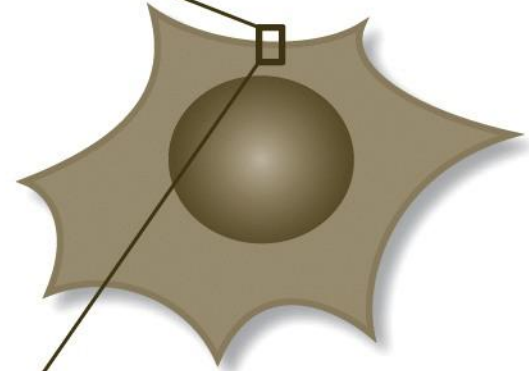
**OUTPUTS**

**INPUTS**



**OUTPUTS**

**INPUTS**



**OUTPUTS**

Figure 1.11 Cell Signaling (© Garland Science 2015)

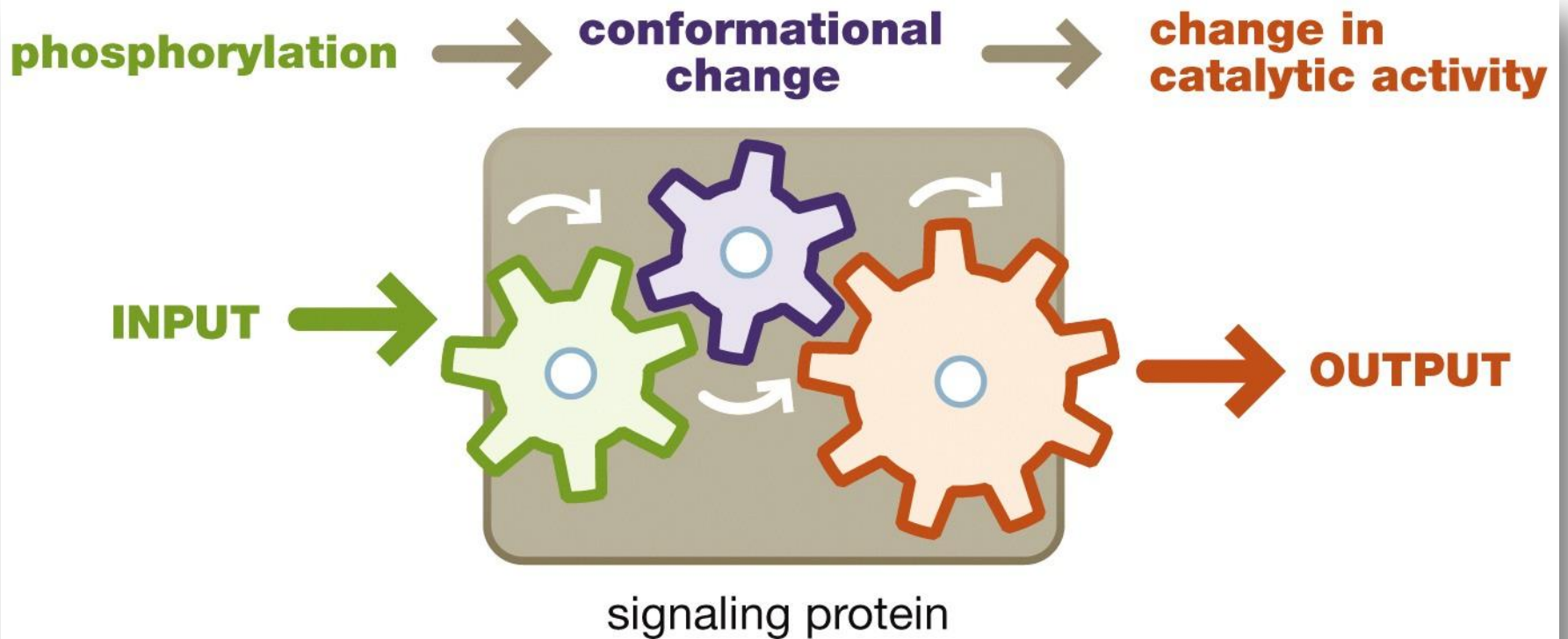


Figure 1.8 Cell Signaling (© Garland Science 2015)



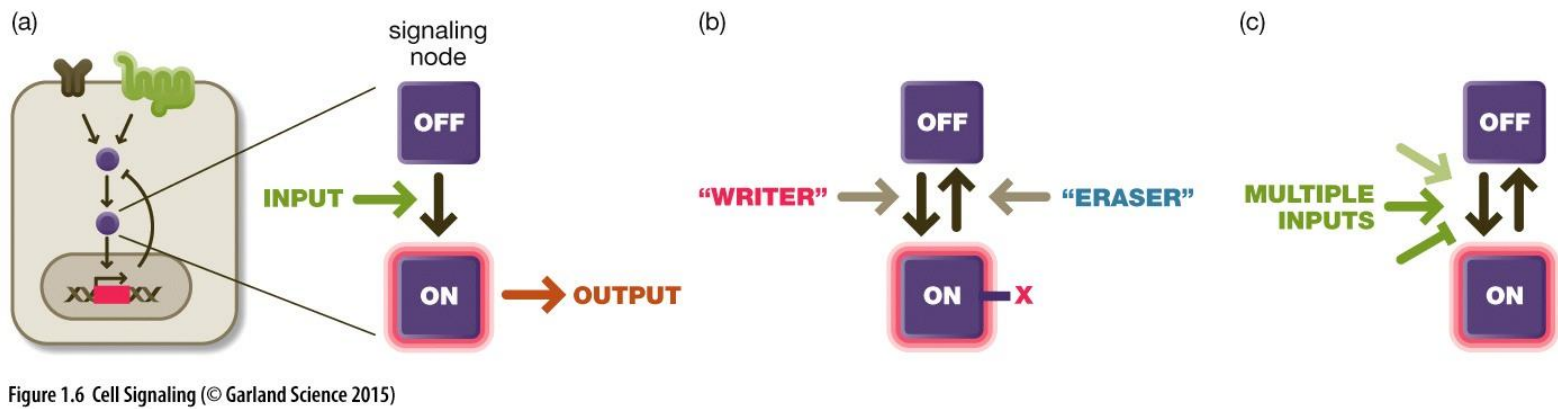


Figure 1.6 Cell Signaling (© Garland Science 2015)

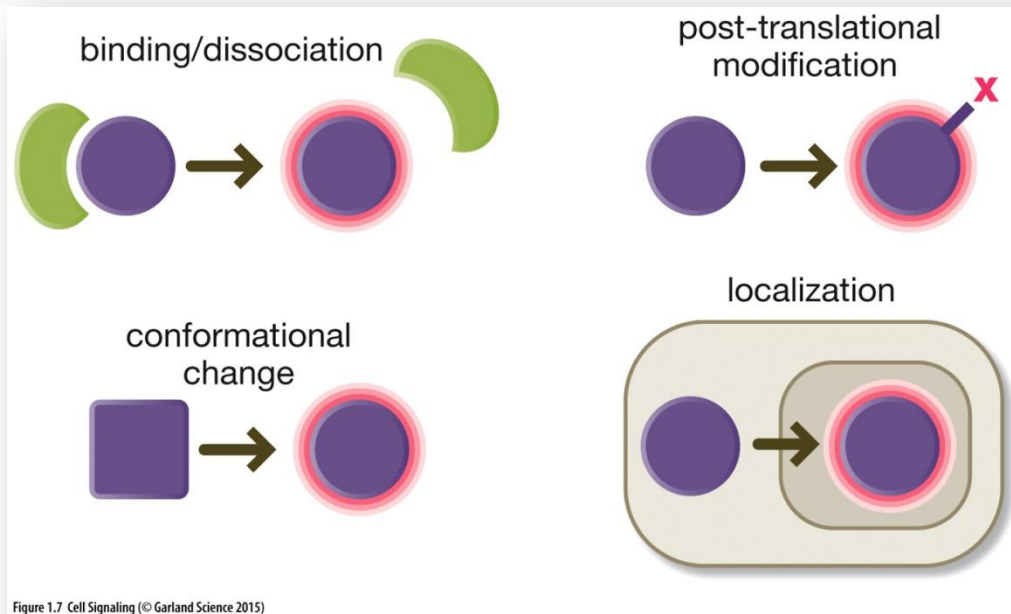
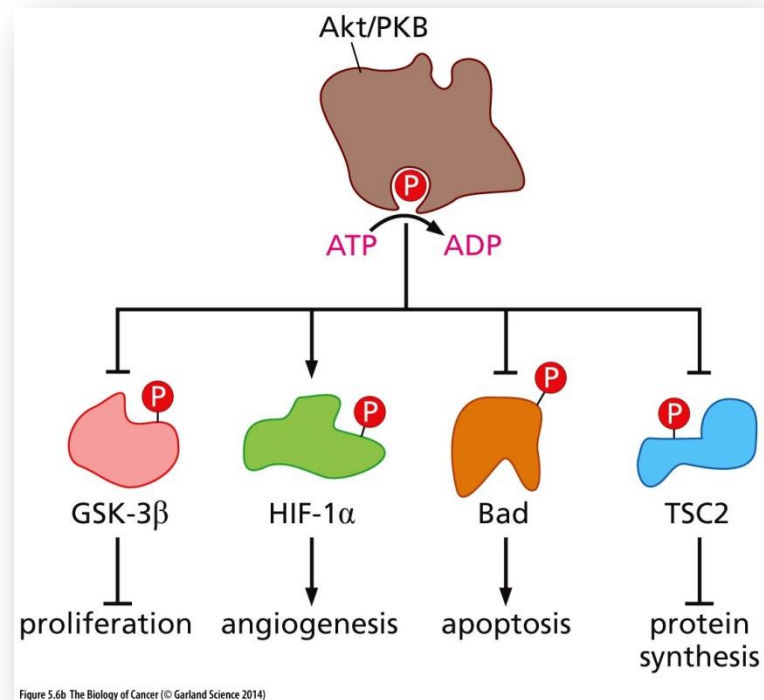


Figure 1.7 Cell Signaling (© Garland Science 2015)



# L'activation d'une protéine se fait par phosphorylation

- Activité protéine-kinase
  - Sur des résidus
    - Tyrosine (0,05-0,1%)
    - sérine et/ou thréonine (>99,5%)
  - Cibles
    - Autres protéines (*downstream target*)
    - Autophosphorylation
- Transduction du signal mitogénique
  - Tyrosine kinase



# 5 « méta-voies » de signalisation impliquées dans les processus cancéreux

pathway	Ras	pRb	p53	telomeres
genes/agents used to deregulate pathway	<i>ras</i> , <i>MEK</i> + <i>Akt/PKB</i> , <i>MEK</i> + <i>IKBK<math>\epsilon</math></i> , <i>PAK1</i> + <i>Akt/PKB</i>	<i>SV40 LT</i> , <i>CDK4 + D1</i> , <i>HPV E7</i> , <i>Rb shRNA</i>	<i>SV40 LT</i> , DN <i>p53</i> , <i>HPV E6</i> , <i>p53 shRNA</i>	<i>hTERT</i> , <i>myc + SV40 LT</i>

Figure 11.27 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Perte de contrôle du cycle cellulaire

Induction de l'immortalité

Induction de la division cellulaire

Perte de contrôle de l'intégrité de l'ADN

# Ras, un acteur central des voies de signalisation

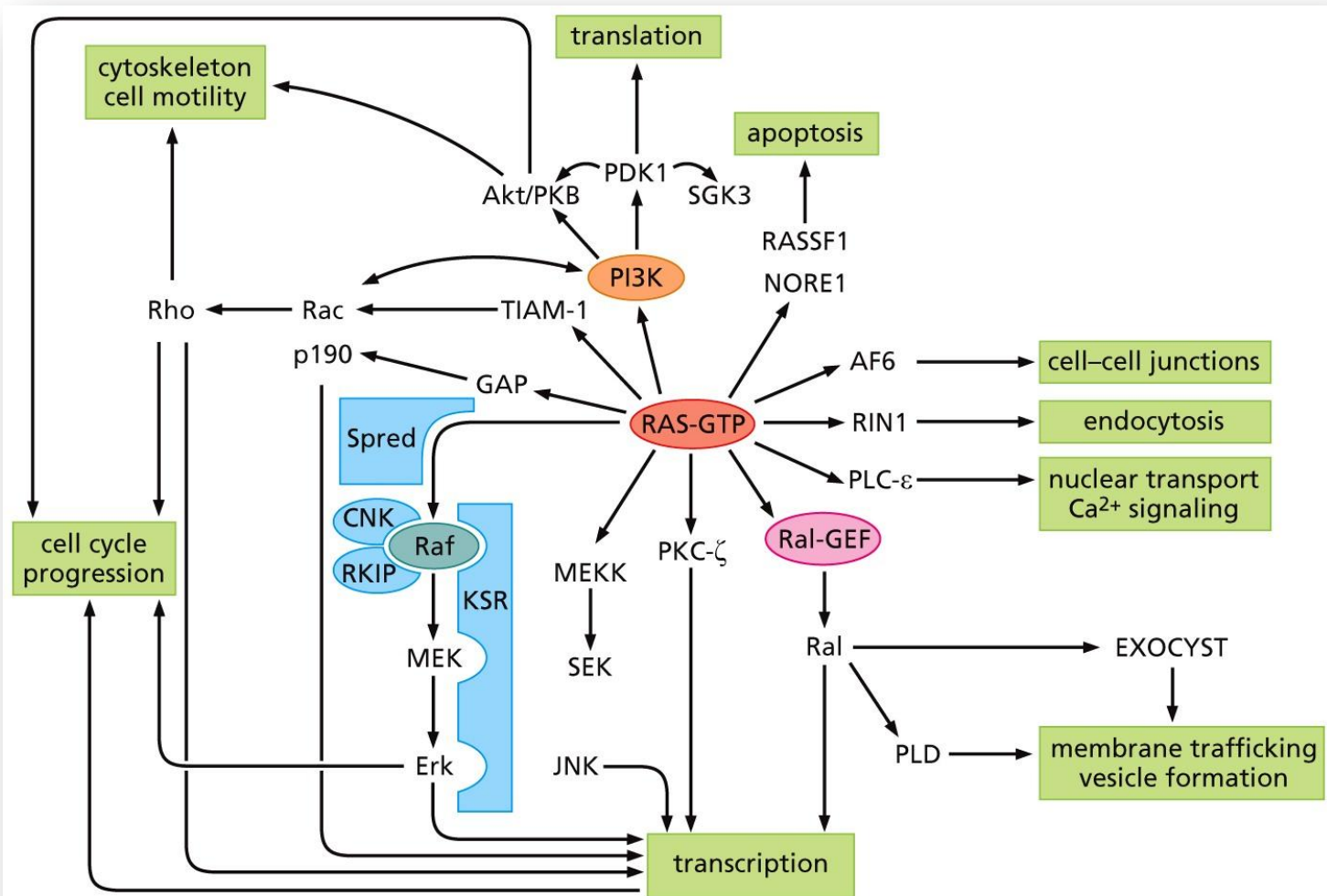
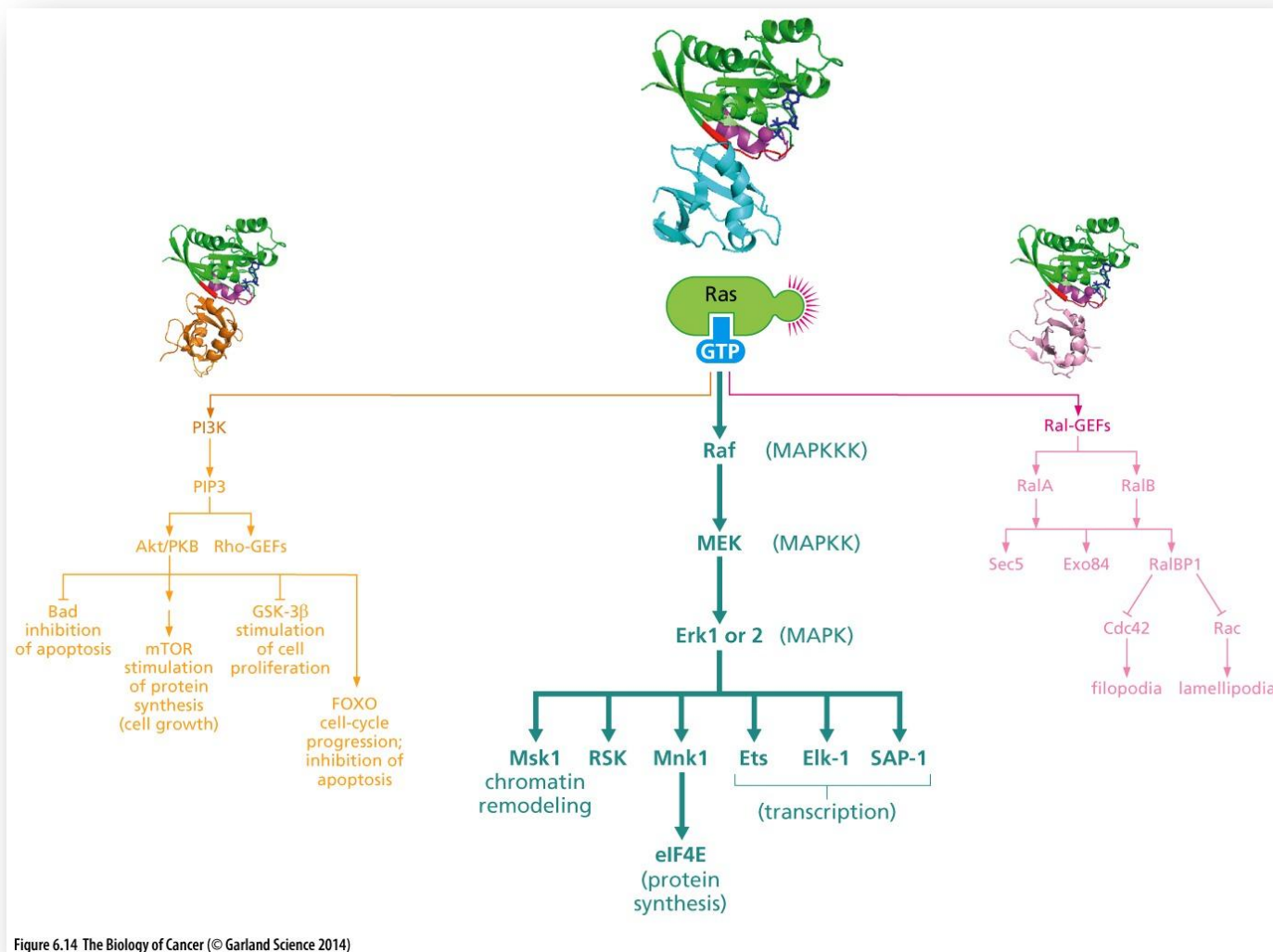


