



**AXE 1 : "Du développement et la  
validation de biomarqueurs  
pronostiques et prédictifs à l'innovation  
thérapeutique"**

**Comité de pilotage :** Y. de Launoit, T. Frebourg, J.P. Kerckaert, P.  
Michel, G. Zalcmán.

Dans l'esprit des Cancéropôles, du transfert de la recherche vers les soins, ce nouvel axe a pour objectif (i) *l'optimisation du diagnostic moléculaire des formes héréditaires de cancer* ; (ii) *le développement et la validation de biomarqueurs d'intérêt pronostique en terme de récurrence et prédictifs de la réponse thérapeutique vis-à-vis des inhibiteurs de kinase*, et (iii) *le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques basées en particulier sur les inhibiteurs de kinases et l'immunothérapie*.

Cet axe mobilise 26 équipes dont 10 labellisées. Il couvre des thèmes de recherche le plus souvent convergents avec pour point commun l'utilisation d'outils de biologie moléculaire pour mettre en évidence des altérations pronostiques, prédictives de réponse au traitement ou potentiellement utilisables comme cible dans un futur traitement.

Dans cet axe deux programmes de recherche sont déjà très structurés et proche du transfert au malade. Ces deux programmes seront détaillés ci-dessous. Les autres projets seront présentés sous forme de tableau (cf. Annexe D)

L'objectif est d'arriver après cette phase de forte concentration des équipes à construire des programmes autonomes. La labellisation de réseaux structurants ou d'axes indépendants est envisagée pour 2009-2010.

### **I. Le programme « Cancer du côlon » (Y de Launoit, T Frebourg, JP Kerckaert, P Michel)**

Implication de 17 équipes (9 cliniques, CNRS UMR 8161, INSERM U837 et U614, 3 laboratoires hospitaliers), des tumorothèques et des plates-formes de génomique fonctionnelle.

Ce programme est l'évolution de certains projets développés depuis 2003 dans l'axe « Phases précoces du cancer ». Cette évolution était nécessaire car les nouvelles questions posées débordent du cadre initial. Les intervenants de ces projets ont souhaité garder le modèle du cancer du côlon et le « noyau dur » des équipes initiales en raison de la forte interaction entre les cliniciens et les biologistes qui a permis de créer une dynamique de recherche productive. Ce groupe a également souhaité s'élargir à d'autres équipes pour compléter la réflexion et les possibilités d'explorations (INSERM U837, CNRS UMR 8161 et 8576) :

#### **1.1 Cancer colorectal héréditaire non polyposique ou syndrome de Lynch**

Le syndrome de Lynch, forme héréditaire de cancer colorectal (CCR), résulte des mutations constitutionnelles des gènes *MMR* de réparation de l'ADN. L'identification d'une mutation délétère dans les familles est essentielle à la prise en charge médicale. L'INSERM U614 a développé deux méthodes, QMPSF et test d'épissage *ex vivo*. Dans le même esprit de développement technologique et de transfert, ce projet concernera **la détection de nouveaux types d'altérations des gènes *MMR*** : anomalies constitutionnelles de méthylation des promoteurs et mutations des séquences de fixation des miRNA des gènes *MSH2* et *MLH1*. Dans le cadre de son recrutement national, le CNO dispose de 1192 ADN de patients hautement suspects de syndrome de Lynch sans anomalie détectable. Nous souhaitons offrir au sein du Cancéropôle une activité de prestation de service assurant des analyses spécialisées d'intérêt diagnostique, en complément des analyses génétiques classiques réalisées dans les autres cancéropôles.

## 1.2. Etudes de validation de biomarqueurs pronostiques du cancer colorectal

### 1.2.1. Etude rétrospective de la valeur pronostique des mutations du gène *TP53*, de l'aneuploïdie, de l'instabilité microsatellitaire et de l'infiltration lymphocytaire tumorale chez des patients opérés d'un CCR stade II et stade III

Le but de cette **étude rétrospective** est de déterminer l'intérêt de l'analyse combinée des marqueurs dont la valeur pronostique a été suggérée sur une cohorte de 800 patients opérés d'un CCR stade II ou III. Toutes ces méthodes d'analyses sont opérationnelles ou en cours d'implémentation au sein du CNO.

