

UE3 Bases moléculaires et tissulaires des traitements
Pr S. Mourah
Le 30/03/17 à 13h30
RT : Guillaume Chorao
RF : Alexis Bismuth

Cours n°10 – UE3

Thérapie individualisée vers de nouveaux médicaments

Le cour n'a quasiment pas changé par rapport à l'année dernière.

Sommaire

-Introduction

I- Différentes cibles étudiées : exemple

- 1) Généralités
- 2) Comment cibler les tyrosine-kinases
- 3) Cancer du sein, HER2 et Trastuzumab
- 4) Imatinib
 - a) Leucémie myéloïde chronique
 - b) GIST
 - c) Le Dermatofibrosarcome de Darrier et Ferrand

II- Modulation médicamenteuse de l'angiogenèse dans les cancers

- 1) Le VEGF
- 2) Le VEGF comme cible thérapeutique

III- Thérapie ciblée et mélanome

- 1) Mélanome
- 2) Méthode de mise au point des nouvelles thérapies
- 3) L'Institut National du Cancer

IV- Mécanisme de résistance aux inhibiteurs de BRAF dans le mélanome

V- Immunothérapie anti-tumorale

-Conclusion

Intro : Qu'est ce qui est ciblé ?

Traitement individualisé : traitement qui va cibler une caractéristique de la pathologie pour agir sur le tissu tumoral et pas ou peu sur les tissus sains.

On cible :

- une caractéristique spécifique de la pathologie (le tissu ou l'environnement)
- un sous-groupe spécifique de la pathologie
- une molécule altérée, surexprimé ou mutée responsable de la pathologie

Les traitements sont actifs sur le tissu pathologique uniquement et pas sur les tissus sains, ou autre qui n'expriment pas la maladie (par opposition aux chimiothérapies classiques qui ciblent toutes les cellules sans discernement.)

Ils existent différents outils permettant de d'identifier les différentes cibles :

- le séquençage de génome (mutation, délétion, surexpression de gène)
- les outils de transcriptomique et de protéomique
- la modélisation moléculaire
- et l'HIC (histoimmunochimie) haut débit.

I- Les différentes cibles étudiées

1) Généralités

Les cibles les plus visées sont les récepteurs membranaires et en particulier les récepteurs à tyrosine kinase (possède une grande diversité, une trentaine de récepteur tyrosine kinase différente). Ceux-ci ont un domaine extracellulaire variable mais une grande homologie en intracellulaire (avec plusieurs tyrosines phosphorylables).

Leur activation nécessite une dimérisation, une modification conformationnelle et une phosphorylation de leur partie intracellulaire. Une mutation du récepteur ou des différents effecteurs de la voie activera dans la plupart des cas une activation constitutive à l'origine de nombreuses pathologies (notamment tumorale).

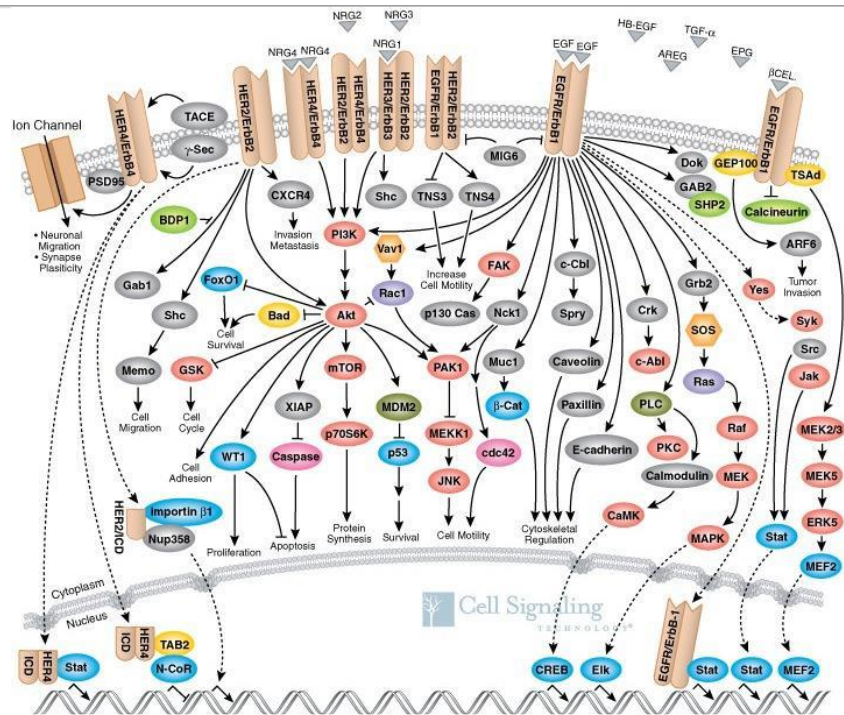
On a donc développé de nombreuses molécules permettant d'inhiber cette activation en particulier des anticorps bloquant le récepteur ou des anticorps anti-ligand, des récepteurs solubles qui lis le ligand ou des petites molécules se logeant dans la poche à ATP des tyrosine-kinases inhibant leur activité.