Figure 6.33 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

# Les 3 principales voies contrôlées par RAS



# Feedback de régulation

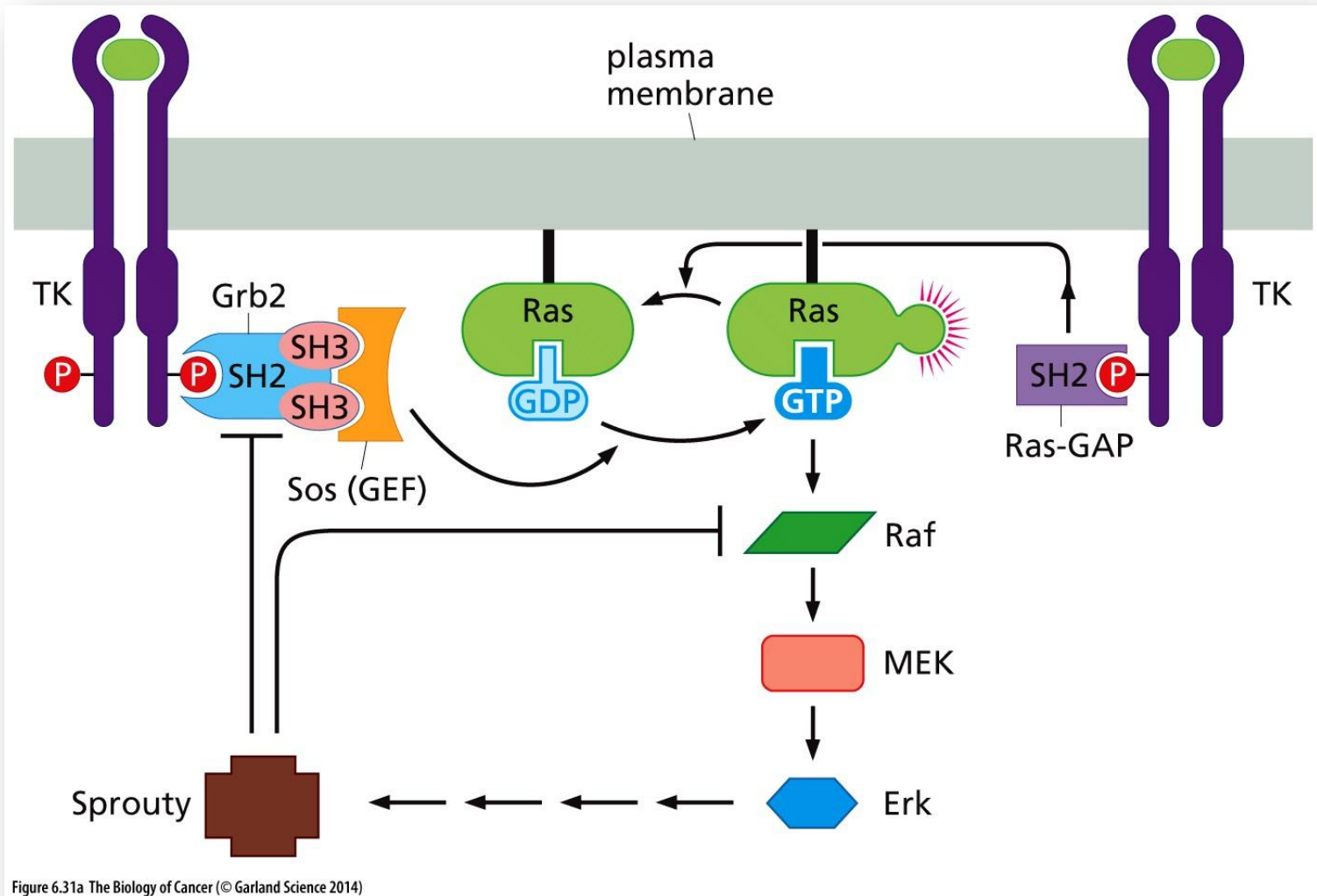
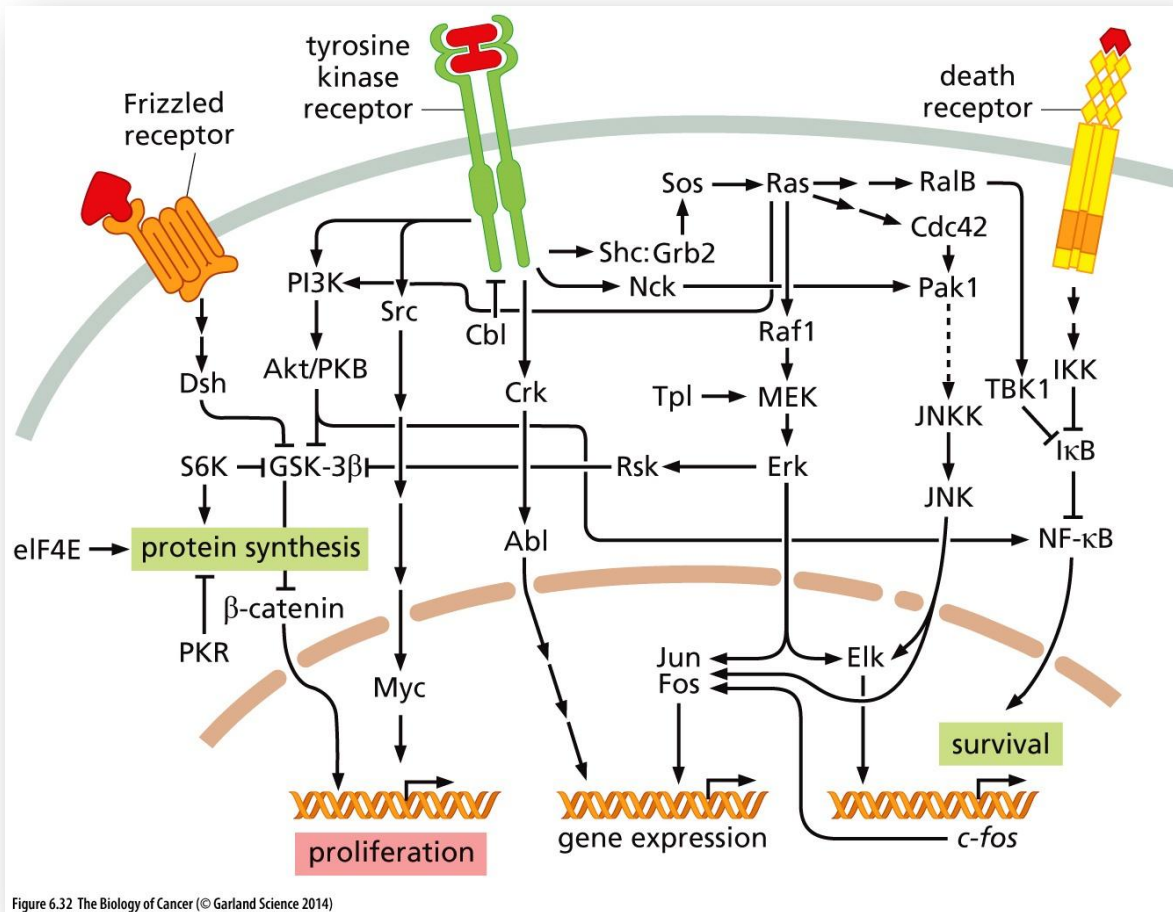
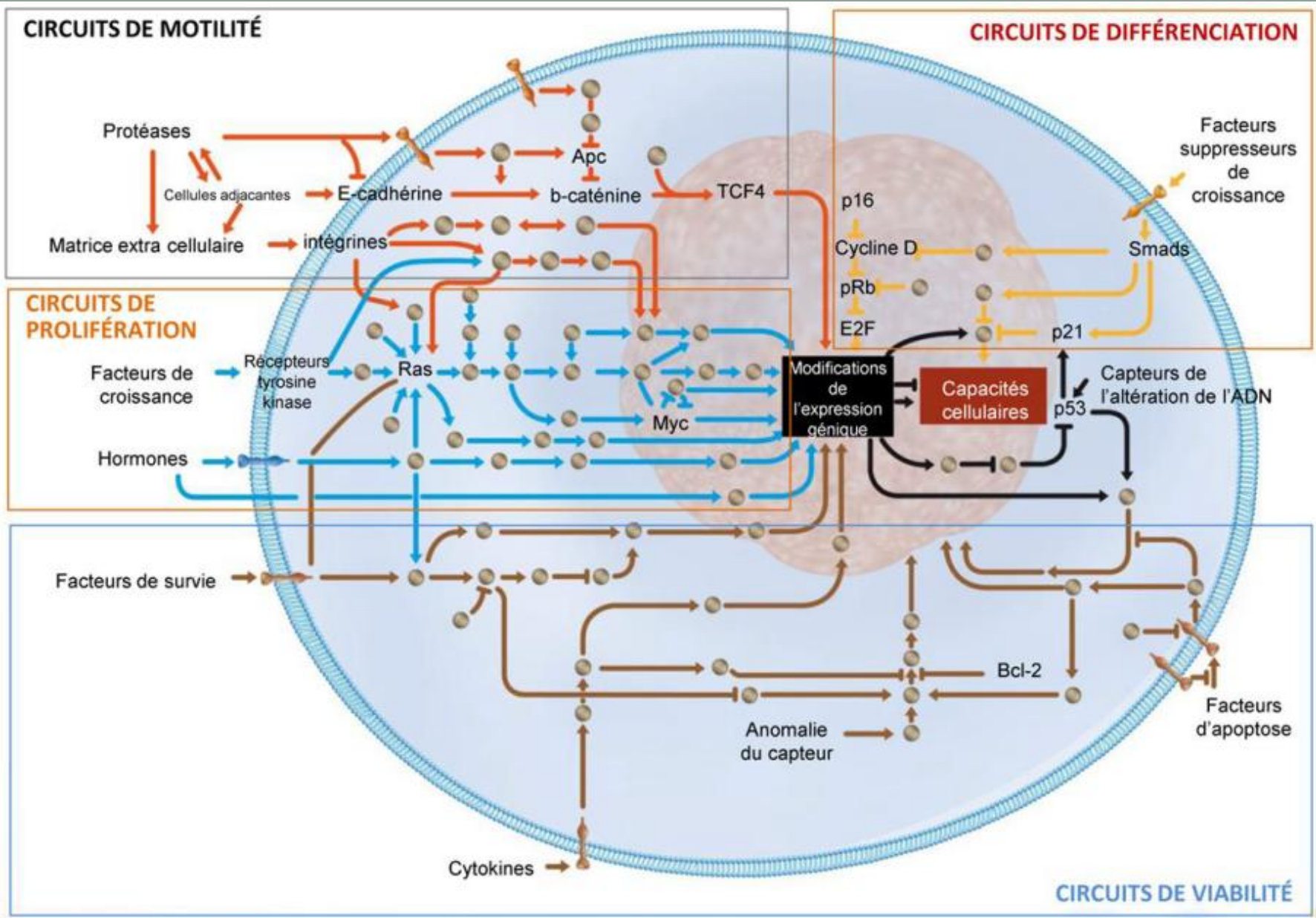


Figure 6.31a The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

# Les voies de signalisation ne sont pas linéaires







D'après Hanahan D, et al. Cell 2011



# Cancers du sein : Principaux médicaments

## **Cytotoxiques sur les cellules en cycle**

- La chimiothérapie

## **Modificateurs de la réponse biologique**

- L'hormonothérapie
- Les thérapies « ciblées »

# Objectif

Bloquer spécifiquement un **mécanisme moléculaire** ou une **protéine** de la cellule tumorale jouant un rôle majeur dans une ou plusieurs voies de signalisation oncogénique

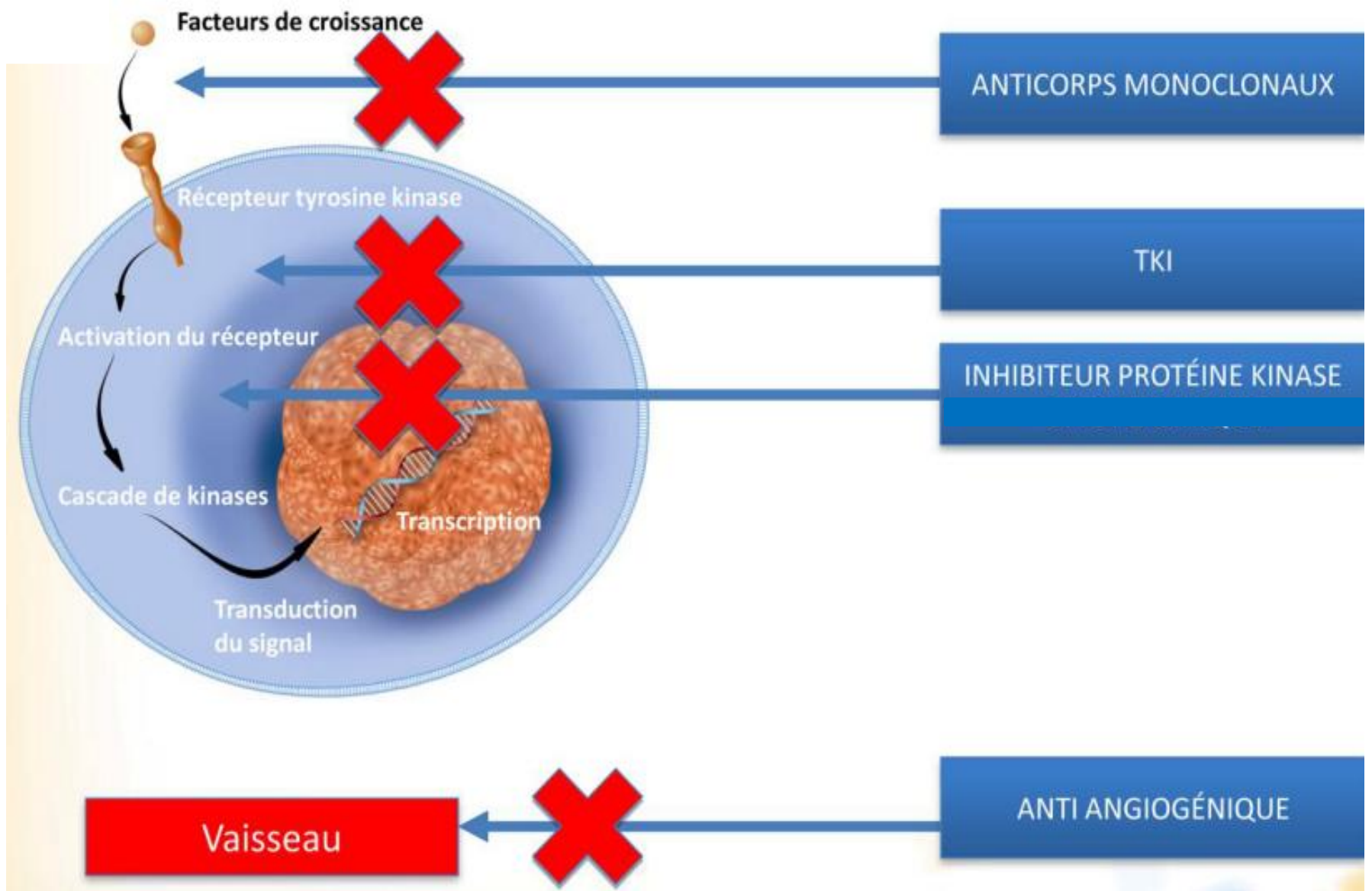
## Action

### ➔ directe sur la tumeur

- Partie extra cellulaire du récepteur à activité tyrosine kinase (Herceptin)
- Partie intra cellulaire du récepteur à activité tyrosine kinase (Lapatinib)
- En aval (cascade intra cellulaire : inhib. de mTor, inhib. de Cdk 4/6)

### ➔ indirecte sur la tumeur

Néovascularisation tumorale (antiangiogéniques)



Facteurs de croissance

ANTICORPS MONOCLONAUX

Récepteur tyrosine kinase

TKI

Activation du récepteur

INHIBITEUR PROTÉINE KINASE

Cascade de kinases

Transcription

Transduction du signal

Vaisseau

ANTI ANGIOGÉNIQUE

# Principales classes de thérapies ciblées utilisées dans le cancer du sein

## Ciblant HER2

« mabs »

Trastuzumab

Pertuzumab

T-DM1

« ibs »

Lapatinib

## Ciblant les RH

Hormonothérapie

## Inhibiteurs de kinases

Inhibiteurs mTor

Inh cdk 4/6

## Ciblant la réparation

Les PARP inhib.

## Ciblant l'angiogénèse

Bevacizumab

## Ciblant la réponse immunitaire

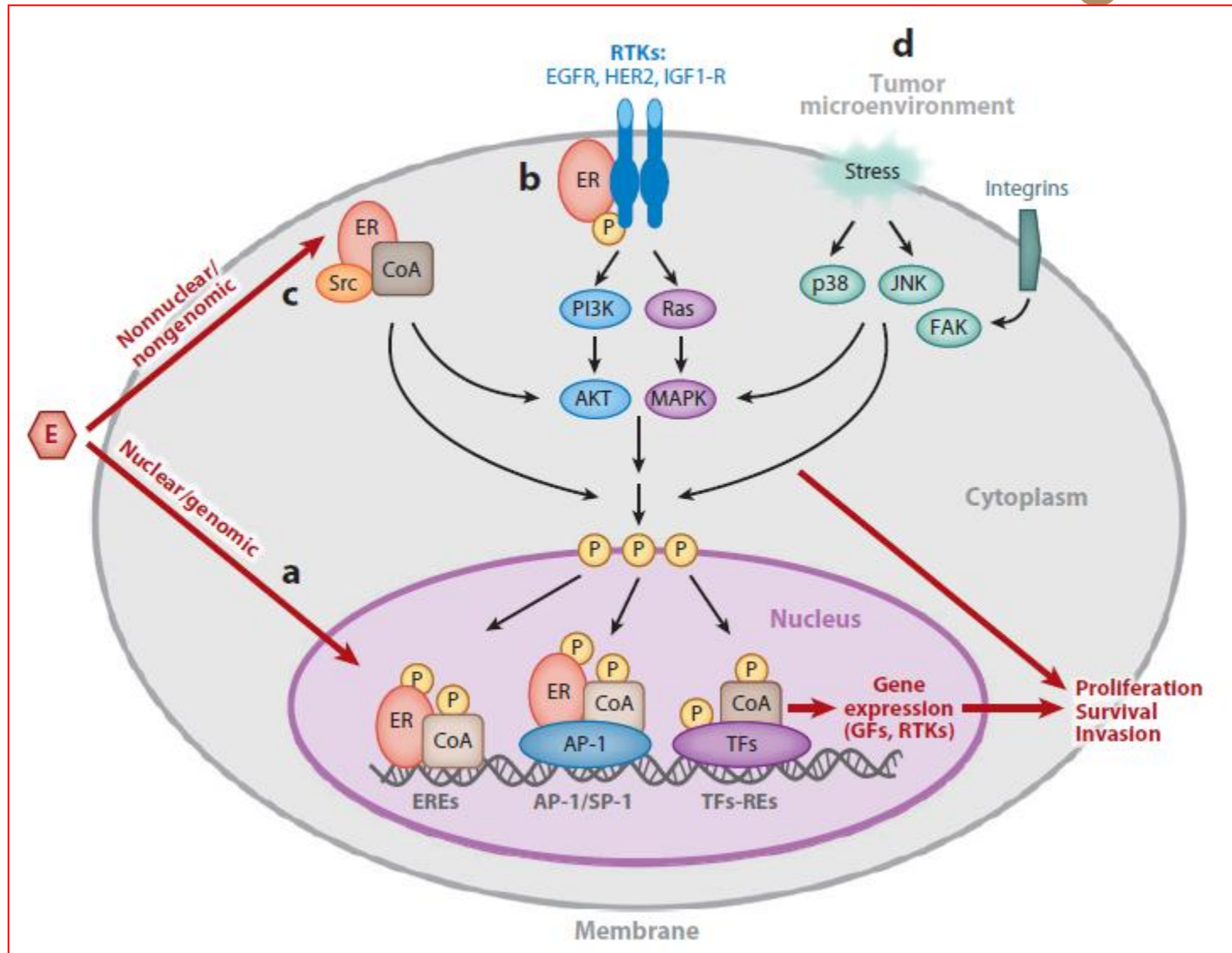
Anti CTLA4

Anti PD1/PDL1

# HORMONOTHÉRAPIE: COMMENT CONTOURNER L'HORMONO-RÉSISTANCE?

---

# Mécanisme d'action des œstrogènes



# Comment expliquer la résistance?

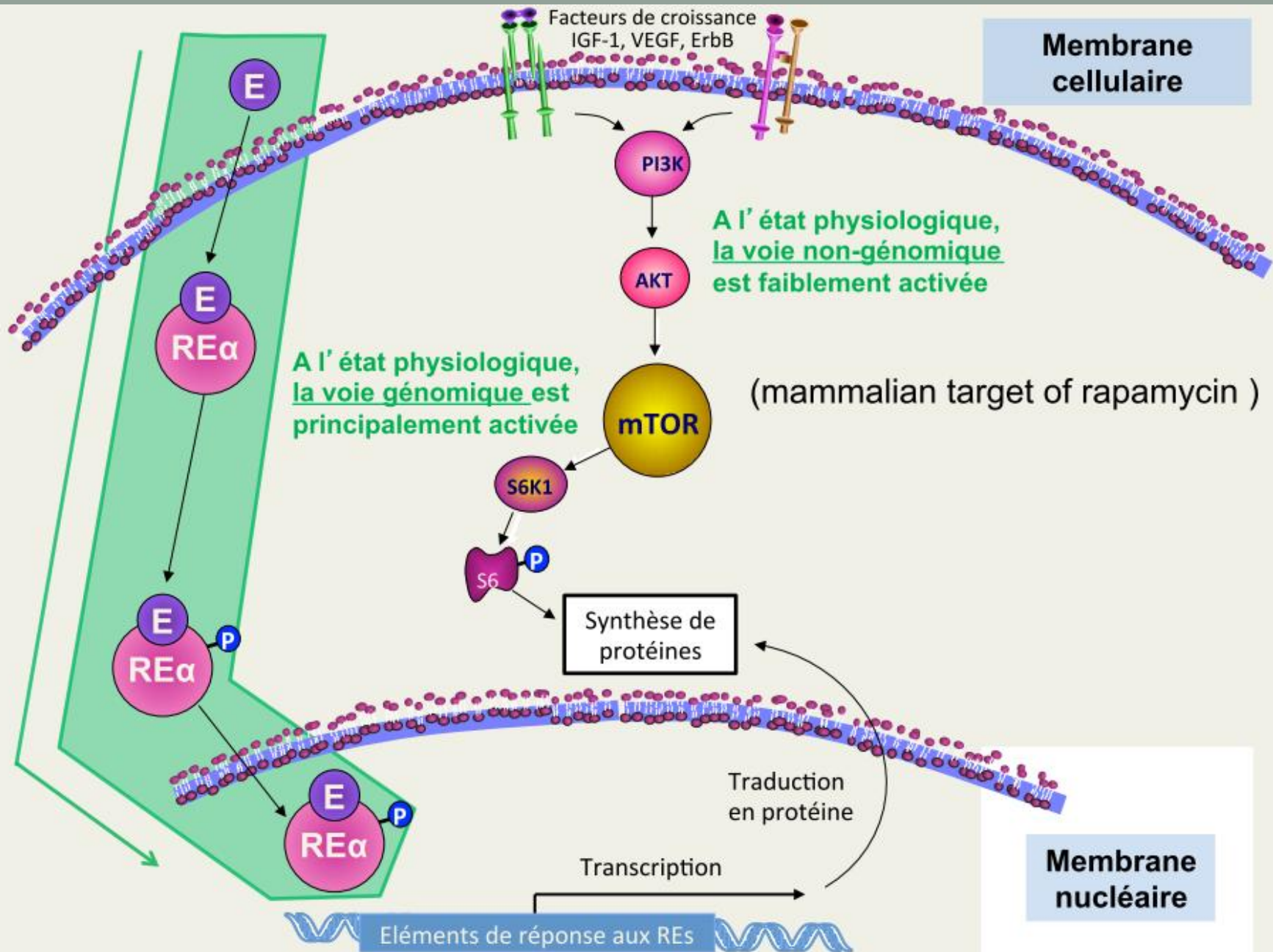
- **Résistance primaire**
- **Résistance secondaire acquise** ( 2 ans en adjuvant?)  
après des résultats thérapeutiques initialement satisfaisants.

## **Mécanismes :**

- sélection par le traitement de clones hormonorésistants
- modifications du métabolisme de la cellule tumorale avec activation d'autres voies métaboliques d'utilisation des estrogènes
- adaptation de la cellule cancéreuse à son nouvel environnement



# 1) Résistance à l'hormonothérapie via la voie de la Pi3K (mTOR)



exémestane

Déprivation en estrogène

Facteurs de croissance  
IGF-1, VEGF, ErbB

Membrane cellulaire

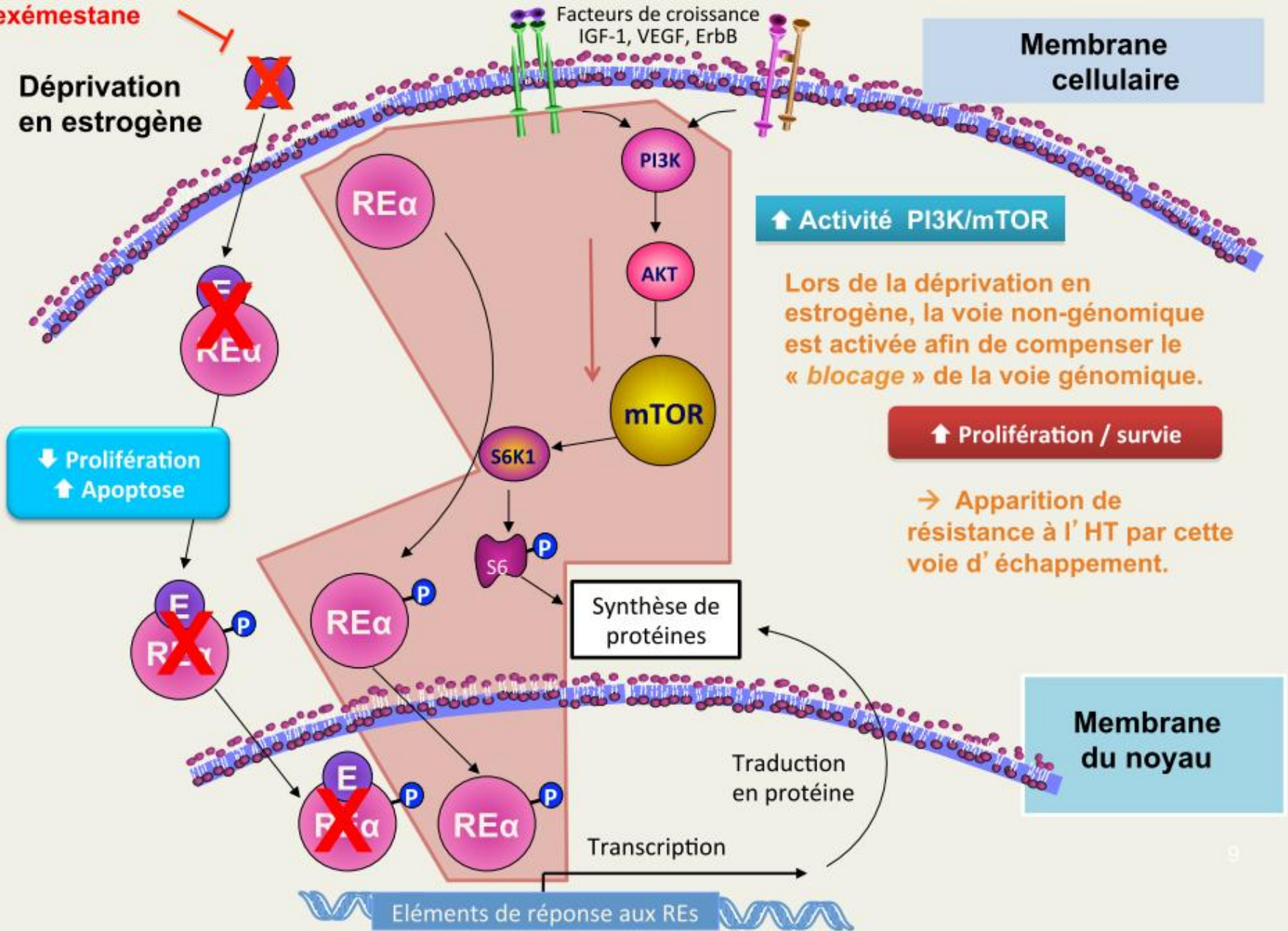
↑ Activité PI3K/mTOR

Lors de la déprivation en estrogène, la voie non-génomique est activée afin de compenser le « blocage » de la voie génomique.