### 1.2.2 Etude prospective de la valeur pronostique d'altérations quantitatives ciblées du génome et de l'ADN tumoral circulant dans le CCR

Un « **code-barre** » d'intérêt pronostique basé sur une version somatique de la QMPSF et explorant 8 gènes ou régions cibles a été mis au point : *DCC* (18q21.3), *EGFR* (7p12.3-p12.1), *TP53* (17p13.1), *BLK* (8p23-p22), *MYC* (8q24.12), *APC* (5q21-q22), *ERBB2* (17q11.2-q12), et *AURKA* (20q13.2-q13.3) (Killian et al. Gastroenterology, 2007). La phase de transfert à l'application clinique a fait l'objet d'un projet de recherche clinique sélectionné à l'appel d'offre national PHRC 2007. Dans le CCR opéré, plusieurs études ont montré que la présence d'ADN tumoral dans le sérum après l'intervention chirurgicale était un facteur prédictif de la récurrence métastatique. Cette détection représente un défi technologique, compte-tenu de la dilution de l'ADN tumoral dans le sang périphérique et la grande quantité d'ADN sauvage provenant des cellules sanguines. Dans le cadre du CNO, le but est d'établir pour tout CCR une **signature moléculaire** (mutation de *KRAS* détectée par un *SNaPshot multiplex assay* et mutation de *TP53* détectées par la méthode *HRM*) et avons développé des méthodes spécifiques et sensibles, basées sur la PCR en temps réel réalisée en présence d'un PNA (*Peptide Nucleic Acid*) spécifique de la séquence sauvage, capables de détecter la présence d'ADN mutant dans le plasma et le sérum chez des patients présentant un CCR métastatique non traité. Ce projet est de réaliser une **étude prospective** permettant de déterminer si ces biomarqueurs (code-barre et ADN tumoral circulant) sont prédictifs du risque de récurrence chez les patients opérés d'un CCR stade II non ou III.

## 1.3. Identification de nouveaux biomarqueurs pronostiques dans le cancer colorectal

### 1.3.1. Définition d'un profil moléculaire de valeur pronostique par CGH

Le but de ces travaux est d'une part la **caractérisation d'anomalies quantitatives du génome** prédictives du risque de récurrence métastatique dans les CCR de stade II et III et d'autre part l'**identification des bases moléculaires de l'instabilité chromosomique** dans les CCR. Le criblage des tumeurs s'effectuera dans un premier temps sur la plate-forme CGH array Agilent 244K à Lille. Dans un second temps, par QMPSF somatique réalisée à Rouen, les données de CGH seront confirmées et la fréquence des altérations récurrentes détectées par CGH sera évaluée sur un plus grand nombre d'échantillons. Les conséquences fonctionnelles de ces altérations sur la ségrégation des chromosomes seront évaluées par extinction génique en utilisant des *shRNA*

### 1.3.2. Définition d'un profil moléculaire de valeur pronostique par transcriptome ciblé sur les gènes du cycle chromosomique

L'instabilité chromosomique semble liée, dans le cancer du sein, à un profil d'expression restreint à 25 ou 70 gènes. Le but de ce projet est l'étude de ce profil d'expression indicateur de l'instabilité chromosomique dans les CCR afin de déterminer si un profil d'expression est associé à l'instabilité chromosomique et déterminer la valeur pronostique de ce profil d'expression. Ce projet reposera sur une approche de **transcriptome ciblé sur les 25 ou 70 gènes du cycle chromosomique** identifiés dans l'approche *in silico*. Ces analyses de transcriptome seront réalisées sur plate-forme CGH Agilent.

### 1.3.3. Définition d'un profil moléculaire de valeur pronostique par transcriptome ciblé sur microARNs

Ce projet a pour but de caractériser le **profil d'expression des microARNs** dans les cancers colorectaux et de déterminer s'il existe un profil d'expression associé à un mauvais pronostic. Dans ce but, nous souhaitons utiliser la technologie développée par la société Agilent, basée sur des oligonucléotides spécifiques de chaque microARN.

### 1.3.4. Identification de gènes impliqués dans la dissémination métastatique par criblage différentiel dans des modèles murins (G. Huet INSERM U 837 et Y. de Launoit CNRS UMR 8161)

L'objectif de ce projet sera d'identifier de tels gènes à partir de modèles cellulaires coliques de même origine génétiques, métastatiques ou non métastatiques dans les modèles de xénotransplantation cutanée et intracœcale. La démarche consistera à comparer les profils des cellules et tumeurs primitives en utilisant les techniques de transcriptome et de CGH array, puis d'étudier le rôle fonctionnel de certains gènes dans le processus métastatique en utilisant la technique de *shRNA* et les techniques de xénotransplantation sous-cutanée et intracœcale.