2) Comment cibler les tyrosine-kinases

Les anticorps utilisés peuvent être humanisés (majoritairement avec des séquences humaines, et des petites séquence murine) ou chimérique, les chimériques possèdent une plus grande partie murine contrairement aux humanisés où seule la région hypervariable qui reconnaît les épitopes est murine. Les humanisés ont l'avantage de susciter beaucoup moins de réactions

immunitaires mais sont beaucoup plus chers à produire. Très complexe comme inhibition car il existe des multitudes de signalisation... pour les plus d'eter c'est pas à apprendre le schéma.

La famille erb



3) Cancer du sein, HER2 et Trastuzumab

On a remarqué dans de nombreux cas, le cancer du sein s'accompagnait d'une surexpression du récepteur HER2 de la famille d'erb (facteur de mauvais pronostic) dû à une duplication du génome. On a donc mis au point le Trastuzumab (Herceptin), un anticorps monoclonal anti-HER2. (Suffixe mab = anticorps monoclonaux).

Avec une cohorte de 300 patients sans sélection, le bénéfice clinique est très petit. Cependant on a sélectionné dans ce groupe de 300 patients, ceux surexprimant HER2 (15 à 20%), qui vont être beaucoup plus répondeur. En associant en plus avec la chimiothérapie, on a une grosse amélioration de la survie par rapport à la chimiothérapie seule uniquement chez les patients surexprimant HER2.

En clinique, quand on est face à un cancer du sein, on cherche d'abord :
 -Les récepteurs à œstrogène : facteur de bon pronostic.

-Les récepteurs HER2 : facteur de mauvais pronostic mais avec possibilité d'utiliser le Trastuzumab-Herceptin.

Trastuzumab-Herceptin est la première molécule à être rentrée dans la grande histoire de la thérapie ciblée.

4) Imatinib

A aussi fait l'objet d'un développement individualisé, notamment dans :

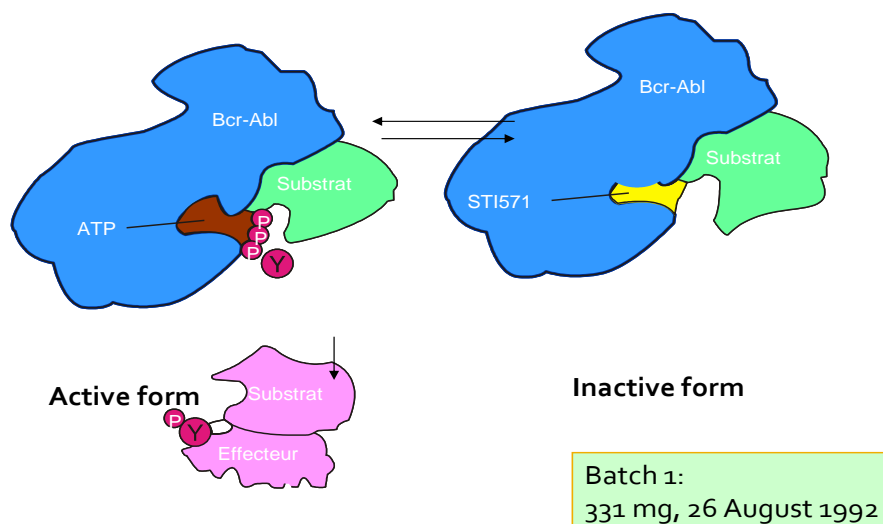
a) Leucémie myéloïde chronique

Elle représente 15 à 20% des leucémies, commence par une phase aiguë suivit d'une phase chronique. Elle est due à une translocation chromosomique entre le chromosome 9 (possédant le gène ABL) et 22 (possédant le gène BCR), créant ainsi le chromosome de Philadelphie (possédant les 2 gènes ABL/BCR). Elle apparait après 50 ans pour 1 à 2 cas pour 100 000 habitant par an. Le transcrite de fusion BCR-ABL active l'activité kinase d'ABL qui résulte en une activation constitutive et donc une phosphorylation sans cesse de la voie **RAS** et **STAT** qui vont activer la voie MEK/ERK qui sont les voies de prédilection de la prolifération cellulaire.

On va donc chercher au premier abord à bloqué cette kinase.

On a développé le Glivec®, ou imatinib, qui est une petite molécule que va se loger dans la poche ATP de la tyrosine kinase BCR-ABL inhibant de ce fait son activation constitutive, marche dans 90% des LMC.