↑ Prolifération / survie

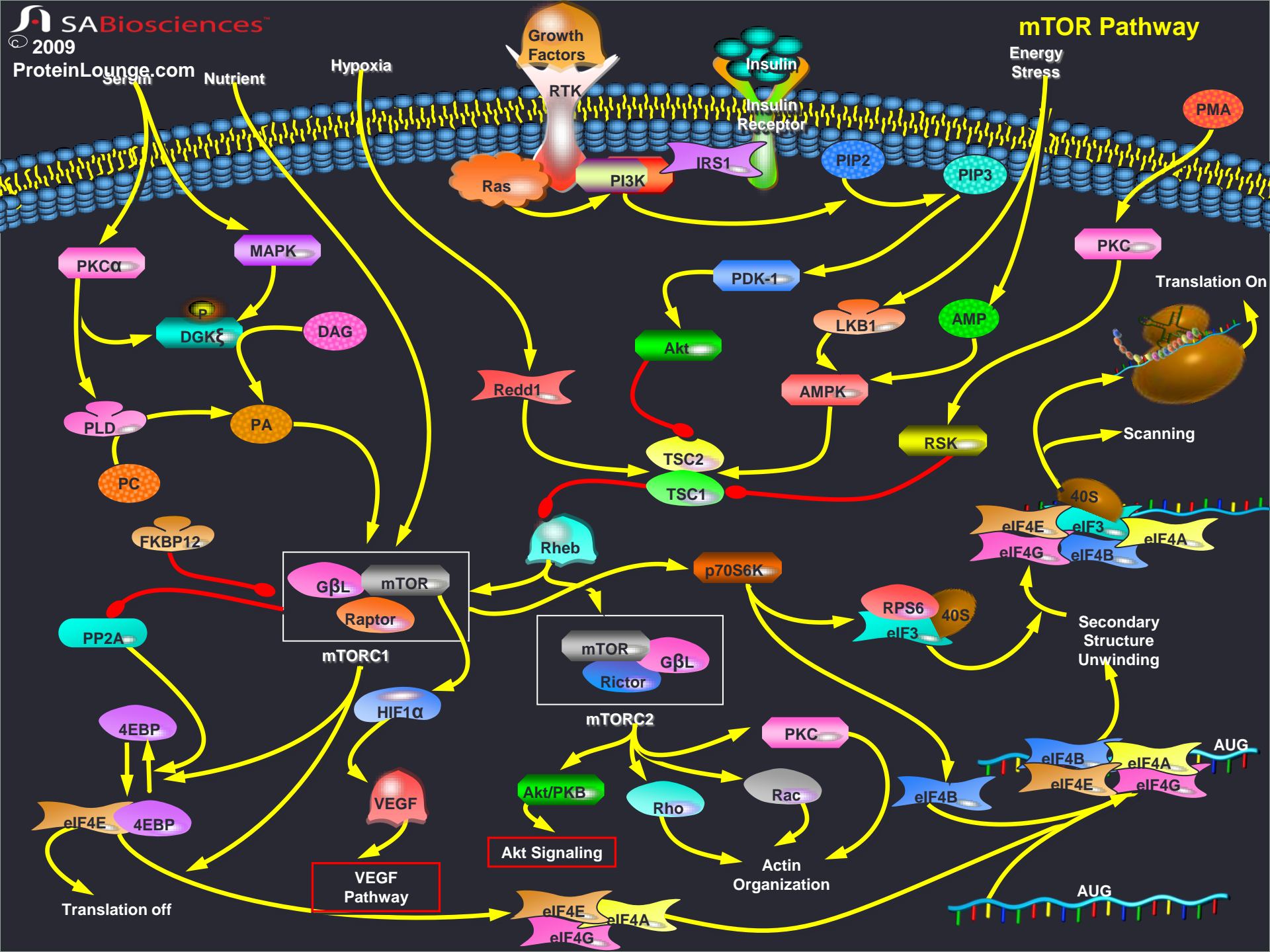
→ Apparition de résistance à l'HT par cette voie d'échappement.

↓ Prolifération  
↑ Apoptose

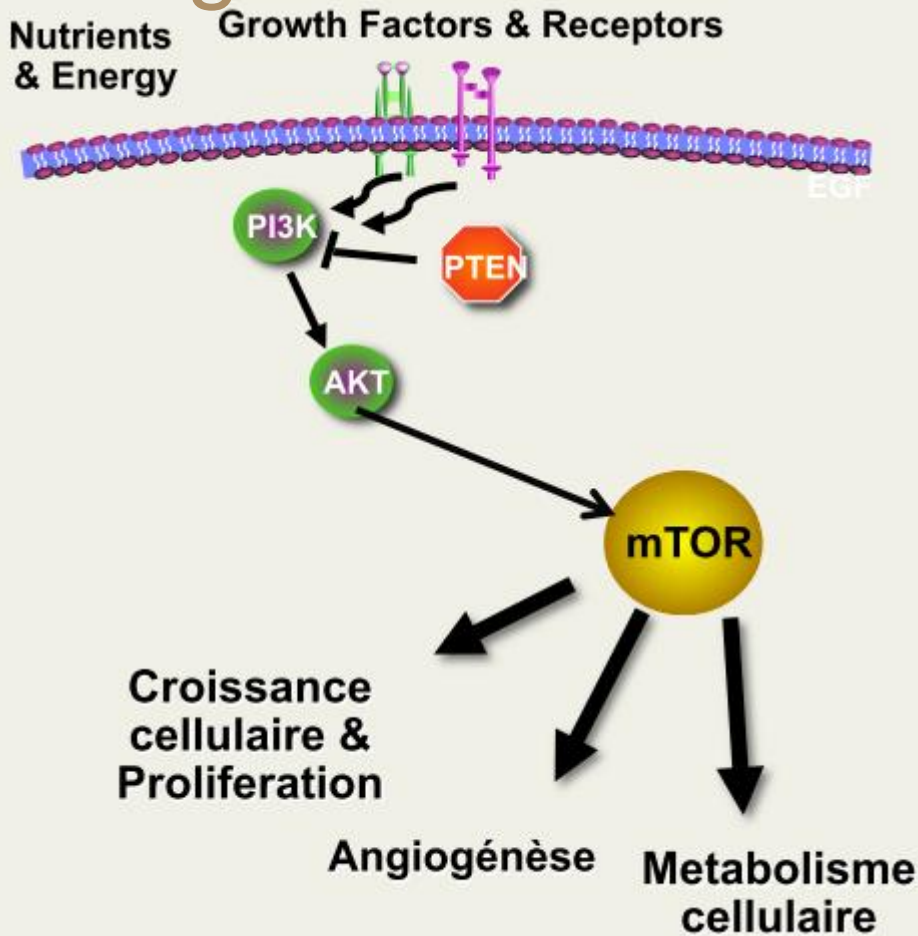








# Everolimus : inhibiteur selectif de mTOR Régule la voie PI3K/AKT



- **mTOR** est un régulateur central qui intervient dans:
  - La croissance et la prolifération cellulaire
  - Angiogénèse
  - Métabolisme cellulaire

# Essai BOLERO-2

## Schéma de l'étude

n = 724

- Patientes postménopausées ER+ HER2-
- Maladie localement avancée métastatique
- Récidive ou progression après létrozole ou anastrozole

R

2:1

Évérolimus 10 mg/j

+

Exémestane 25 mg/j (n = 485)

Placebo

+

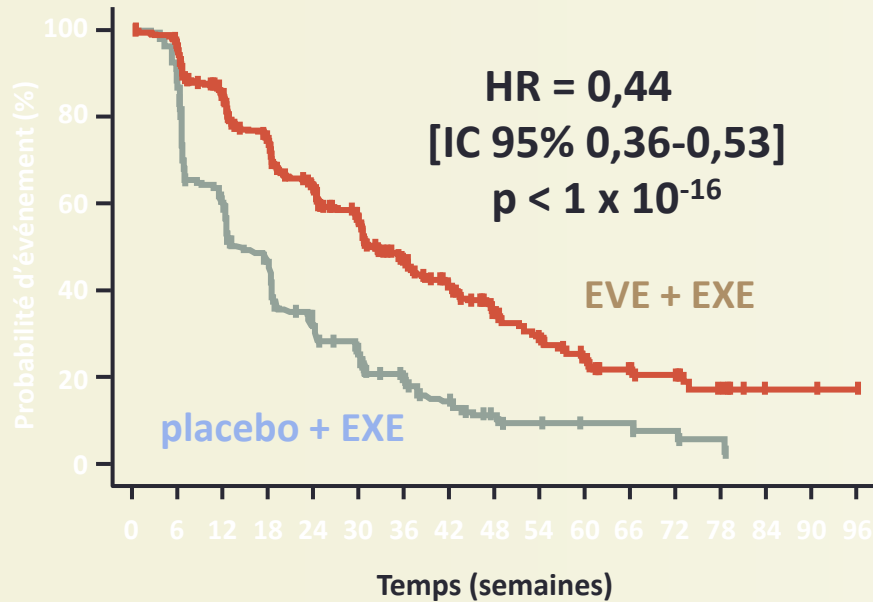
Exémestane 25 mg/j (n = 239)

- Critères de jugement
  - Primaires : SSP (évaluation locale)
  - Secondaires : SG, RO, bénéfice clinique, QdV, tolérance, marqueurs osseux, PK
- Stratification :
  1. Sensibilité à l'hormonothérapie antérieure
  2. Présence de métastase viscérale
- Pas de crossover

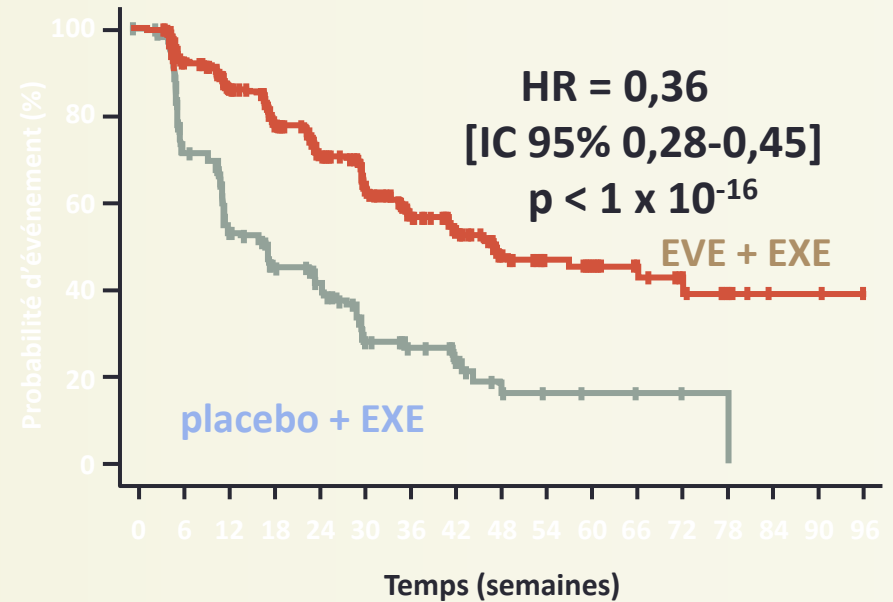


# Essai BOLERO-2

## ● Analyse locale



## ● Analyse centralisée



Médiane SSP :

- EVE + EXE : 7,4 mois
- placebo + EXE : 3,2 mois

Médiane SSP :

- EVE + EXE : 11 mois
- placebo + EXE : 4,1 mois

# Essai BOLERO-2 : conclusions

- Ajout d'évérolimus à l'exémestane a amélioré la survie sans progression chez des patientes ayant un cancer du sein avancé ER+ Her2- traitées précédemment par un inhibiteur non stéroïdien de l'aromatase
- Evaluation centralisée : médiane de survie sans progression : 11 mois vs 4,1 mois (HR =0,36  $p < 10^{-16}$ )
- Bénéfice observé dans tous les sous groupes
- Résultats de survie globale non disponibles

# Cas clinique

- Mme D., 79 ans, suivie depuis 3 ans pour un cancer du sein d'emblée métastatique au niveau osseux RE+, RP+ et HER2 neg
- Première ligne d'hormonothérapie par letrozole FEMARA® 1cp / jour depuis 3 ans et ZOMETA en perfusion pendant 2 ans au total.
- Récemment, sa maladie a progressé au niveau osseux et son oncologue lui a prescrit une nouvelle ligne de traitement comprenant :
  - Évérolimus (AFINITOR®) : 10 mg / jour en une prise
  - Exemestane (AROMASINE®) : 1 cp/ jour
  - Denosumab (XGEVA®) : 1 injection SC / 28 jours
  - CalcitD3 500 : 1 cp / jour

# Qu'est ce que le dénosumab (Xgeva)

1. Une nouvelle EPO
2. Un traitement destiné à diminuer la fatigue liée aux traitements anti-cancéreux
3. Un traitement prescrit en prévention des complications osseuses chez les patients présentant des métastases osseuses
4. Un anticorps monoclonal
5. Une chimiothérapie

Mme D. vous demande de lui rappeler les effets secondaires de l'AFINITOR car à la dernière consultation elle a été très perturbée par l'annonce de la progression de la maladie et ne se souvient plus de ce que lui a dit son oncologue

# Quels sont ils ?

1. Rash cutané
2. Diarrhée
3. Fracture par ostéoporose
4. Syndrome occlusif
5. Mucite
6. Angor
7. Troubles métaboliques: dyslipidémie, hyperglycémie
8. Pneumopathie interstitielle



# BOLERO 2 : profil de tolérance

**Événements indésirables suspectés d'être liés au traitement avec une incidence  $\geq 5\%$  dans chaque groupe:**

Événements indésirables (% patients)	exemestane + placebo (n = 238)			AFINITOR® + exemestane (n = 482)		
	Tous grades	Grade 3	Grade 4	Tous grades	Grade 3	Grade 4
<b>Stomatite</b>	10,9	0,8	0	<b>57,5</b>	7,9	0
Éruption cutanée	4,6	0	0	33,8	1,2	0
Fatigue	16,8	0	0	23,9	2,5	0,4
Diminution de l'appétit	5,9	0,4	0	19,9	0,6	0
Diarrhée	9,2	0,4	0	19,5	1,2	0,2
Dysgueusie	4,2	0	0	19,1	0,2	0
Nausée	15,1	0	0	17,6	0,2	0,2
Pneumopathie	0	0	0	14,9	3,1	0
Perte de poids	2,5	0	0	13,7	0,4	0
Thrombocytopénie	0	0	0	10,4	1,9	0,2
Epistaxis	0,4	0	0	11,2	0	0
Hyperglycémie	1,7	0,4	0	10,6	4,6	0,2
Prurit	2,9	0	0	10,0	0	0
Céphalées	5,9	0	0	9,8	0	0
Augmentation des ALAT	2,9	1,3	0	8,9	2,7	0
Anémie	1,7	0,4	0	11,4	3,1	0,4

Après 10 jours de traitement, apparition d'une stomatite buccale, douloureuse, gênant l'alimentation orale (aphtes linguales)



# Prévention des mucites

- Bonne hygiène buccale
  - éviter les agents contenant de l'alcool, de l'eau oxygénée de l'iode. Eviter le tabac
  - utiliser un dentifrice doux, brossage 3x/jour
  - Bains de bouche bicarbonate
- Habitudes alimentaire
  - Boire 2litres/jour
  - éviter les aliments durs ou croustillants
  - éviter les épices
- Diagnostic précoce
  - Eduquer le patient sur les signes et symptômes

Mme D. vous appelle pour vous signaler qu'elle tousse depuis 15j. Son médecin lui a déjà prescrit 1 semaine d'AUGMENTIN mais sans efficacité. Par contre, elle est rassurée car elle n'a pas eu de fièvre.

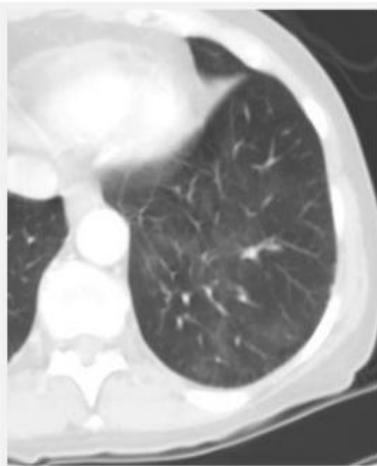
A quoi pensez-vous ?

- Pneumopathie médicamenteuse sous AFINITOR
- Toujours y penser mais...
- Diagnostic d'élimination (infection / lymphagite tumorale / cardiaque...) avec imagerie obligatoire et fibroscopie bronchique avec LBA, arrêt de l'AFINITOR pour exploration de la pneumopathie

# Pneumopathie non infectieuse

- Affection non infectieuse non maligne des poumons
- Début généralement dans les 2 à 6 mois, asymptomatique ou hypoxie, toux, pleurésie
- Hypersensibilité retardée médiée par les lymphocytes T.

**Consolidation aérienne**



**Opacités en verre dépoli**





Vous surveillez régulièrement le bilan glucido lipidique de Madame D. Celle-ci développe une hypertriglycémie à 5,2g/dl sous Everolimus. Quelle est votre prise en charge?

# HyperTG sous Everolimus

- Grade 3
- Interrompre le traitement
- Reprendre à mi dose (5mg/jour)

Grade	Taux
1	1,5 - 3 g/l
2	3 - 5 g/l
3	5 - 10 g/l
4	>10 g/l

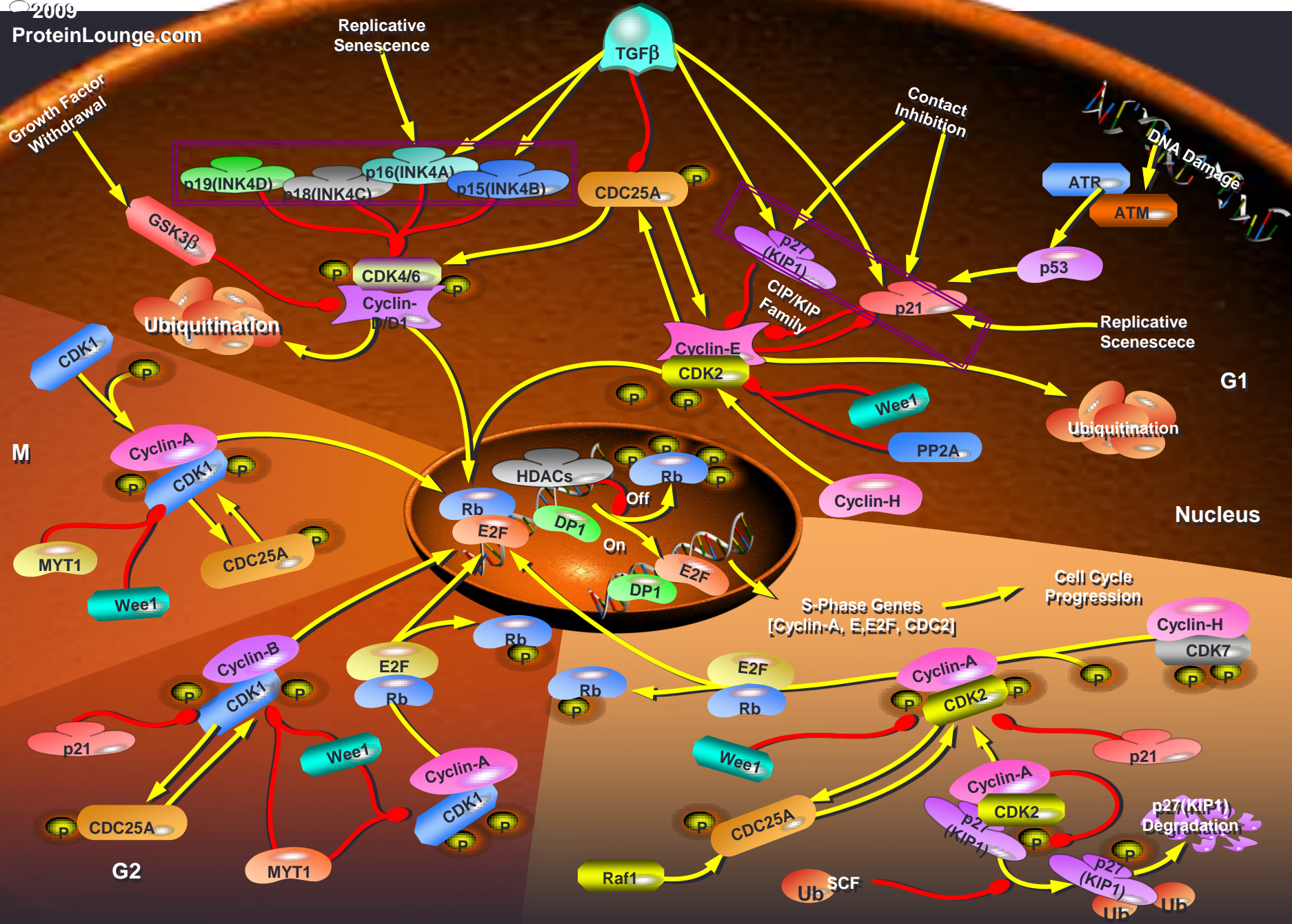
- Médicaments compatibles :
  - Statines : fluvastatine (Lescol, Fractal), Pravastatine (Elisor, Vasten), Rosuvastatine (Crestor)
  - Fibrates : Fénofibrate (Lipanthyl), Bézafibrate (Béfisal), Ciprofibrate (Lipanor), Gemfibrozil (Lipur)