#### 1.4. Développement de biomarqueurs prédictifs de la réponse aux thérapeutiques ciblées dans le cancer colorectal

Le cétuximab (Erbix) et le bevacizumab (Avastin), ciblant respectivement les voies de l'EGF et du VEGF, ont reçu l'AMM pour le traitement des patients métastatiques. Deux questions apparaissent prioritaires : le développement de marqueurs prédictifs de la sensibilité ou la résistance à ces thérapeutiques ciblées, compte-tenu de l'hétérogénéité de la réponse clinique en fonction des patients et d'autre part l'intérêt de combiner des thérapeutiques ciblées.

##### **1.4.1 Biomarqueurs prédictifs de la résistance au cétuximab (T. Frebourg INSERM U 614, Y. de Launoit CNRS UMR 8161)**

Au sein du CNO, nous venons de montrer que la présence d'une mutation du gène *KRAS* était associée de manière significative à une non réponse au traitement par cetuximab et qu'aucun patient répondeur ne présentait de mutation *KRAS* (Di Fiore et al., Br J Cancer 2007). Nous avons également montré que pour assurer une détection fiable de mutation conférant une résistance à des thérapeutiques ciblées, il était essentiel d'utiliser des méthodes plus sensibles que le séquençage direct, telle la PCR-LCR et le SnaPshot. Nous souhaitons maintenant réaliser une analyse prospective visant à valider cette **valeur prédictive de la mutation *KRAS*** vis-à-vis de la réponse au Cetuximab dans le CCR métastatique, en recherchant cette fois-ci les mutations de *KRAS* sur la tumeur primitive mais également sur la métastase. D'autre part, nous souhaitons rechercher, chez les patients non répondeurs et sans mutation détectable de *KRAS*, **des mutations sur ces gènes de la voie de l'EGF** et nous développerons grâce à l'expertise du groupe d'Y. de Launoit à Lille dans le domaine des tyrosines kinases, des tests fonctionnels dans des lignées cellulaires permettant de tester l'effet des mutations de gènes candidats sur la sensibilité au Cetuximab.

##### **1.4.2 Recherche de facteurs prédictifs de la réponse thérapeutique aux inhibiteurs de topoisomérase utilisés seuls ou en association avec des inhibiteurs de l'EGFR (A. Lansiaux INSERM U837)**

Nous souhaitons étudier les **interactions moléculaires et fonctionnelles entre la signalisation oncogénique médiée par l'EGFR et la topoisomérase de type I dans les CCR**. Ce projet bénéficiera d'une collaboration avec A. Larsen à Paris. Nous étudierons également l'effet des inhibiteurs de topoisomérase utilisés en association avec des inhibiteurs du VEGF sur la progression tumorale et la dissémination métastatique en utilisant les modèles de xénogreffes.

#### 1.5. Immunothérapie du cancer colorectal basée sur les cellules artificielles présentatrices d'antigène (J.B. Latouche INSERM U 614)

L'objectif est de développer, un **programme d'immunothérapie pour les CCR** et notamment les CCR associés à un phénotype d'instabilité microsatellitaire ou phénotype RER (Replication ERror), présent dans

15 % des cas de CCR sporadiques et également associé au syndrome de Lynch / HNPCC. Nous avons construit des cellules présentatrices d'antigènes (CPAAs) exprimant différents antigènes tumoraux associés aux CCR (ACE, Ep-CAM, Her-2/Neu, MAGE-3 et p53). A ce jour, nous n'avons pas pu mettre en évidence de réponse cytotoxique spécifique avec l'épitope dérivé de l'ACE. Par conséquent, nous allons exprimer l'ADNc entier de l'ACE dans sa globalité, en introduisant par transduction d'autres molécules de la synapse immunologique ainsi que des cytokines et chemokines ; nous orientons nos travaux sur les **néo-antigènes résultant des mutations décalant le cadre de lecture et associées au phénotype RER**, en particulier le récepteur de type II du TGFβ muté. Nous souhaitons également déterminer les autres épitopes immunogènes associés au phénotype RER en étudiant en parallèle l'infiltrat lymphocytaire des tumeurs de patients HNPCC et les insertions/délétions de gènes candidats par PCR multiplex fluorescente. L'objectif de ce travail est de développer, à long terme, une thérapie basée sur l'utilisation des CPAA pour une population ciblée de patients, et notamment des patients jeunes atteints du syndrome HNPCC.