# HyperTG sous Everolimus

- Grade 2 : pas d'adaptation posologique
- Grade 3 : interrompre le traitement. Réintroduire à 5 mg/j
- Grade 4 : arrêt du traitement

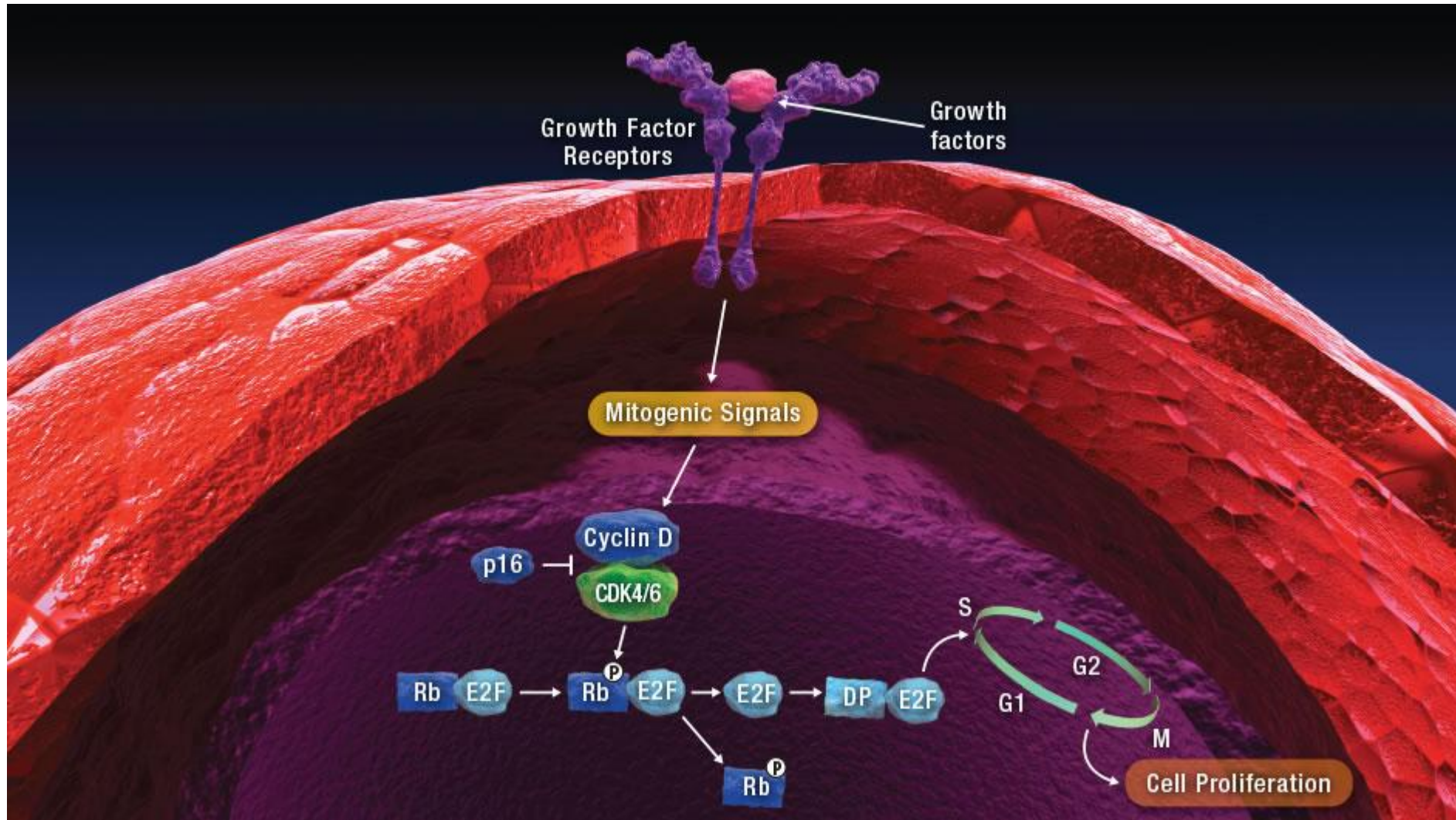
## 2) Résistance à l'hormonothérapie Cycline D1-CDK4/6

- La croissance du cancer du sein RH+ dépend de la cycline D1, une cible transcriptionnelle directe du récepteur aux oestrogènes (RE).
- Les modèles de lignées cellulaires résistantes à l'hormonothérapie sont dépendants de la cycline D1 et des CDK 4/6.
- Les CDK 4/6 sont impliquées dans la résistance à l'hormonothérapie des cancers du sein.
- La cycline D1 active CDK 4/6 entraînant :
  - Une phase de transition **G1/S** et
  - l'entrée dans le cycle cellulaire
- L'inhibition des CDK 4/6 par le Palbociclib permet de restaurer la sensibilité à l'hormonothérapie





# > Inhibiteurs de Cdk4/6



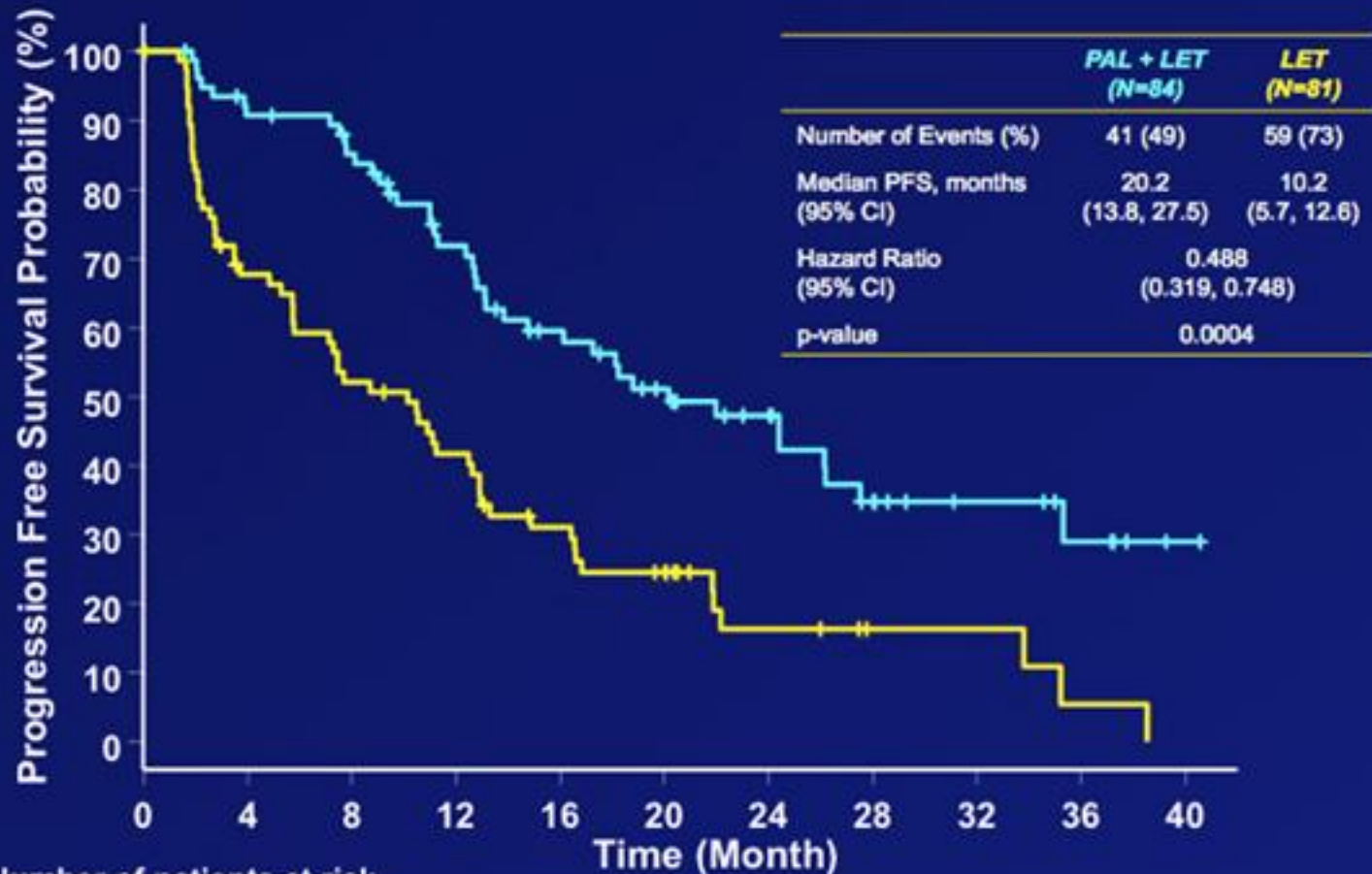
# Palbociclib : Etude Paloma1- phase II

- Etude de phase II randomisée évaluant :  
Palbociclib + Letrozole versus Letrozole seul dans le cancer du sein métastatique RH+, Her2 négatif.  
.N=165  
.TRT adj ou néoadj:43% CT,33% HT,49% sans trt  
  
.Taux de reponse: 54% vs 39%
- Médiane PFS en mois : **20,2** vs 10,2 mois
- Ce bénéfice en survie sans progression est tel que le Palbociclib avait reçu une AMM conditionnelle aux USA en attendant les résultats de la survie globale d'un essai de phase 3.



# Palbociclib Paloma 1 (phase II)

## Progression-Free Survival (ITT)



Number of patients at risk

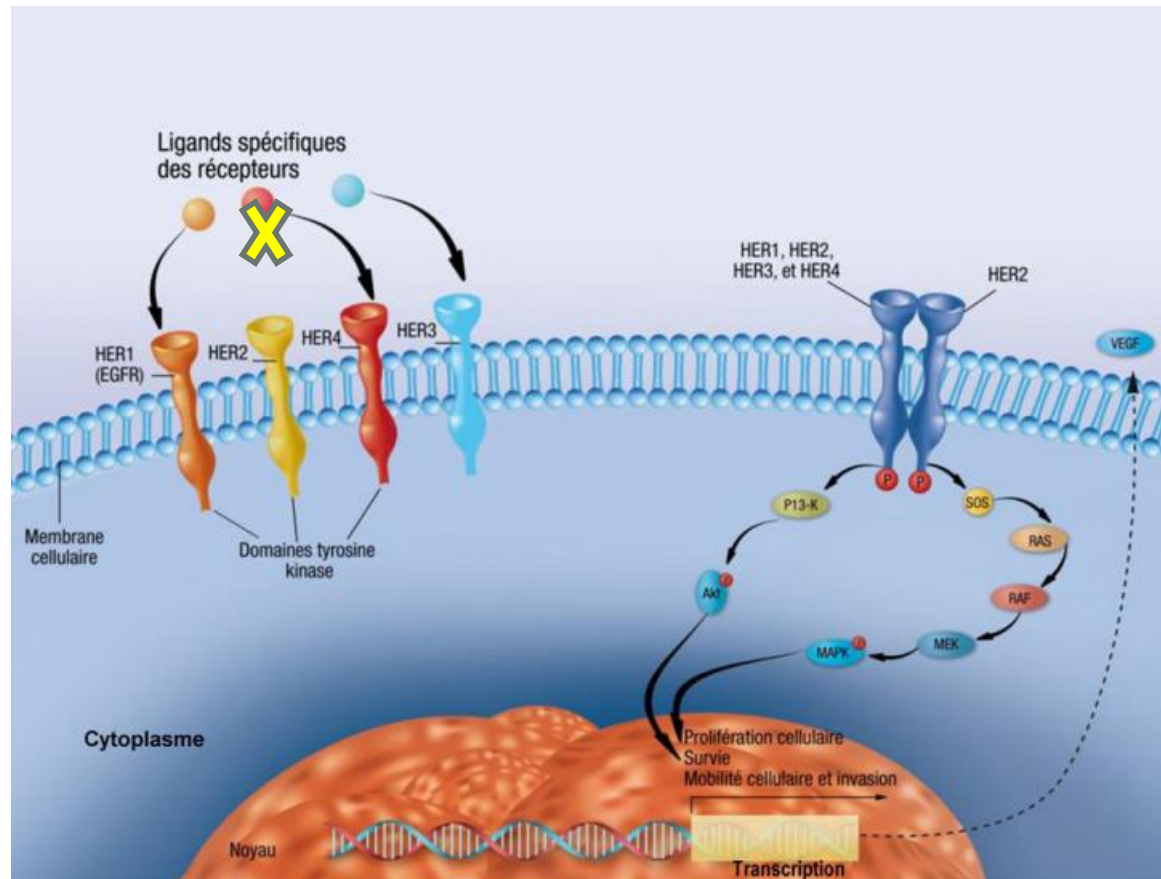
	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
<b>PAL+LET</b>	84	67	60	47	36	28	21	13	8	5	1
<b>LET</b>	81	48	36	28	19	14	6	3	3	1	

# Palbociclib (Paloma 3 : phase III)

- Palbociclib + Fulvestrant vs Fulvestrant : n = 521
- Cancer du sein métastatique RH+ Her2 neg
- Femmes pré ou post ménopausées
- Progression sous hormonothérapie :
  - Au cours du traitement adjuvant ou au cours des 12 mois suivant son arrêt
  - Sous traitement pour cancer du sein avancé
- < 1CT
- SSP : **9,2** mois vs 3,8 mois HR:0,42
- Bonne tolérance
- Neutropénie grade 3 – 4 : 62%
- Neutropénie fébrile 0,6%
- Le Palbociclib est la molécule la plus avancée sur le plan clinique ouvrant la voie aux produits ciblant le cycle cellulaire et les CDK.

# Thérapies ciblées anti EGFR

# La voie Her



D'après Hudis et al

# Stimulation des voies de transduction du signal liées à l'EGF-R

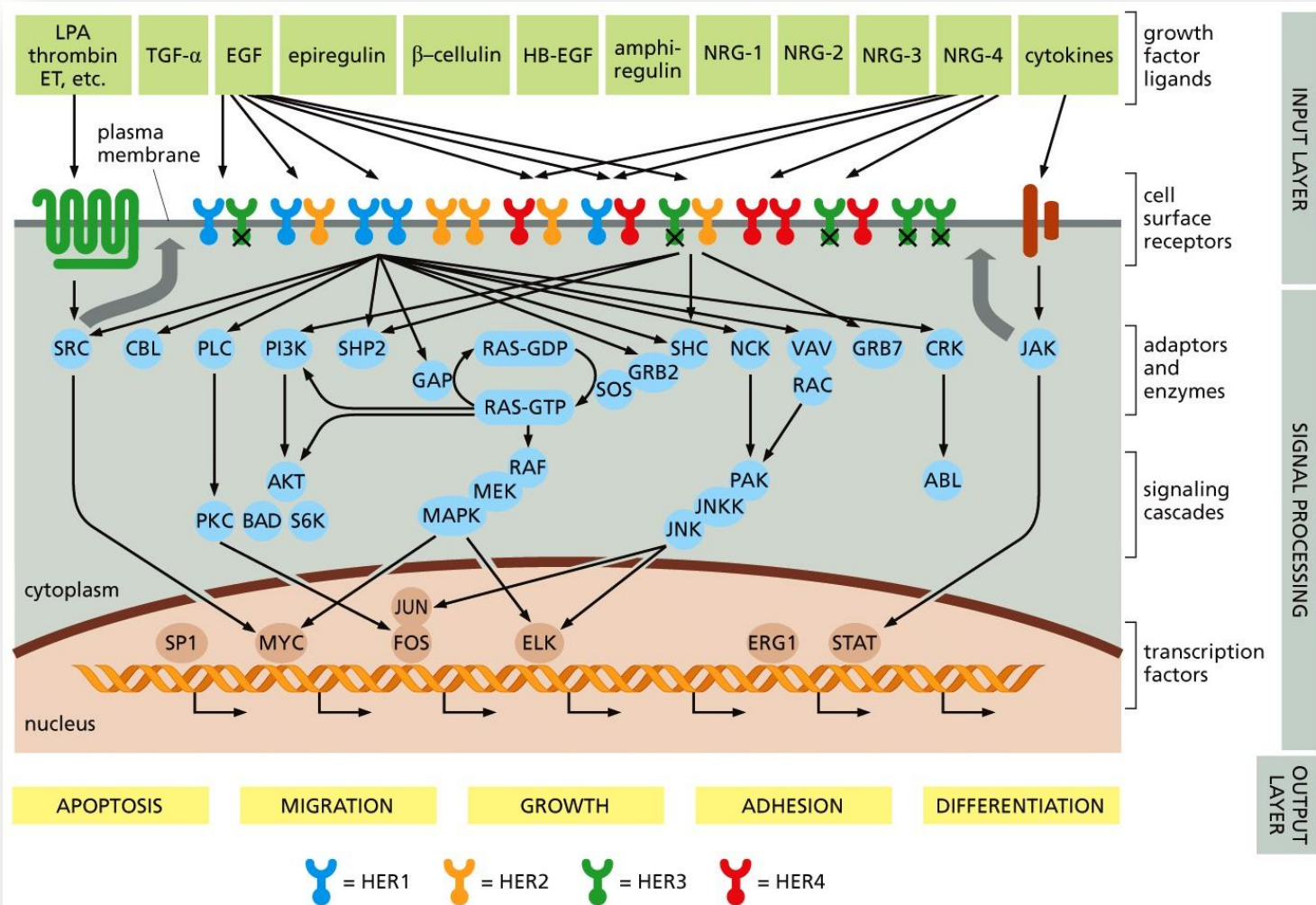
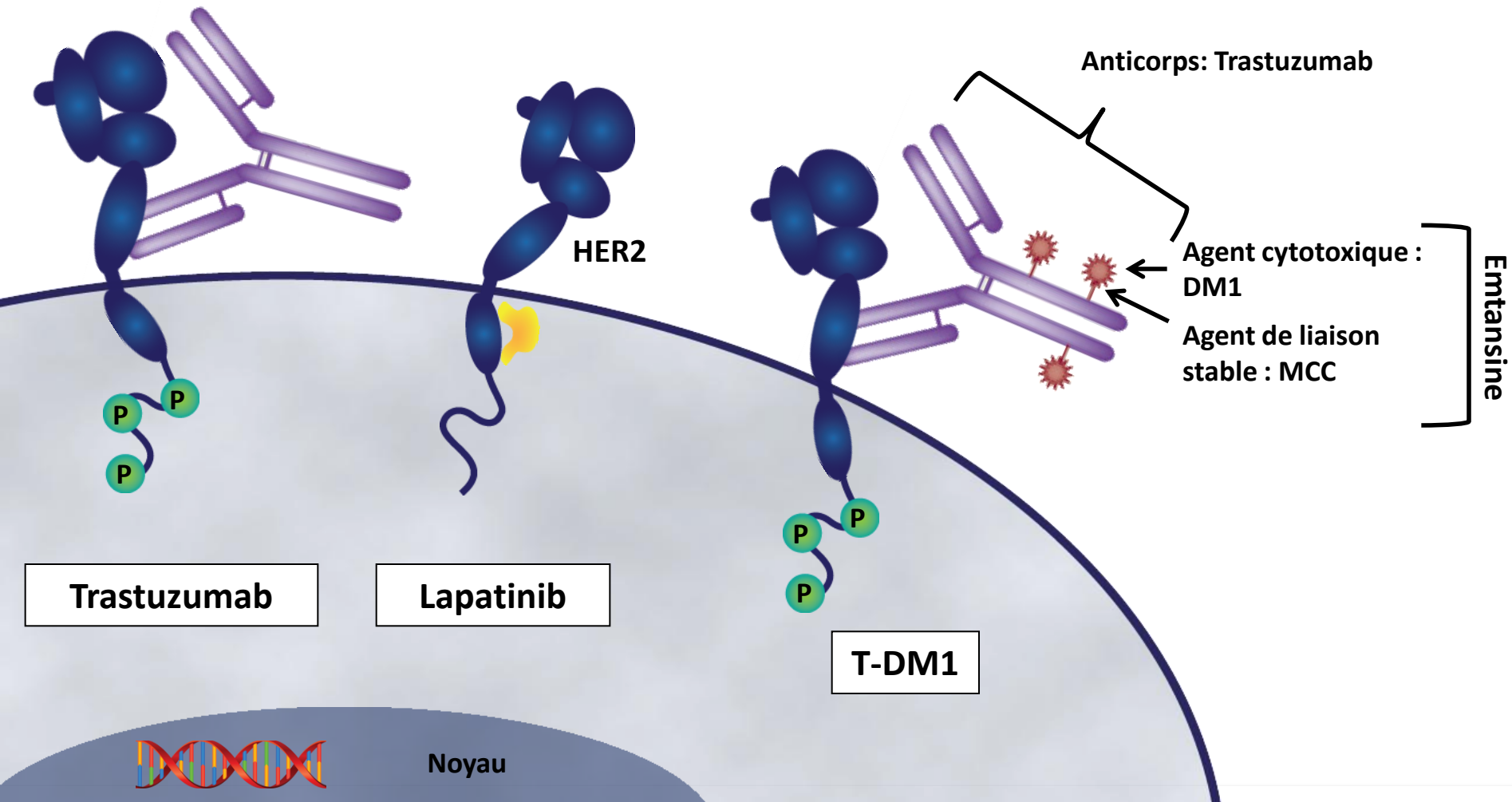


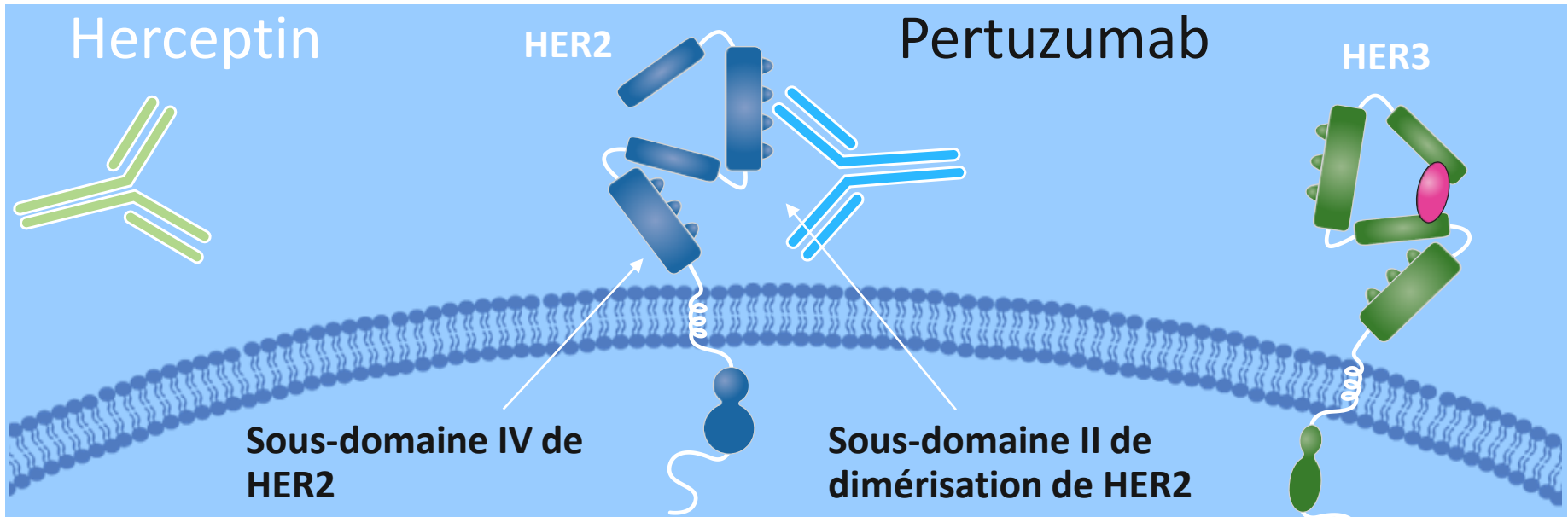
Figure 5.1 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

# Thérapies ciblées dans le cancer du sein HER2+ : Trastuzumab, Lapatinib et T-DM1





# Herceptin et pertuzumab se lient à des domaines différents de HER2



- Herceptin n'inhibe pas l'hétérodimérisation avec HER3
- Herceptin empêche la multiplication du récepteur HER2 à la surface de la cellule.
- Herceptin bloque la voie de signalisation HER2.
- Herceptin présente les cellules à la destruction par le système immunitaire (ADCC).

- Pertuzumab inhibe la formation de dimères avec HER3.
- Pertuzumab présente les cellules à la destruction par le système immunitaire (ADCC).
- Pertuzumab n'empêche pas la multiplication du récepteur HER2 à la surface de la cellule.



# Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>)

- Principaux effets secondaires:
  - Très bonne tolérance
    - aucune pré-médication systématique, aucun traitement « correcteur »
    - Pas de nausées, ni vomissements
    - Pas de toxicité hématologique, pas de surveillance bio
  - Réaction allergique lors des perfusions (type choc anaphylactique) : exceptionnel
  - Toxicité cardiaque cumulative : surveillance FEVG
  - Majoration de la toxicité cardiaque des anthracyclines qui ne doivent jamais être associées au trastuzumab

# Lapatinib (Tyverb<sup>®</sup>)

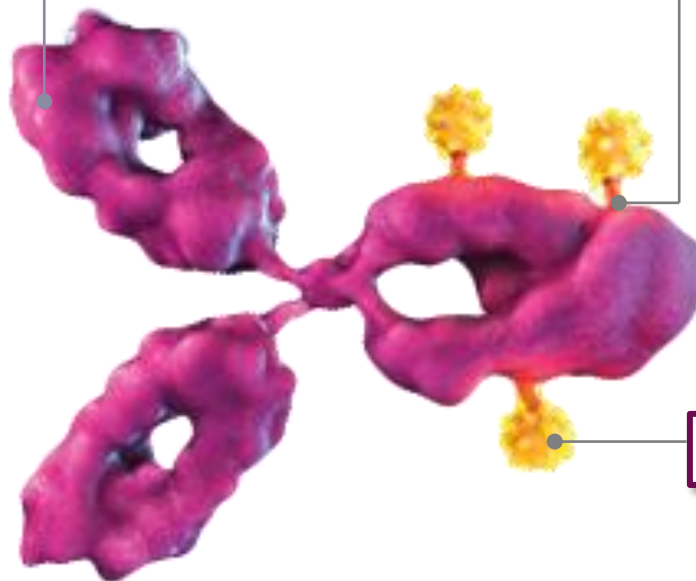
- 1250 à 1500 mg/j en continu per os
- Effets indésirables :
  - Diarrhées
  - Éruptions cutanées,
  - Nausées vomissements
  - Céphalées
  - Toxicité cardiaque (FEVG cf herceptin)
- Taux de réponse en monothérapie: 5 à 10%
- En association avec la chimiothérapie (Xeloda) 20 à 60%

# Un traitement innovant qui conjugue 3 composants

Un anticorps conjugué est **une combinaison unique** de 3 composants (1-4)

**1. ANTICORPS MONOCLONAL**

**2. AGENT DE LIAISON**



**3. AGENT CYTOTOXIQUE**

Les anticorps conjugués sont conçus pour **éliminer sélectivement les cellules cancéreuses** et **épargner les tissus sains** (1-4)

# Un traitement innovant qui conjugue 3 composants

## 1. ANTICORPS MONOCLONAL

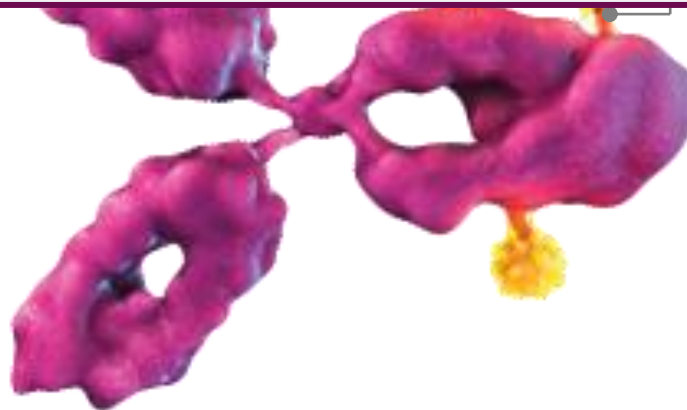
### TRASTUZUMAB

L'anticorps monoclonal anti HER2

## 2. AGENT DE LIAISON

**MCC\***

- Confère une liaison covalente stable thioéther entre le trastuzumab et le DM1\*\*
- Permet de lier en moyenne **3,5 unités de DM1** à chaque molécule de trastuzumab
- Augmente la **libération ciblée du DM1 directement à l'intérieur** de la cellule tumorale et limite sa libération systémique



\* MCC : 4[N maleimidomethyl] cyclohexane 1 carboxylate

\*\* DM1 : Dérivé de la maytansine

# Un traitement innovant qui conjugue 3 composants

## 1. ANTICORPS MONOCLONAL

### TRASTUZUMAB

L'anticorps monoclonal anti HER2

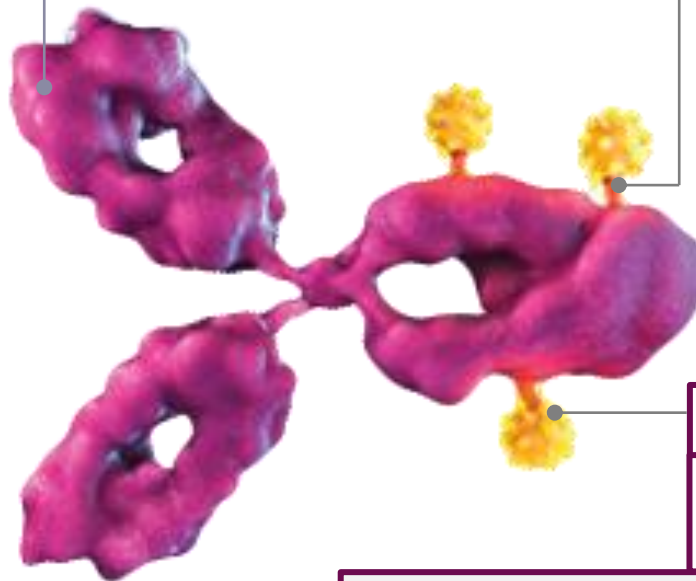
## 2. AGENT DE LIAISON

MCC\*

## 3. AGENT CYTOTOXIQUE

DM1\*\*

L'agent cytotoxique puissant



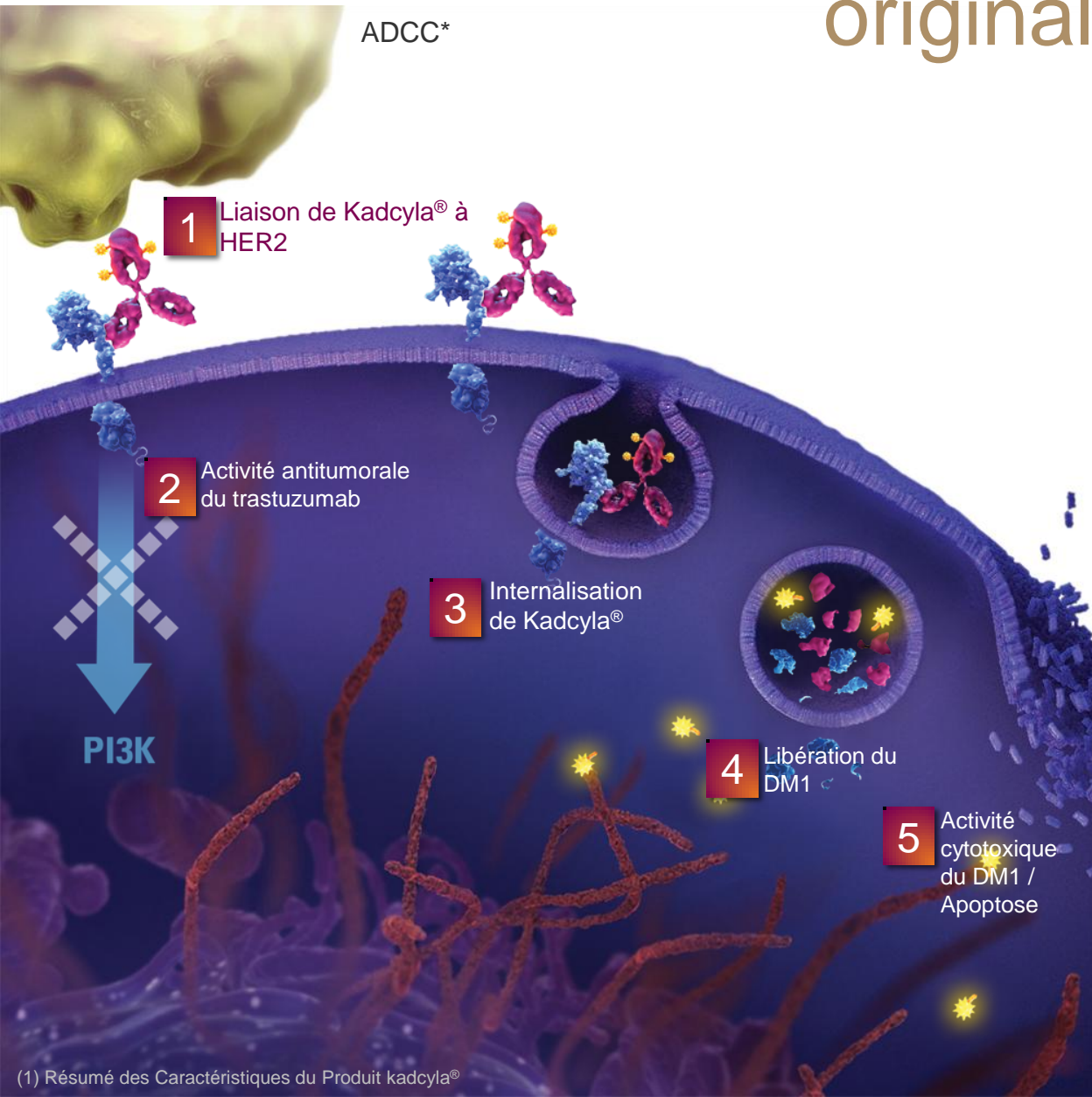
- Se fixe à la **tubuline** du cytosquelette et **inhibe la polymérisation** des microtubules
- **20 à 200 x plus puissant** que les taxanes et les vinca-alcaloïdes
- **Entraîne l'arrêt du cycle cellulaire** en phase G2/M, conduisant à l'**apoptose**

\* MCC : 4[N maleimidomethyl] cyclohexane 1 carboxylate

\*\* DM1 : Dérivé de la maytansine

# Un mécanisme d'action original

ADCC\*



**1** Liaison de Kadcyla<sup>®</sup> à HER2

**2** Activité antitumorale du trastuzumab

PI3K

**3** Internâlisation de Kadcyla<sup>®</sup>

**4** Libération du DM1

**5** Activité cytotoxique du DM1 / Apoptose

- Kadcyla<sup>®</sup> conjugue le mécanisme d'action du trastuzumab et celui du DM1

\* Cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante (Antibody-dependant, cell-mediated cytotoxicity)