## **II. Le programme « mésothéliome » (F. Galateau-Sallé et G. Zalcman INSERM ERI 3)**

Le territoire Nord-Ouest est la région de France ayant aussi la plus forte incidence de mésothéliomes pleuraux malins. Les équipes concernées : 4 équipes cliniques, 4 laboratoires hospitaliers, 1 tumorothèque spécifique mésothéliome (F. Galateau-Sallé CRB labellisé INSERM), 3 tumorothèques du CNO, 1 sérothèque (A. Scherpereel, INSERM U774), le Registre National des mésothéliomes Mesonat (Pr. F. Galateau-Sallé), le Programme National de Surveillance des Mésothéliomes coordonné par l'INVS, l'unité INSERM ERI 3 et la plate-forme CGH Lille.

### **2.1 CGH arrays haute résolution dans le mésothéliome malin diffus**

L'objectif principal est d'obtenir une **classification des altérations génétiques somatiques des mésothéliomes** dans la perspective :

- 1) d'identifier des biomarqueurs pour la reconnaissance des états précancéreux.
- 2) d'améliorer la stratégie thérapeutique de cette maladie (identification de biomarqueurs permettant de nouvelles options thérapeutiques et la compréhension des mécanismes de résistance aux traitements).
- 3) de les relier aux données disponibles sur l'exposition des patients à l'amiante et aux données des autres facteurs étiologiques (fibres minérales artificielles, radiation ionisante en milieu professionnel, irradiation liées à un antécédent, virus (SV40), irritation chronique de la plèvre...).
- 4) d'identifier les hyperplasies mésothéliales atypiques en voie de transformation par la recherche d'une délétion de p16/*CDKN2A* en FISH.

Ce projet représentera un vrai travail collaboratif (sélection des patients dans un bassin de population bien spécifique) sur le CNO entre les différents services de pneumologie (A. Scherpereel, L. Thiberville et G. Zalcman). Ce projet s'intègre par ailleurs dans le soutien de l'INVS (PNSM II) pour le travail mis en place avec le panel international des mésothéliomes sur l'amélioration de la connaissance des états précancéreux.

Sur ce sujet, nous sommes en compétition avec les équipes du Memorial Sloane Kettering Cancer Center de Boston avec l'avantage de disposer d'une procédure de certification anatomo-pathologique du diagnostic et d'une connaissance aussi précise des expositions ce qui accroît la pertinence de nos études.

## 2.2. Facteurs prédictifs de réponse au traitement (PHRC national 2007 MAPS, G. Zalcman)

Le travail a pour objectif de mettre en évidence les paramètres biologiques pouvant influencer sur la réussite du traitement expérimental par rapport au traitement contrôle chez les patients inclus dans un grand essai randomisé (445 tumeurs): dosages sériques et pleuraux de « soluble mesothelin-related peptides », ostéopontine etc..., recherche de mutations de c-met, de méthylation, de méthylation du promoteur de RASSF1, p16, et WIF-1. La validation de la puce CGH array sur le mésothéliome sera également réalisée.

### III. Les autres projets

Parmi les autres projets il est nécessaire de distinguer :

- Les projets portant sur la recherche de facteurs prédictifs de réponse à la chimiothérapie (G. Zalcman, P. Gauduchon), la validation de facteurs pronostiques potentiels (N. Prevarskaya, N. Porchet), et la création d'un registre de patients porteurs de lésions bronchiques pré-néoplasiques avec un suivi clinique et l'étude de facteurs biologiques pronostiques (L. Thiberville). Ces projets sont présentés en Annexe D
- Les projets de développement de nouveaux traitements.

#### ▪ **Recherche d'inhibiteurs extracellulaires du récepteur Met (O. Melnyk)**

**Equipes impliquées :** O. Melnyk (chimie), V. Fafeur (biologie) CNRS UMR 8161, C. Dhaenens, (bioinformatique) CIB Université de Lille 1, C. Preda (statistique) CERIM Université de Lille 2

L'«hepatocyte growth factor/ scatter factor» (HGF/SF) est le ligand du récepteur tyrosine kinase Met. La dérégulation de la signalisation HGF/SF-Met conduit à la progression tumorale. Ce sont donc des candidats pour une thérapie anti-cancéreuse ciblée. L'équipe de chimie dispose d'une chimiothèque d'environ 150 polysaccharides sulfatés de composition diverse, qui est complétée par un travail de synthèse constant. A terme, certains polysaccharides incluront des peptides sélectionnés par phage display pour leur capacité à interagir avec le domaine extracellulaire de Met. Les polysaccharides sont sélectionnés sur une biopuce à polysaccharides, pour leur capacité à lier l'HGF/SF et/ou Met. L'ensemble des résultats devrait permettre de valider notre proposition **d'inhibition extracellulaire de la signalisation HGF/SF-Met** par des polysaccharides.