# Kadcyla : effets secondaires

## **Cliniques:**

Fatigue

Nausées

Douleurs osseuses et  
musculaires

Saignements

Maux de tête

Constipation

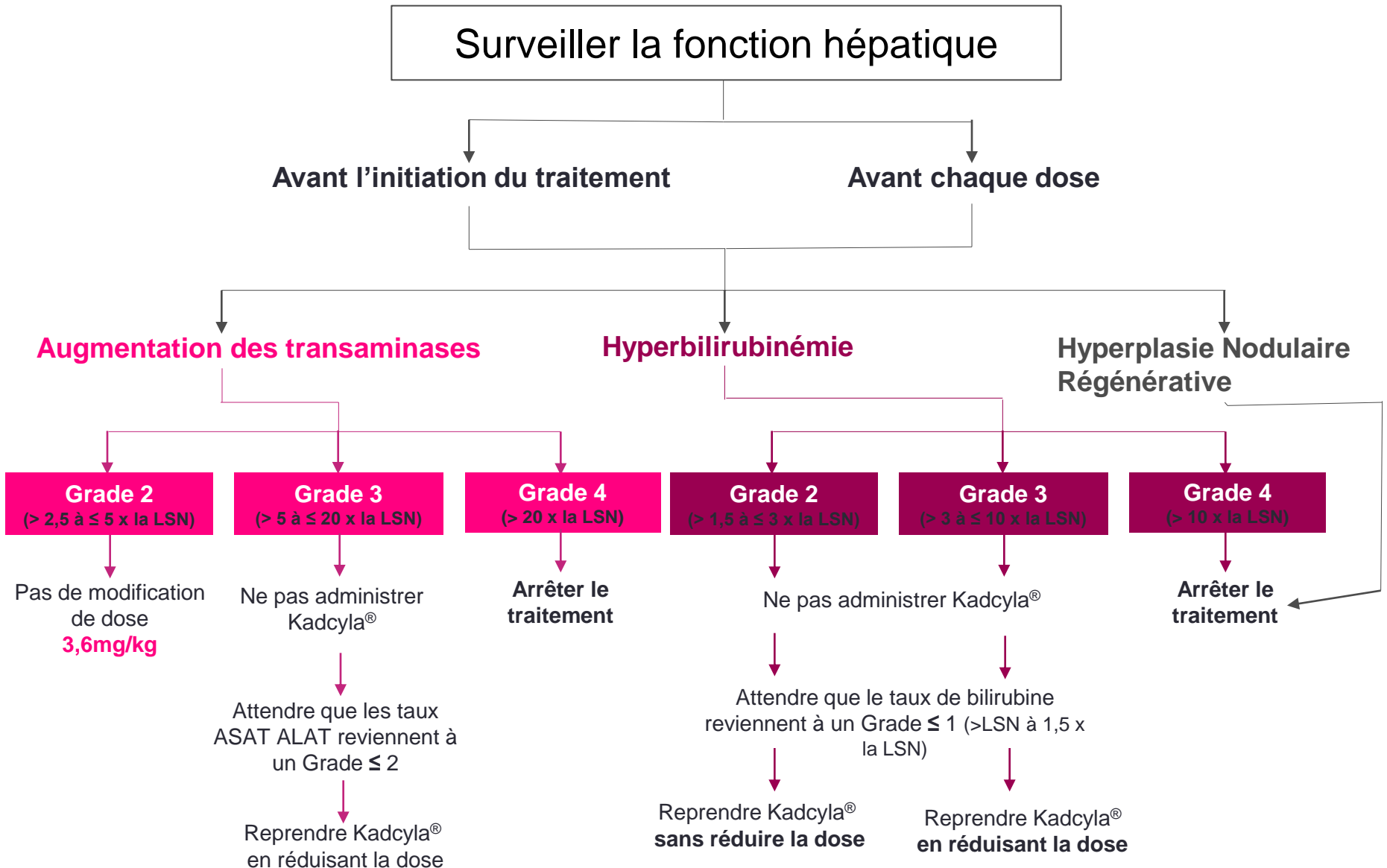
## **Biologiques:**

Thrombopénie

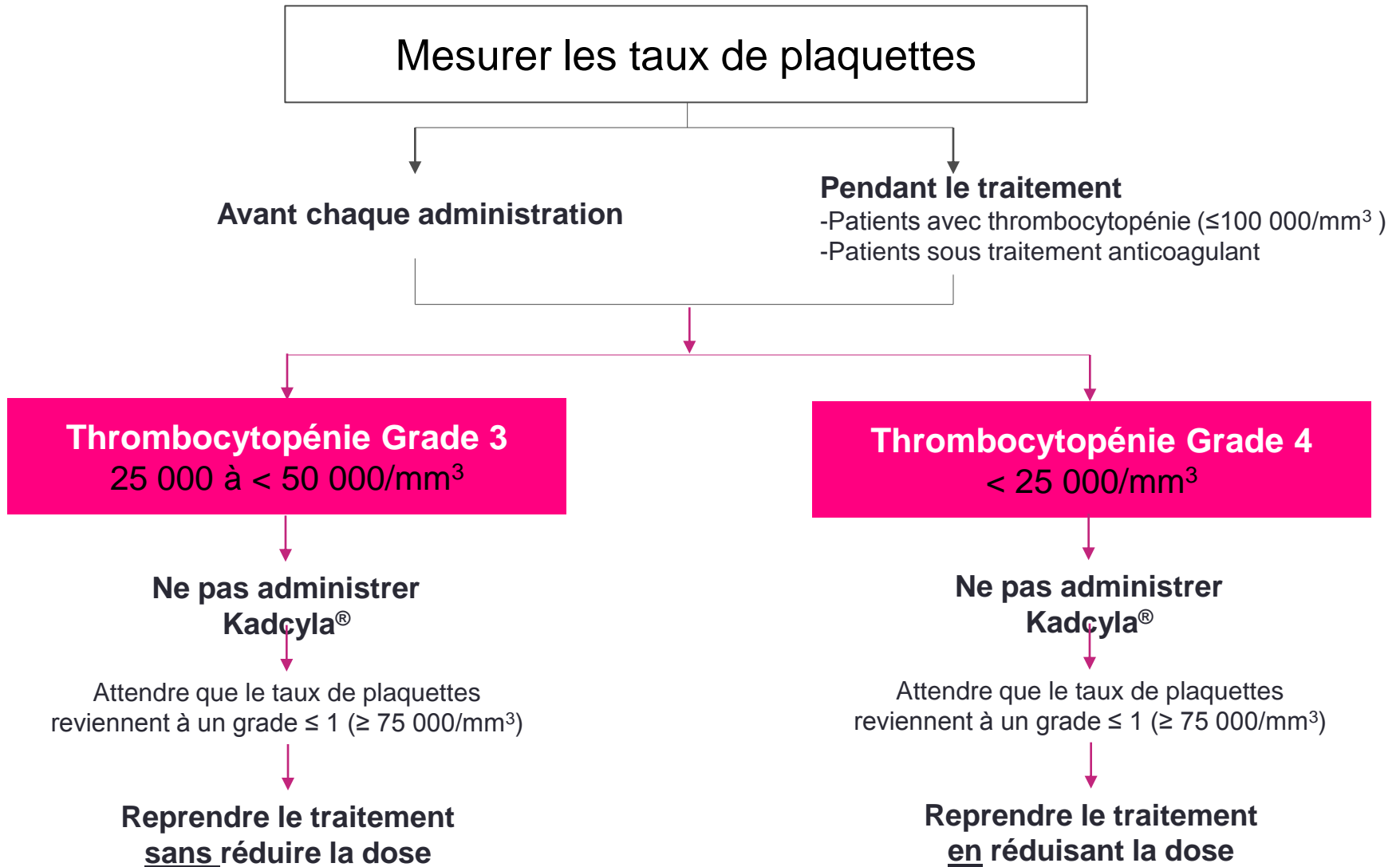
Perturbation du bilan hépatique



# Tolérance hépatique

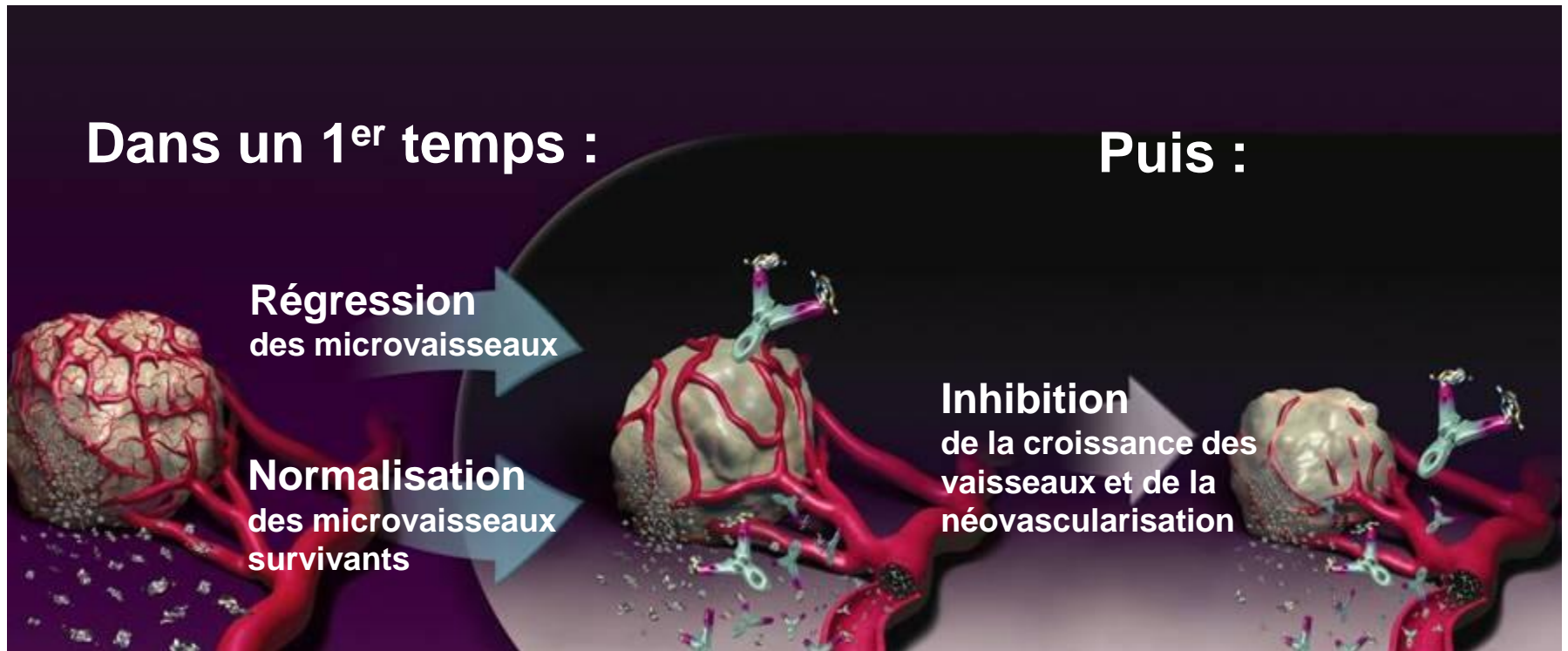


# Thrombocytopénie



# **Cibler la voie de l'angiogénèse : les anti VEGF**

# Cibler la voie VEGF



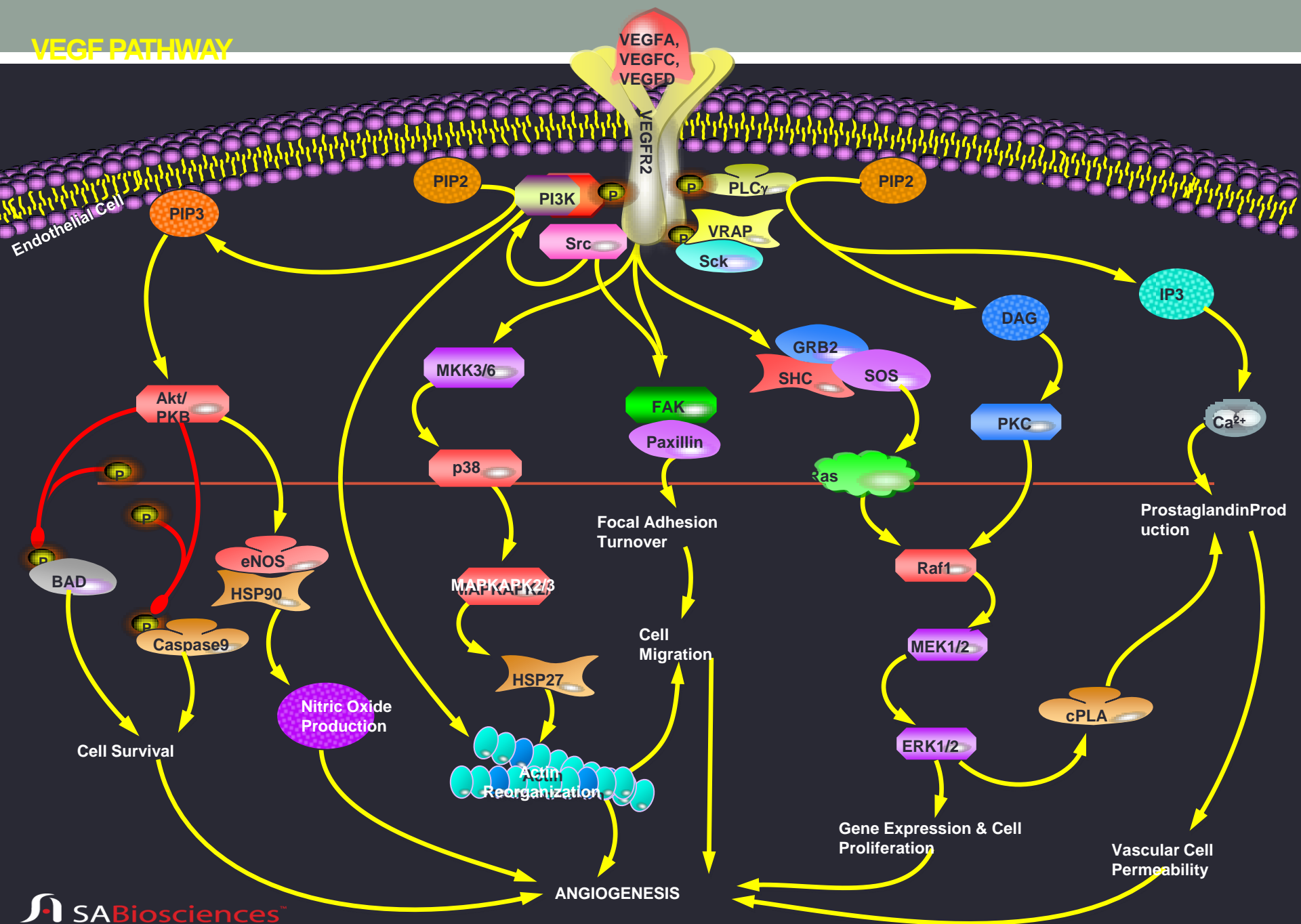
- 3 actions suite à l'inhibition de la voie VEGF :
  - régression des microvaisseaux
  - normalisation des vaisseaux les plus matures
  - inhibition de la production de nouveaux vaisseaux

# Avastin

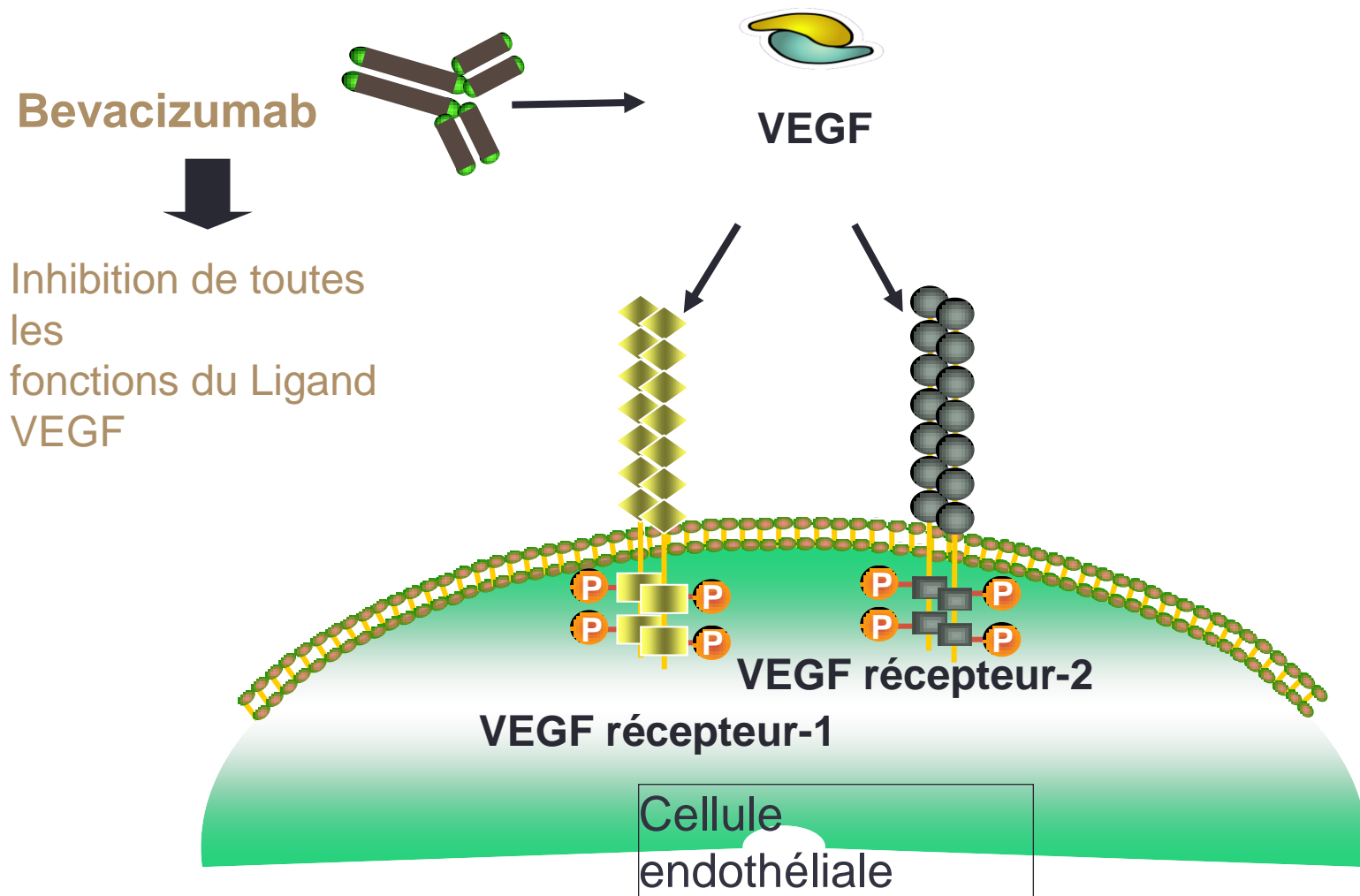
- Anticorps monoclonal recombinant anti-VEGF développé à partir de l'anti-VEGF murin mAb A4.6.1
- Reconnaît tous les isoformes du VEGF



# VEGF PATHWAY

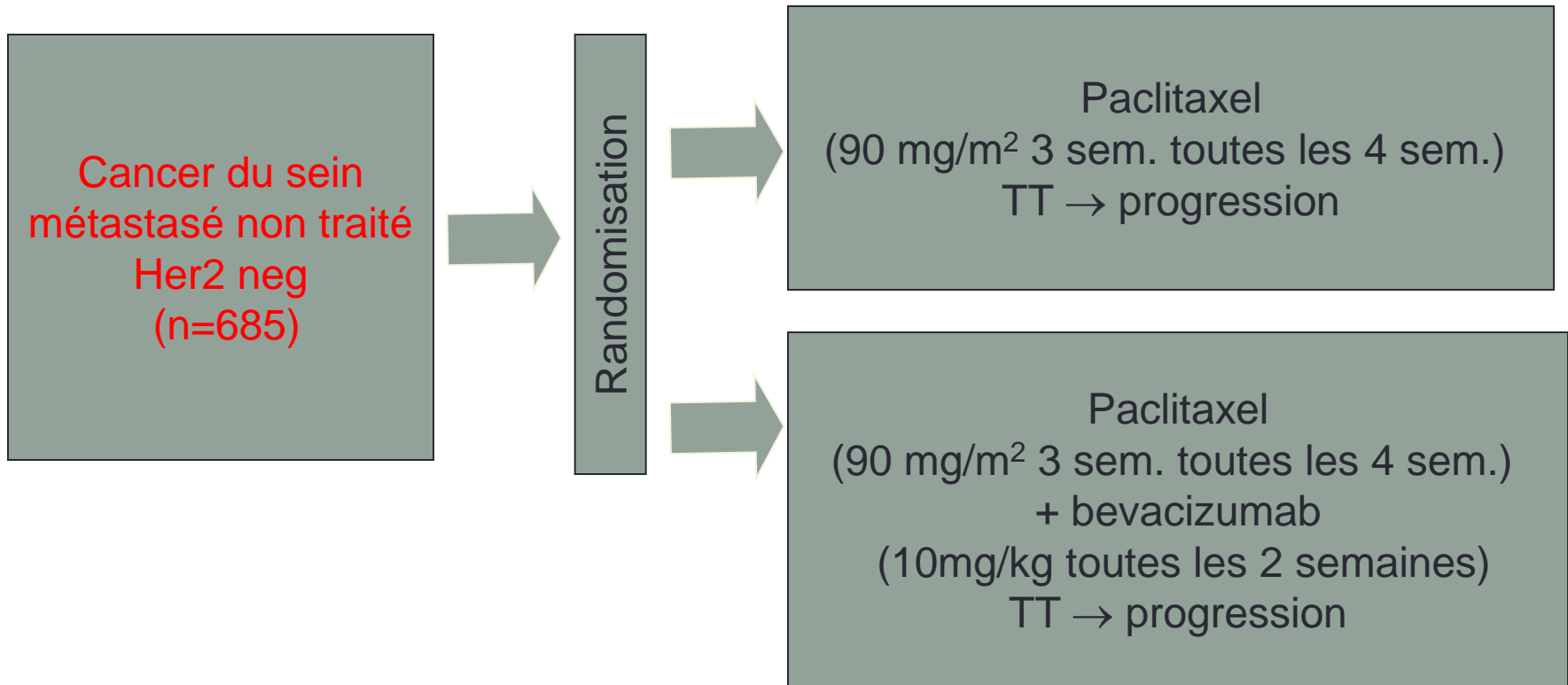


# Avastin : Spécificités de la voie du VEGF





# E210 : TAXOL sans ou avec AVASTIN phase III en 1ère ligne



## E210 : TAXOL sans ou avec AVASTIN phase III en 1ère ligne

	Taxol (n = 350)	taxol + avastin (n = 365)
Cancers HER2 négatif		
Réponses objectives (%)	<b>21</b>	<b>37</b>
Survie sans progression (mois)	<b>5,9</b>	<b>11,8</b>
Survie globale (mois) : NS	<b>25,2</b>	<b>26,7</b>

# Cas clinique

Mme F, 58 ans, cancer du sein

Métastases osseuses et hépatiques métachrones, RH-  
/Her2-

Pas d'antécédents cardiovasculaires

Décision Taxol Avastin 1ere ligne métastatique

- Combien de temps après le pose de PAC faut il attendre avant l'instauration d' Avastin?
- Quel examen est nécessaire avant la première injection d' Avastin?

- 2 semaines après pose de PAC
- Protéinurie des 24 heures
  
- 4 à 6 semaines après toute intervention ( et avant)
- Information des patients sur le risque hémorragique  
prévention des épistaxis, gingivorragies stomatite
  
- La première cure se passe bien, que faut il  
surveiller avant chaque nouvelle cure d'Avastin?

- La BU et la TA
- A la BU : 2+ de protéines

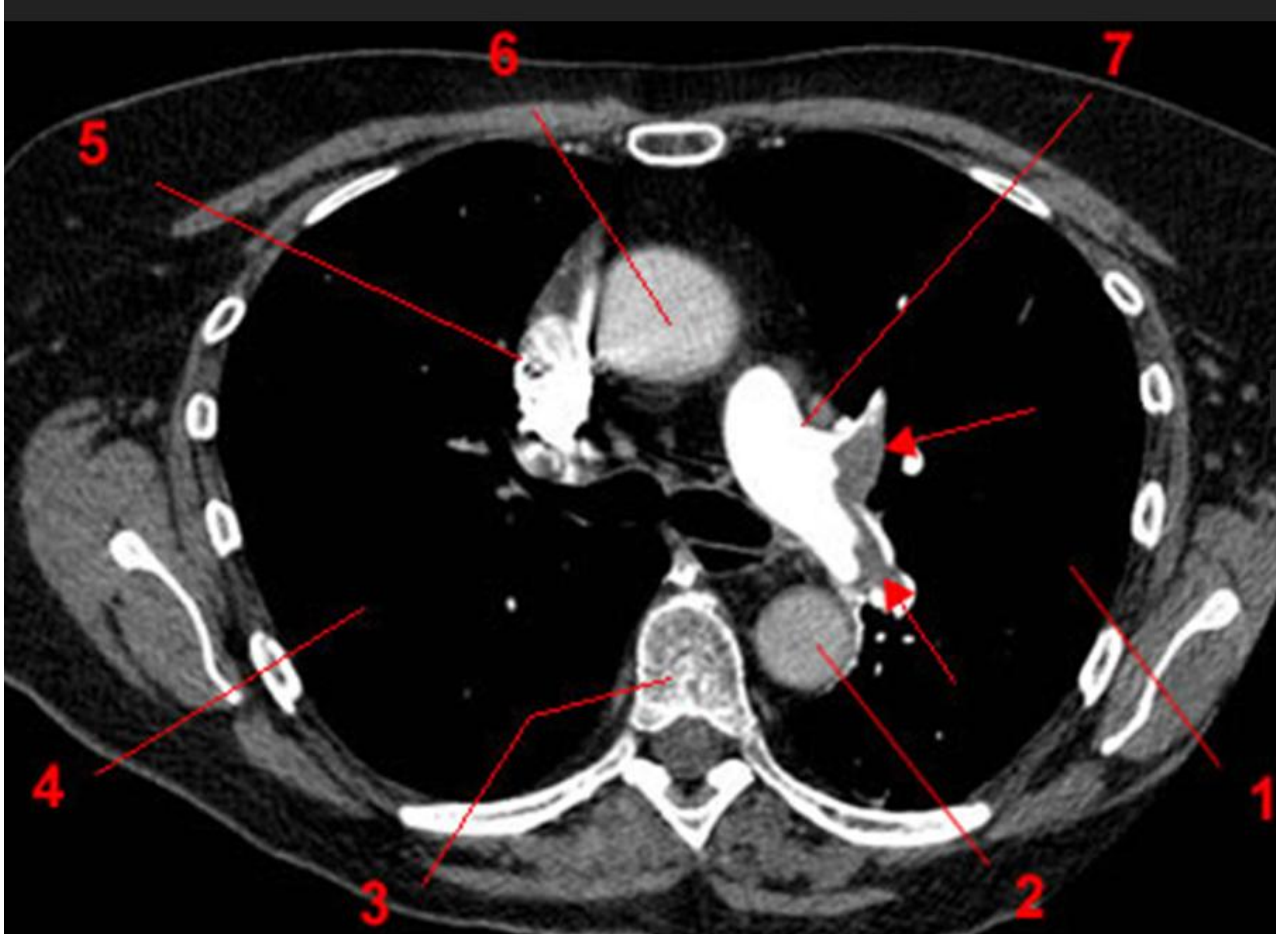
Quelle est votre conduite à tenir?

- OK pour l' Avastin ce jour là
- Protéinurie des 24h pour la prochaine cure
- Si  $<1\text{g}/24\text{h} >$  poursuivre

- Après la quatrième injection d'Avastin, la patiente présente une dyspnée et une tachycardie.
- Quel diagnostic évoquez vous en priorité?
- Si celui-ci est confirmé, quand pourrez vous reprendre l'Avastin?



# Embolie pulmonaire

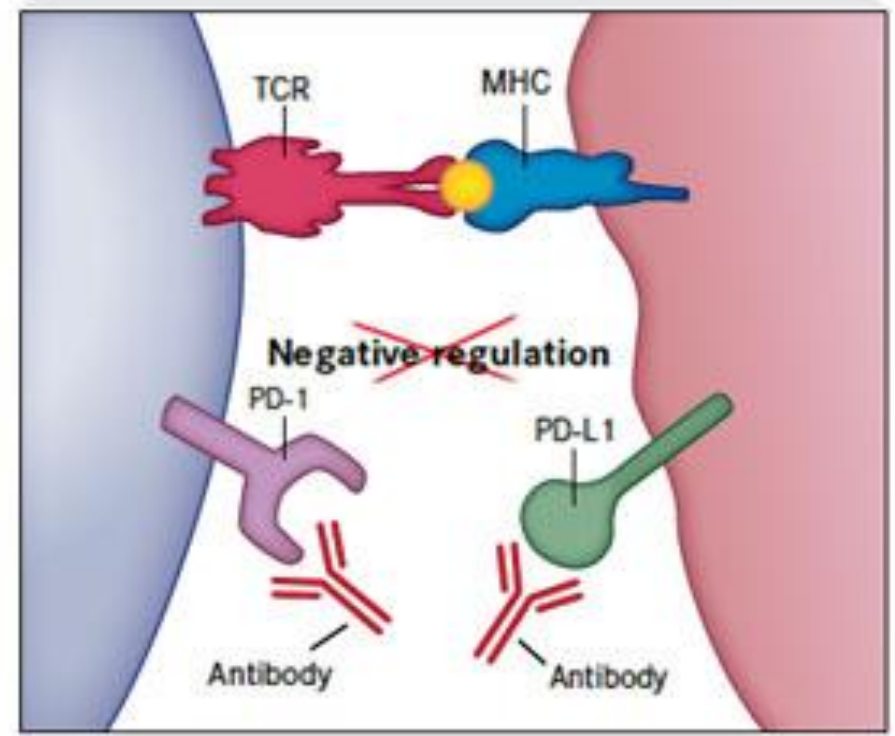
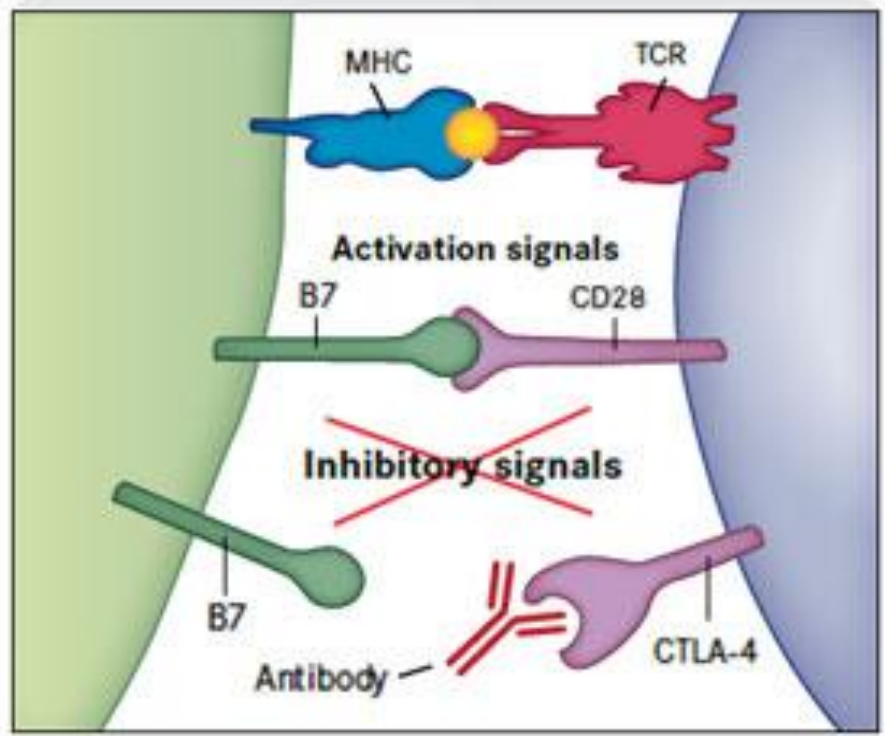
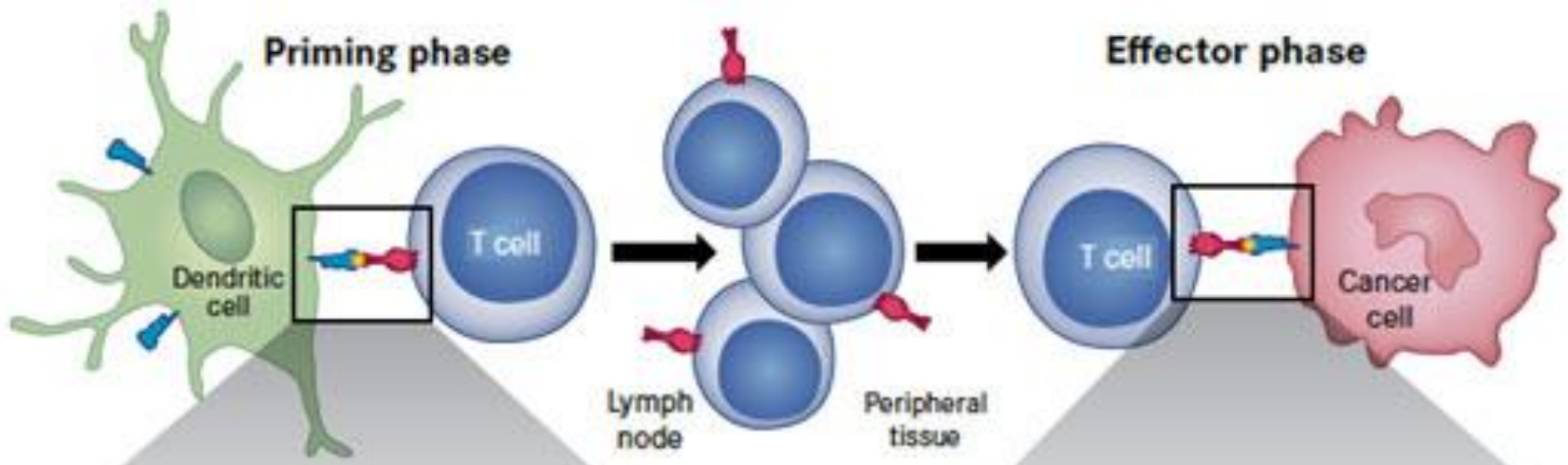


Arrêt définitif de l'Avastin!

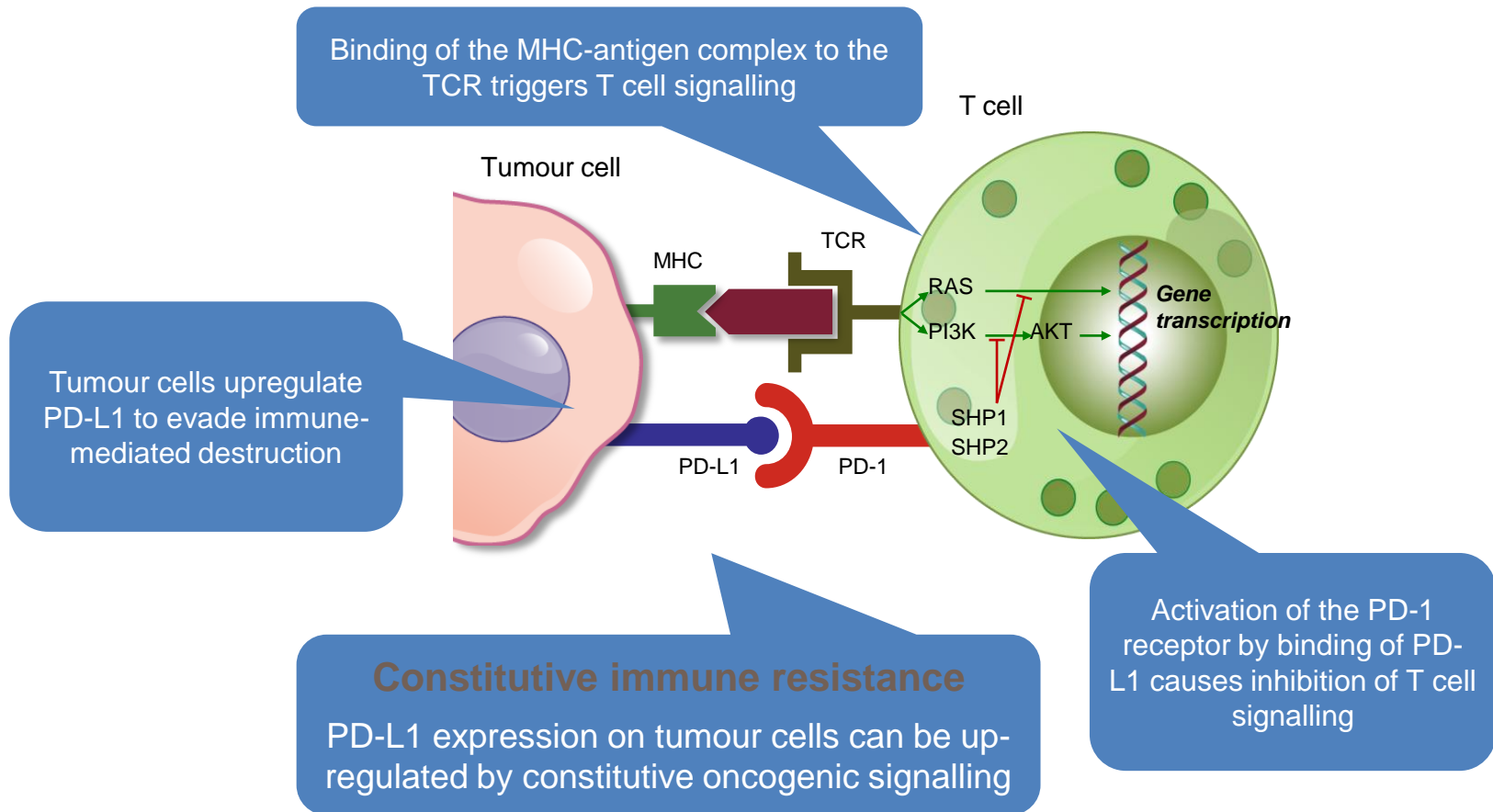
# THÉRAPIES A VENIR

---

# Immunothérapie

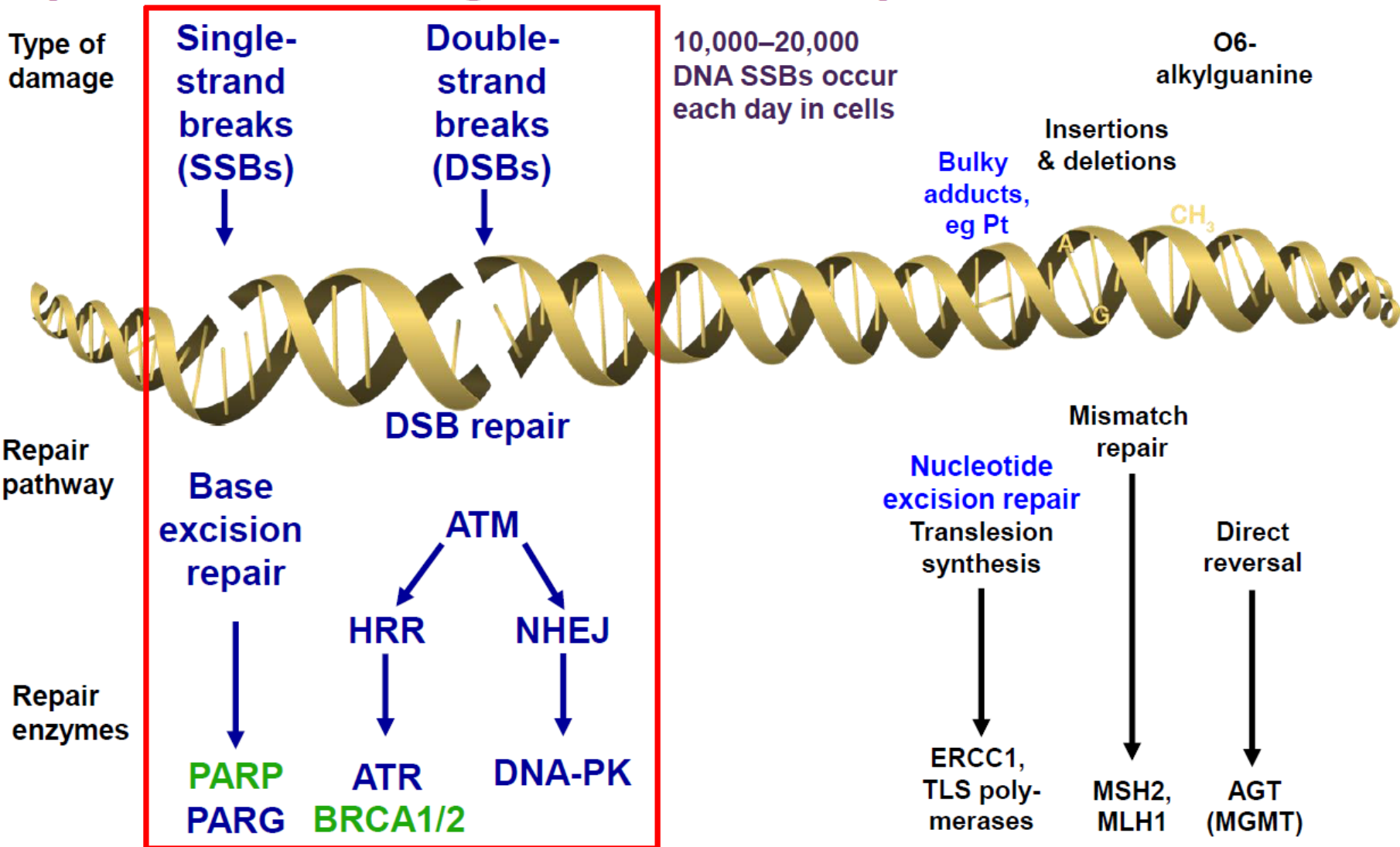


# Les cellules tumorales utilisent la voie PD1/PDL1 pour échapper au système immunitaire



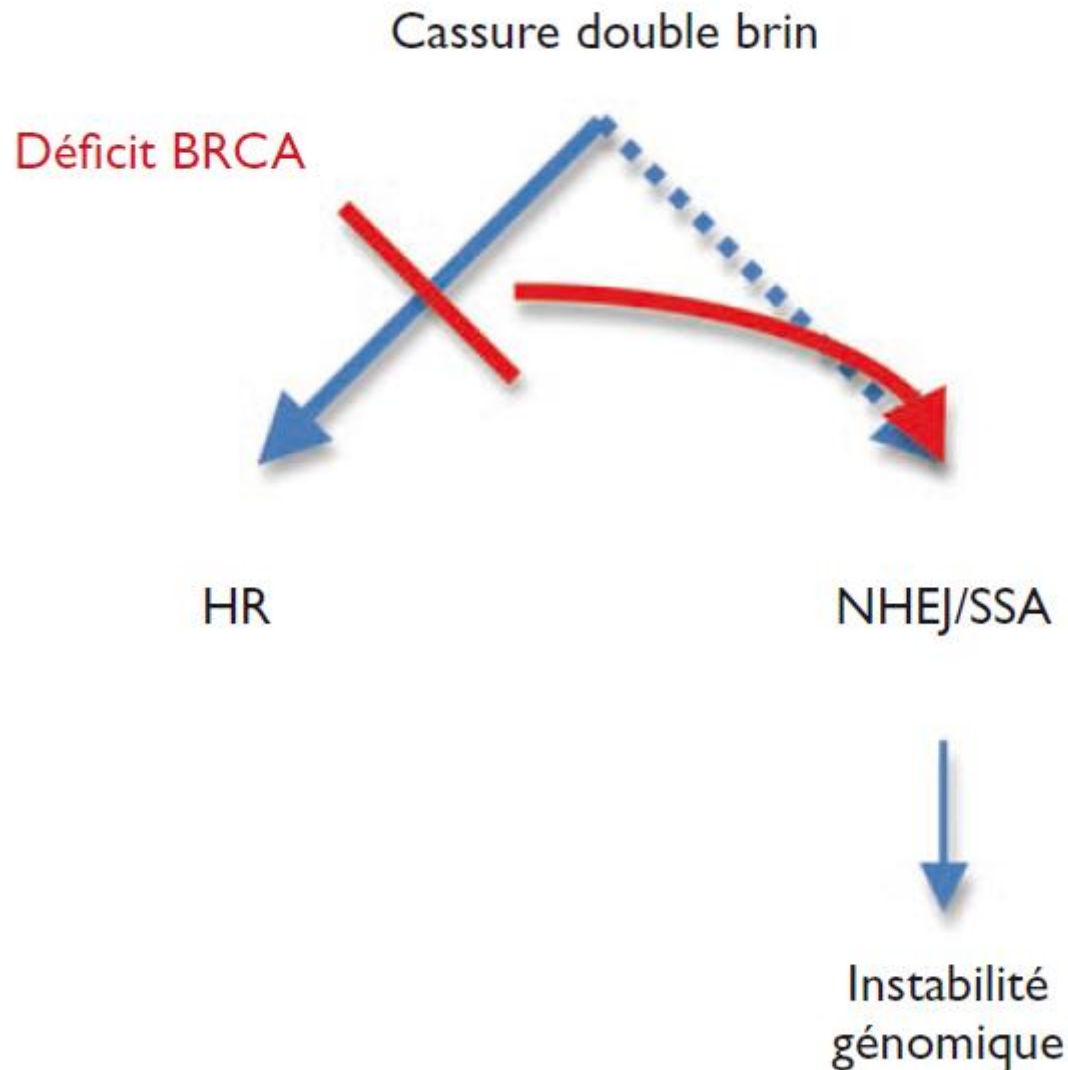
# **Cibler les anomalies de la réparation : PARP inhibiteurs (Olaparib)**

# Systemes de reparations





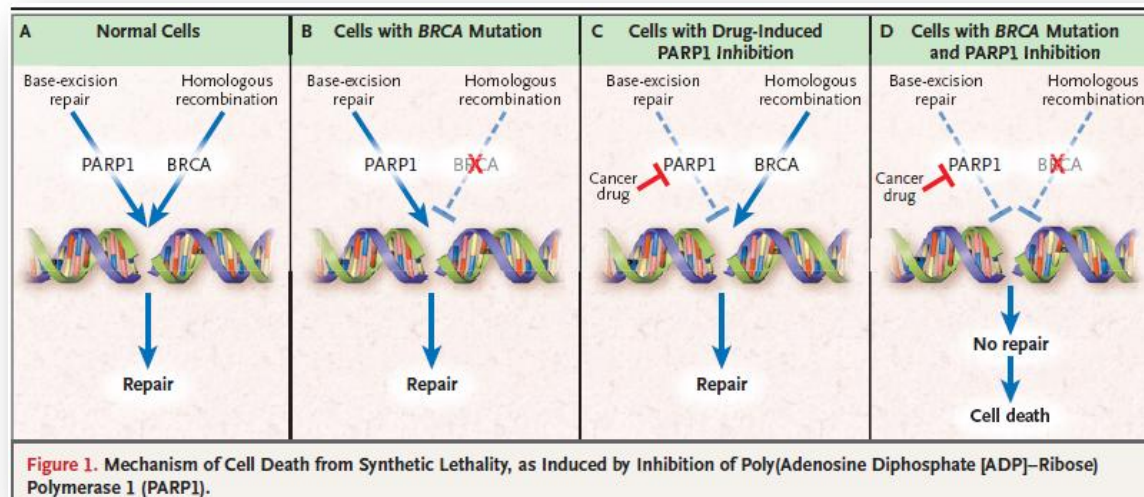
# Mutation BRCA : instabilité génétique



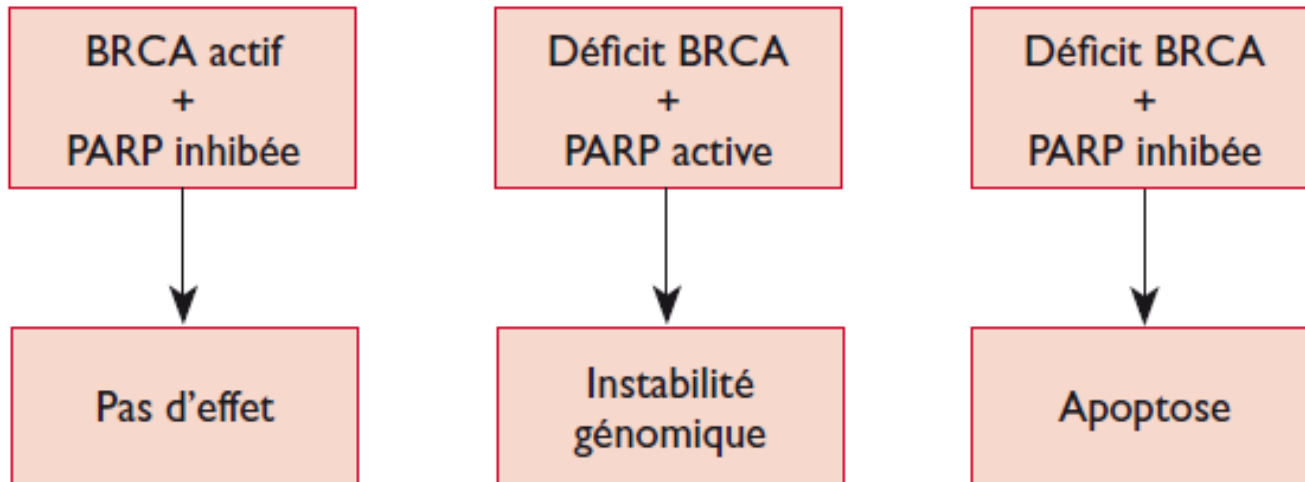
# Une nouvelle voie thérapeutique

## *la létalité synthétique*

- Inhibiteurs de l'enzyme PARP1
  - Exploiter une faiblesse de la cellule tumorale
  - Les cellules tumorales
    - de patientes mutées pour *BRCA1*,
    - ou présentant elles-mêmes une perte de *BRCA1*,
  - Vont présenter une sensibilité particulière aux inhibiteurs de la Poly(ADP-Ribose) Polymérase-1 (PARP1)



# Concept de létalité synthétique

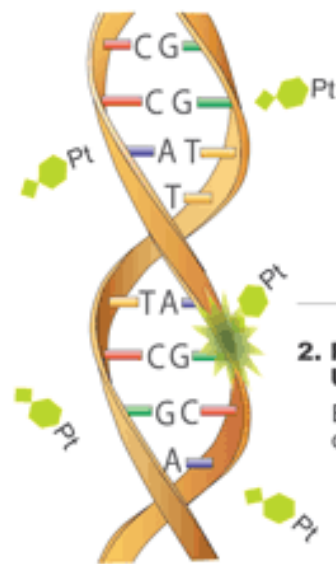


Conséquences du déficit en BRCA et de l'inhibition de PARP sur la cellule

# PARP : enzymes impliquées dans la réparation des cassures simples brins

## 1. PLATINUM CHEMOTHERAPY

Inflicts DNA damage via monoadducts and DNA crosslinking



## 2. PARP1 UPREGULATION

Base-excision repair of DNA damage

PARP1

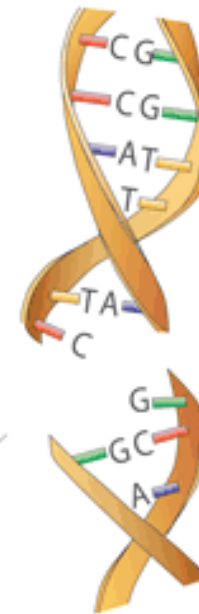


## 3. PARP1 INHIBITION

DNA base-excision repair disabled

PARP1  
BSI-201

BRCA1  
BRCA2



## 4. REPLICATION FORK COLLAPSE

Double strand DNA break

CELL SURVIVAL

CELL DEATH

- **Pour les cellules tumorales présentant une mutation des gènes *BRCA1* ou *BRCA2* ...**

La régulation de la réparation des cassures double brin par la voie de recombinaison homologue (HR) devient inopérante.