#### ▪ **Immunothérapie (L. Mortier)**

**Equipes impliquées :** P. Formstecher, Ph. Marchetti, L. Mortier, B. Quesnel, R. Polakowska INSERM U837, V. Pancre CNRS UMR 8161, J.B. Latouche INSERM U614, T. Velu Hôpital Erasme-Bruxelles.

L'objectif commun est d'optimiser les vaccinations anti-tumorales en utilisant 4 stratégies complémentaires.

### **1 : Dormance tumorale et nouvelles cibles cellulaires**

Les cellules tumorales dormantes échappent aux réponses cytotoxiques en surexprimant des molécules inhibitrices des CTLs (B7-H1) ou en dérégulant des voies (JAK/STAT) régulant l'apoptose. Des résultats récents suggèrent que ces facteurs inhibiteurs sont exprimés dans les cellules d'hémopathies malignes humaines. Le projet vise à étendre l'étude de la **dormance tumorale** aux tumeurs solides (en utilisant le modèle du mélanome) et en y incluant notamment l'hypothèse des cellules souches tumorales.

### **2 : Rôle de la contamination par des lymphocytes T régulateurs des vaccins antitumoraux : Intérêt d'une déplétion préalable ?**

Les lymphocytes T régulateurs (Treg), notamment CD4+CD25+Foxp3+, pourraient jouer un rôle clé dans l'inhibition des réponses immunes anti-tumorales spontanées ou induites par une vaccination par cellules dendritiques (CD). Nous réaliserons tout d'abord, une étude rétrospective *in vitro* sur des échantillons de CD que nous avons générées dans le cadre de diverses études cliniques. Si une **déplétion en Treg** des vaccins dendritiques autologues administrés aux patients cancéreux s'avère souhaitable, nous testerons, lors d'une étude prospective *in vitro*, la fonctionnalité de ces vaccins CD déplétés par des cultures mixtes CD + peptide(s) antigénique(s) tumoral(aux) + TL.

### **3 : Apoptose des cellules dendritiques et potentiel de membrane mitochondrial : à la recherche d'un nouveau marqueur d'efficacité des vaccins cellulaires anti-tumoraux utilisés dans le mélanome**

Les CD peuvent subir l'apoptose en réponse à de multiples stimuli. Or 48 à 72 heures sont nécessaires entre l'injection des CD et leur arrivée dans le ganglion lymphatique de drainage où elles activent les lymphocytes T. Pour s'assurer de l'efficacité des CD à générer une réponse immunitaire *in vivo*, il est absolument nécessaire de connaître la viabilité des CD après 2-3 jours de leur maturation. Nous avons pu montrer que les CDm générées *in vitro* « en conditions cliniques » entrent spontanément en apoptose par une voie mitochondriale en moins de 24 heures après la maturation, soit à un moment où elles sont soit encore en regard de la zone où l'injection a été réalisée, soit en cours de migration vers le ganglion lymphatique de drainage et que cette induction a une influence majeure sur les capacités « immunologiques » des CD (sous presse). La **prévention de l'apoptose** des CD au sein des tumeurs pourrait devenir une stratégie supplémentaire pour accroître l'efficacité de l'immunothérapie.

### **4 : Potentialisation de l'évaluation biologique de la réponse immune**

Dans le cadre de notre Cancéropôle un **essai d'immunothérapie** par cellules dendritiques chargées par 9 peptides distincts à la fois de classe I et de classe II est actuellement en cours. En dehors de l'évaluation clinique des malades, une optimisation du suivi immunologique est indispensable. Par ailleurs, une analyse du transcriptome se basant sur l'utilisation de la PCR quantitative en temps réel et permettant d'analyser environ 400 paramètres de l'immunité sur des prélèvements séquentiels réalisés avant et après la vaccination sera réalisée.