Les cassures simple-brin non réparées du fait de l'inhibition de PARP1 se transforment en cassures double-brin au cours de la réplication de l'ADN, ce qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire en G2/M conduisant à l'apoptose de la cellule

# Diagnostic moléculaire des mutations des gènes BRCA

## • Matériel biologique

- Recueilli après une consultation d'oncogénétique
  - Informations familiales
  - Présentation du suivi
  - Recueil du consentement éclairé
- Presque exclusivement sang total recueilli sur EDTA



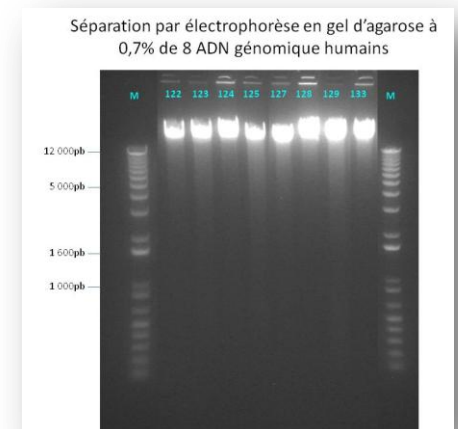
*Tubes de sang 5 ml sur EDTA (photographie de [Lennert B](#), Wikipedia)*



*Cartes FTA Whatman sans indicateur coloré (sang) et avec indicateur coloré (salive)*



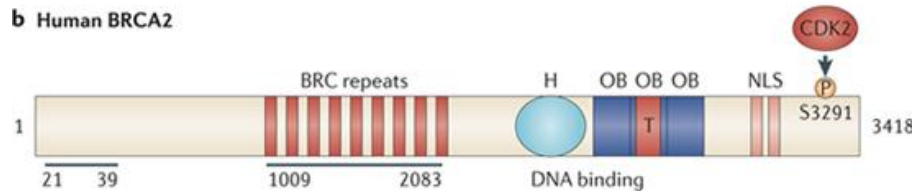
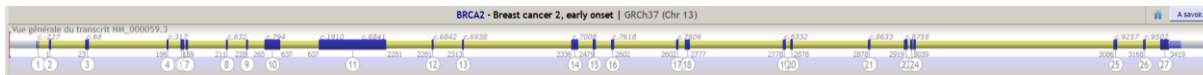
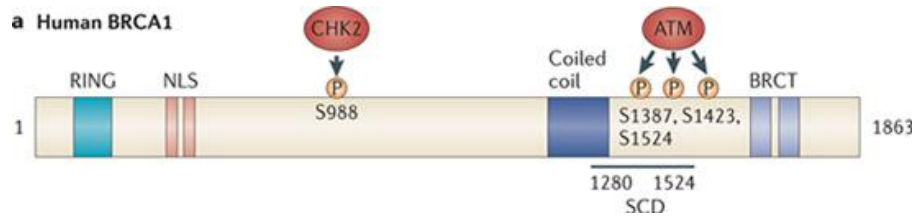
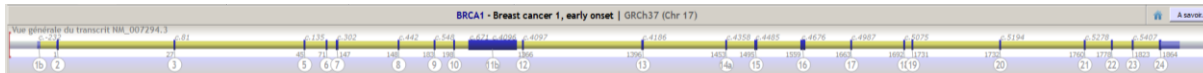
*« Pelote » précipitée d'ADN génomique; <http://web.ac-corse.fr/>*



*Qualification de l'ADN : Séparation par électrophorèse en gel d'agarose de 8 ADN génomique humains. Laboratoire de génétique moléculaire, Institut Bergonié,*

# BRCA1 & BRCA2

## Principales caractéristiques moléculaires



Localisation  
génomique

- *BRCA1* : chr. 17
- *BRCA2* : chr. 13

Transcrit (séquence à  
analyser)

- *BRCA1* : 5700 nt
- *BRCA2* : 11300 nt

Mutations strictement  
somatiques  
(tumorales)  
exceptionnelles

Mutations privées : à  
chaque famille, sa  
mutation

Mutations récurrentes  
rares (pas de hot spot)



# Séquençage de nouvelle génération

## Banque de capture

	Genes	Chromosome	Genomic start	Genomic end	Strand orientation	Number of Exons	Total Exon size (bp)	NCBI RefSeq mRNA Nomenclature <sup>1</sup>
HBOC genes	<b>ATM</b>	11	108 091 559	108 241 826	+	63	13147	NM_000051.3
	<b>BARD1</b>	2	215 676 428	215 591 262	-	11	2607	NM_000465.2
	<b>BRCA1</b>	17	41 279 500	41 194 312	-	23	7207	NM_007294.3
	<b>BRCA2</b>	13	32 887 617	32 975 809	+	27	11386	NM_000059.3
	<b>BRIP1</b>	17	59 942 920	59 754 547	-	20	8166	NM_032043.2
	<b>CDH1</b>	16	68 769 195	68 871 444	+	16	4815	NM_004360.3
	<b>CHEK2</b>	22	29 139 822	29 081 731	-	14	1858	NM_007194.3
	<b>MRE11A</b>	11	94 229 040	94 148 466	-	20	5164	NM_005591.3
	<b>PALB2</b>	16	23 654 678	23 612 483	-	13	4058	NM_024675.3
	<b>PTEN</b>	10	89 621 195	89 730 532	+	9	5547	NM_000314.4
	<b>RAD50</b>	5	131 890 616	131 982 313	+	25	6597	NM_005732.3
	<b>RAD51C</b>	17	56 767 963	56 813 692	+	9	1282	NM_058216.1
	<b>STK11</b>	19	1 203 798	1 230 434	+	10	3276	NM_000455.4
<b>TP53</b>	17	7 592 868	7 569 720	-	11	2586	NM_000546.5	
OTHER genes	<b>APC</b>	5	112 005 202	112 219 936	+	16	10730	NM_000038.5
	<b>EPCAM</b>	2	47 594 287	47 616 167	+	9	1718	NM_002354.2
	<b>MLH1</b>	3	37 032 841	37 094 337	+	19	2662	NM_000249.3
	<b>MSH2</b>	2	47 628 263	47 712 360	+	16	3145	NM_000251.2
	<b>MSH6</b>	2	48 008 221	48 036 092	+	10	4328	NM_000179.2
	<b>MUTYH</b>	1	45 808 142	45 792 914	-	16	1921	NM_012222.2
	<b>PIK3CA</b>	3	178 864 311	178 954 500	+	21	3712	NM_006218.2
	<b>PMS2</b>	7	6 050 737	6 010 870	-	15	2836	NM_000535.5
	<b>PTCH1</b>	9	98 281 247	98 203 264	-	24	7943	NM_000264.3
	<b>PTCH2</b>	1	45 310 616	45 283 516	-	22	4298	NM_003738.4
<b>SUFU</b>	10	104 261 719	104 395 214	+	12	4948	NM_016169.3	
<b>25 genes</b>						<b>451</b>	<b>125937</b>	

# Séquençage de nouvelle génération

Chaque semaine  
2 x 8 échantillons  
d'ADN constitutionnel  
de patients vus en  
consultation

Préparation librairies  
Capture génomique  
de 25 gènes  
(14 HBOC, 11 OTHER)



Analyses  
bioinformatiques  
• Secondaire (bam, vcf)  
• Tertiaire (xls)

COU2NIQ110U

Flux expérimental diagnostic



Alamut 2.3.2 (Interactive Biosoftware, Rouen, France)

08/05/2013

Résultat du criblage par NGS (Banque de capture V1 - MiSeq V2)

N° de Run: 131010\_M00487\_0024\_000000000-A5EVN  
N° de série: 933

Max Coverage: 1626x BRCA1\_1408x BRCA2\_1408x (Alamut v3.3.2)

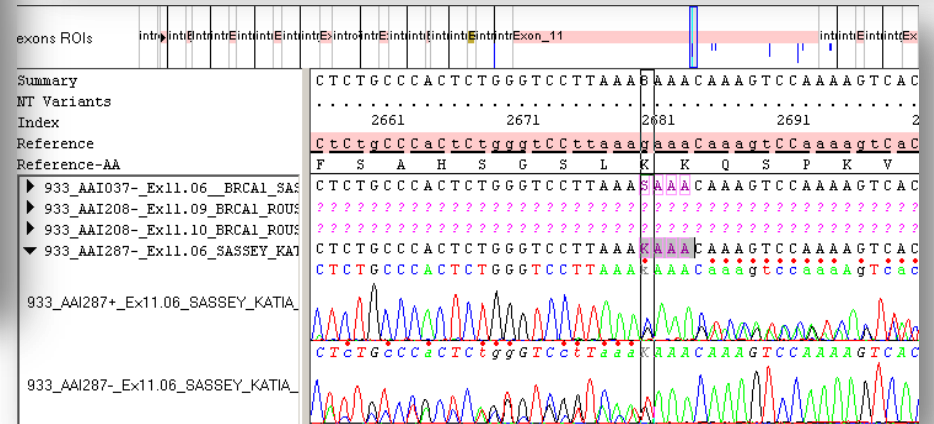
ID	Clé (HGNC)	Localisation (chr position génomique)	INDel (IC)	INDup (p)	MAF	Conséquence	Nbre total de reads	% altère WT	% altère variant	MAF ESP Altmut	ref sans Altmut	Exam Interim Alamut	Résultat
933-AAI037-SASSEY-KATIA-SC50_S9	BRCA1	174121391	c.4413delC		A:0.088	INTRONIC	754	55	45	24	oui	17 (44%)	positif Hq
933-AAI037-SASSEY-KATIA-SC50_S9	BRCA1	174121408	c.2679delC		g.L859Vfs*1	NON_SYNONYMOUS_CODING	627	91	8	-	oui	843 (8)	4 altérations
933-AAI037-SASSEY-KATIA-SC50_S9	BRCA2	151309037	c.2824A			SPRIME_UTR	717	50	50	-	oui	5178	5178 non séquencé
933-AAI037-SASSEY-KATIA-SC50_S9	BRCA2	151321188	c.3796G>C		c.3796A>G>C	SYNONYMOUS_CODING	1303	48	52	50.7	oui	1104 (11.0)	positif Hq
933-AAI037-SASSEY-KATIA-SC50_S9	BRCA2	151321305	c.4345A>G		c.4345A>G>C	SYNONYMOUS_CODING	1305	100	99.9	oui	11.0	Non séquencé Alamut	Non séquencé Alamut
933-AAI037-SASSEY-KATIA-SC50_S9	BRCA2	151329305	c.8113G>C		c.8113G>G>C	SYNONYMOUS_CODING	1188	89	99.9	oui	11.3	Non séquencé Alamut	Non séquencé Alamut
933-AAI037-SASSEY-KATIA-SC50_S9	BRCA2	151329387	c.7397T>C		g.7397A>G>C	NON_SYNONYMOUS_CODING	1308	100	99.9	NON	14.0	Disparition Ref Seq Alamut	positif Hq
933-AAI037-SASSEY-KATIA-SC50_S9	BRCA2	151329466	c.7396A>T>C			INTRONIC	1038	49	50.2	oui	108 (10)	positif Hq	
933-AAI037-SASSEY-KATIA-SC50_S9	BRCA2	151329329	c.*388A>G			SPRIME_UTR	660	51	49	-	oui	5178	5178 non séquencé

variants non remontés par l'analyse tertiaire mais vus sur bam (Alamut)

ID	Clé (HGNC)	Localisation (chr position génomique)
933-AAI037-SASSEY-KATIA-SC50_S9	BRCA1	c.4411Gdel

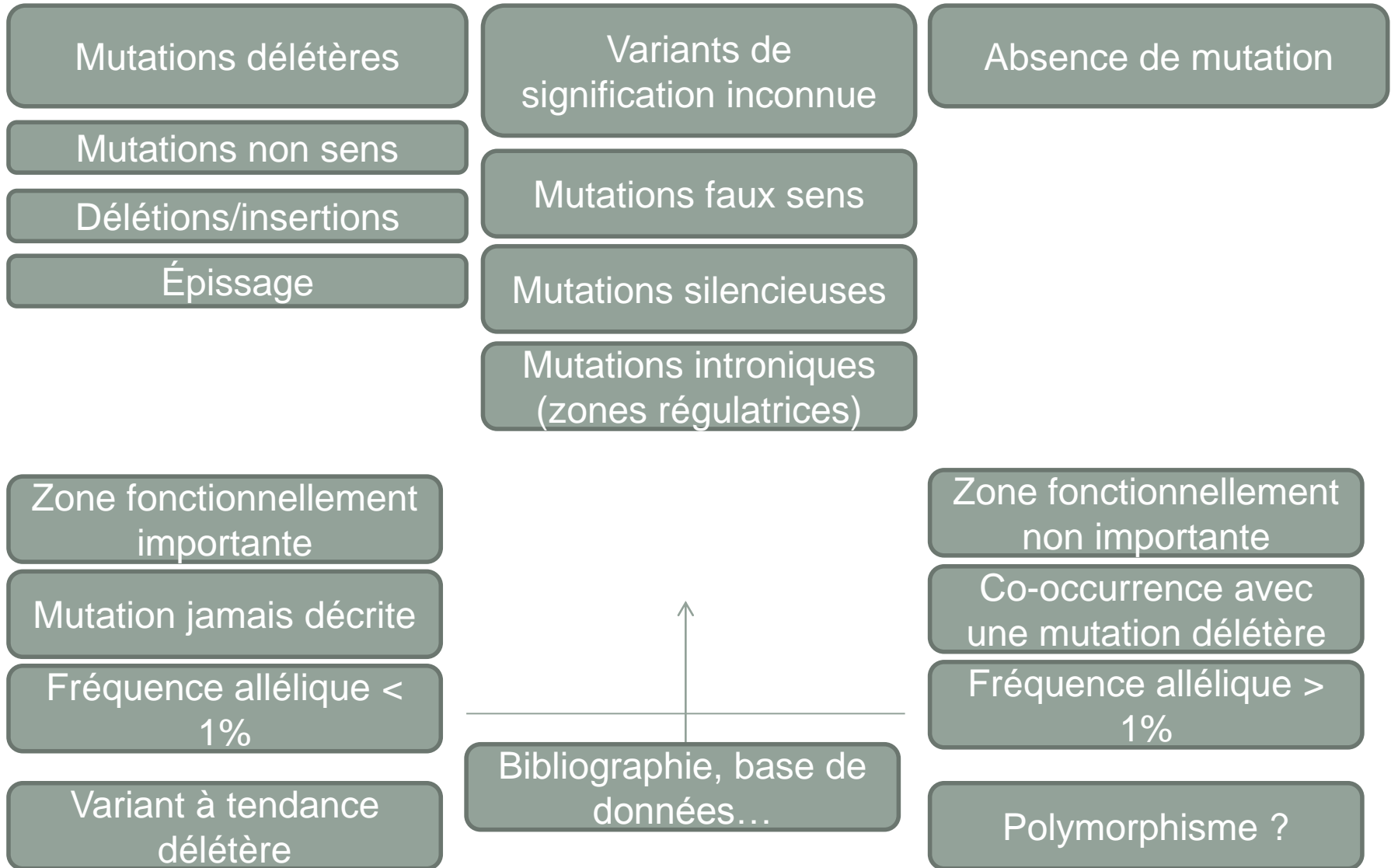
Suspensions de réarrangement de grande taille (RGT)

ID	Clé (HGNC)	Nbr copies de reads ref WT (sans les RGT)	Nbr copies de reads ref WT (avec les RGT)	% variant pour RGT	Exam Interim Alamut	Résultat	commentaire
933-AAI037-SASSEY-KATIA-SC50_S9	BRCA1						



# BRCA1 & BRCA2

L'interprétation des résultats moléculaires est partie intégrante du diagnostic



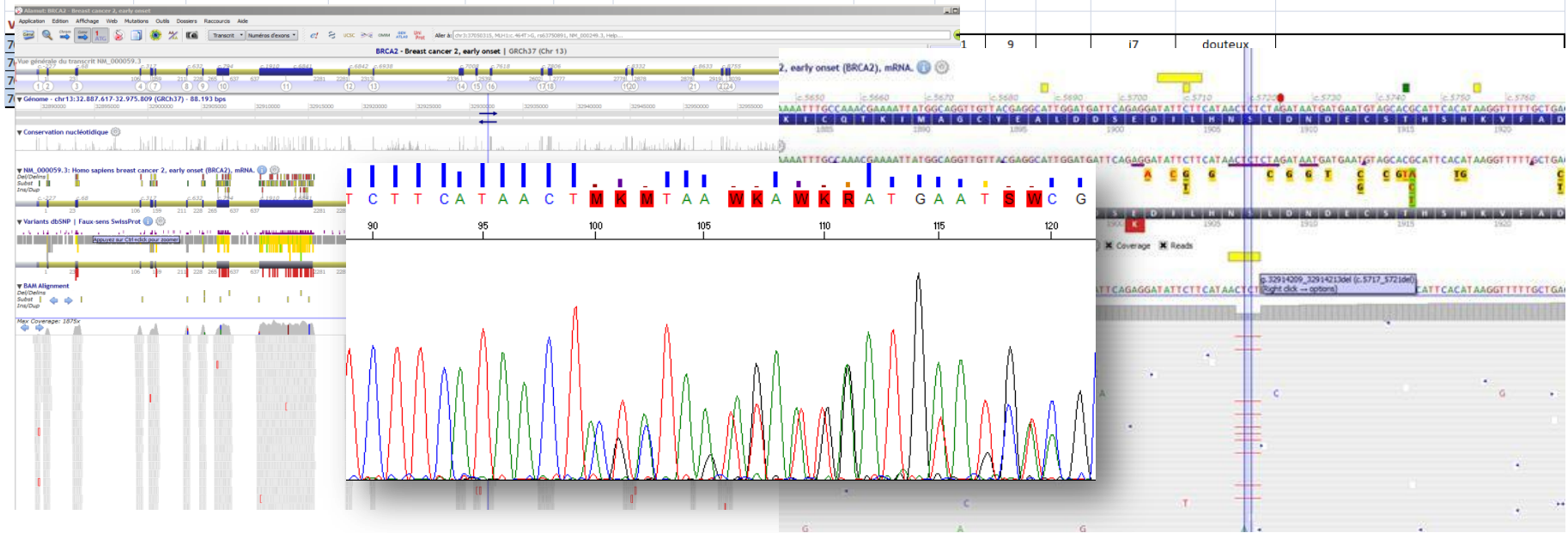
# Mutation *BRCA2*

## Résultat du criblage par NGS (Banque de capture V1 - MiSeq V2)

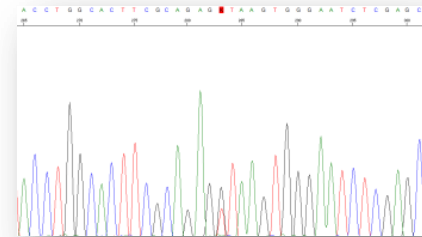
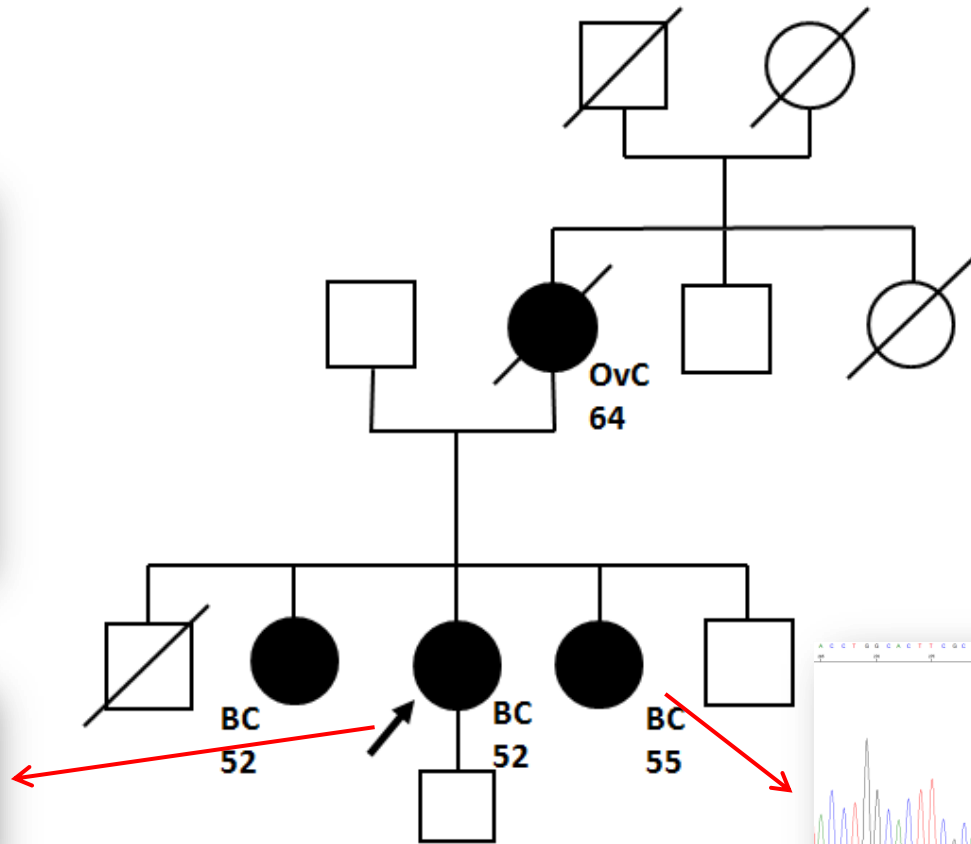
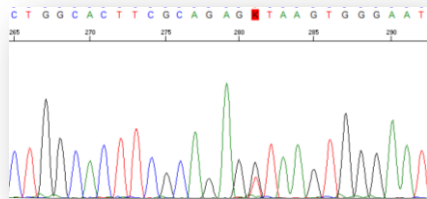
N° DE SERIES: 764 BRCA Max Coverage =BRCA1 2254X et BRCA2 1875X

variants remontés par l'analyse tertiaire (workflow JDC)

ID	Gène (HGNC)	Localisation (chr:position génomique)	HGVSc (c.)	HGVsp (p.)	MAF	Conséquence	Nbre total de reads	% allèle WT	% allèle variant	MAF ESP Alamut	Exon Intron Amplicon	Résultat	commentaire
764-AAH300-4T78_S9	BRCA1	17:41256101-41256103	c.441+36_441+38delCTT	-	-	INTRONIC,feature_truncation	270		del164	-	i7 (Ex8)	A SEQUENCER	SANGER c.441+36_441+49del14 hétéro (POL1)
764-AAH300-4T78_S9	BRCA1	17:41251931	c.442-34C>T		A:0.098	INTRONIC	897	51	49	24	17	pol fréq	
764-AAH300-4T78_S9	BRCA1	17:41245466	c.2082C>T	c.2082C>T(p.=)	A:0.3242	SYNONYMOUS_CODING	1768	50	50	32,4	11.04	pol fréq	
764-AAH300-4T78_S9	BRCA1	17:41245237	c.2311T>C	c.2311T>C(p.=)	G:0.3017	SYNONYMOUS_CODING	1904	53	47	32,3	11.05	pol fréq	
764-AAH300-4T78_S9	BRCA1	17:41244936	c.2612C>T	p.Pro871Leu	A:0.4831	NON_SYNONYMOUS_CODING	2069	51	49	33,6	11.06	pol fréq	
764-AAH300-4T78_S9	BRCA1	17:41244435	c.3113A>G	p.Glu1038Gly	C:0.3031	NON_SYNONYMOUS_CODING	1860	52	47	32,5	11.07	pol fréq	
764-AAH300-4T78_S9	BRCA1	17:41244000	c.3548A>G	p.Lys1183Arg	C:0.3242	NON_SYNONYMOUS_CODING	1792	52	48	32,4	11.08-11.09	pol fréq	
764-AAH300-4T78_S9	BRCA1	17:41234470	c.4308T>C	c.4308T>C(p.=)	G:0.3036	SYNONYMOUS_CODING	1511	58	42	32,6	13	pol fréq	
764-AAH300-4T78_S9	BRCA1	17:41223094	c.4837A>G	p.Ser1613Gly	C:0.3274	NON_SYNONYMOUS_CODING	1632	51	49	32,6	16	pol fréq	
764-AAH300-4T78_S9	BRCA1	17:41197274	c.*421G>T		A:0.2903	3PRIME_UTR	1388	48	52		24		3'UTR non séquencé
764-AAH300-4T78_S9	BRCA1	17:41196408	c.*1287C>T		A:0.3118	3PRIME_UTR	1549	49	51		24		3'UTR non séquencé
764-AAH300-4T78_S9	BRCA2	13:32906729	c.1114A>C	p.Asn372His	C:0.2404	NON_SYNONYMOUS_CODING	1198	53	47	28,6	10,02	pol fréq	
764-AAH300-4T78_S9	BRCA2	13:32913055	c.4563A>G		A:0.0256	SYNONYMOUS_CODING	1245		100	99,9	11		Non séquencé Allèle fréquent
764-AAH300-4T78_S9	BRCA2	13:32914210-32914213	c.5718_5721delCTCT	p.Ser1907X	-	FRAMESHIFT_CODING,feature_truncation	716		del562	-	11,11	A SEQUENCER	SANGER c.
764-AAH300-4T78_S9	BRCA2	13:32915005	c.6513A>G		G:0.0256	SYNONYMOUS_CODING	1310		100	99,9	11		Non séquencé Allèle fréquent
764-AAH300-4T78_S9	BRCA2	13:32929387	c.7397A>G	p.Val2466Ala	T:0.0224	NON_SYNONYMOUS_CODING	1278		99		14		Discordance Ref Seq Alamut
764-AAH300-4T78_S9	BRCA2	13:32936646	c.7806-14T>C		T:0.4533	INTRONIC	1191	48	51	50,3	i16(Ex17)	pol fréq	
764-AAH300-4T78_S9	BRCA2	13:32973276	c.*369A>G		G:0.2312	3PRIME_UTR	465	46	54		27		3'UTR non séquencé



# Recherche de la mutation chez les apparentés



Merci pour votre attention