Mécanisme d'action de l'imatinib mésylate (STI571, CGP57148, Glivec®)



Ce traitement doit être poursuivi indéfiniment car il est réversible. On peut aussi y développer des résistances car des mutations au niveau de la poche à ATP peuvent apparaître empêchant l'imatinib ou STI571(sur le schéma de s'y fixer).

De ce fait, dû à la résistance, on a développé d'autres inhibiteurs de 2ème et 3ème génération, dont le Dasatinib, un inhibiteur de la tyrosine kinase (ITK) de seconde génération.

b) GIST (tumeurs stromales)

De nombreuses tumeurs sont par le biais de tyrosine kinase. L'utilisation de l'imatinib a donc été recherchée pour des tumeurs autres que la LMC. Dans le cas du GIST qui est une tumeur stromale rare à très mauvais pronostic, associée de façon quasi systématique à une amplification du récepteur KIT (récepteurs à tyrosine kinase). L'imatinib inhibe sa phosphorylation et donc son activation en inhibant la kinase kit. Ce traitement augmente la survie globale à 90% à un an, à 65% à 3 ans. **Si le patient à une mutation de KIT en plus de son amplification, il sera ++ répondant à la thérapeutique.**

c) Le Dermatofibrosarcome



Le dermatofibrosarcome est un sarcome sous cutané, traité par chirurgie, est extrêmement invalidant, avec la présence d'une fusion de *COLL1-PDGF* avec une activation de la kinase *PDGFR*, là encore c'est une kinase qui est activée, l'imatinib a été utilisé dans cette maladie récidivante et résistante au chimio et radiothérapie. Effet très bénéfique, le seul problème est que l'imatinib (1ère génération) le dasatinib (2ème génération) et le nilotinib (3ème génération) ne dépasse pas 30% de réponse bénéfique. Plus de 70% ne répondent donc pas à ce traitement, sûrement dû au fait que la maladie soit multifactorielle.

II- Modulation médicamenteuse de l'angiogenèse dans les cancers

Des observations de l'époque ont permis de montrer l'incapacité des tumeurs à se développer dans un milieu avasculaire. M. J. Folkman/ F. Becker sont les premiers à avoir formulé cette théorie dans les années 1960.

Folkman : « lorsqu'une tumeur est apparue, toute croissance de la population cellulaire tumorale doit être précédée par une augmentation de nouveaux capillaires qui convergent la tumeur »

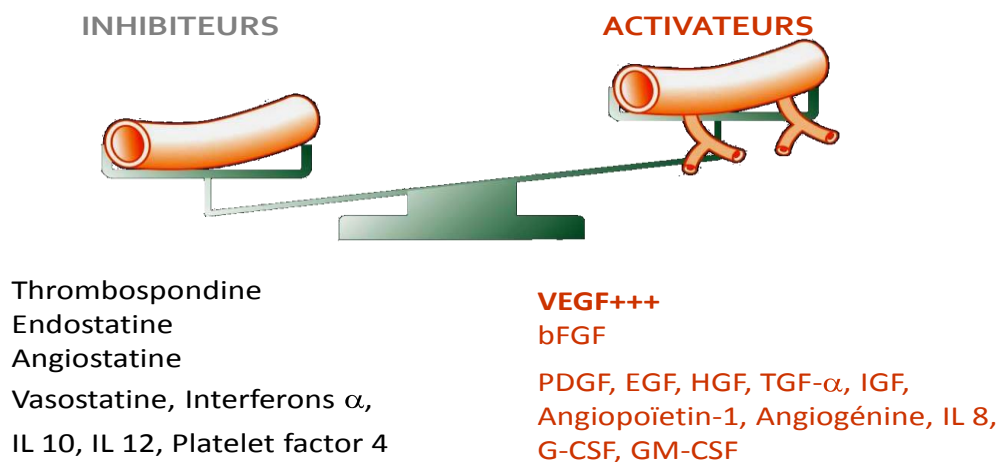
L'angiogenèse est primordiale pour la croissance tumorale.

La mise en place la vascularisation dépend essentiellement de VEGF (« vascular endothelial growth factor) +++ qui est un facteur de croissance mitogénique. Sa seule présence au sein de cellule tumorale suffit à leur croissance.

La croissance d'une tumeur est limitée à 1-2mm³ mais augmente à 1-2 cm³ après la mise en place de la vascularisation grâce à l'apport de nutriment et d'oxygène. Le switch angiogénique consiste en une balance entre inhibiteurs et activateurs de l'angiogénèse. Parmi les inhibiteurs on trouve la thrombospondine, l'endostatine ou l'angiostatine, et dans les activateurs on a VEGF +++, bFGF, PDGF, EGF, ou encore TGF alpha.

Le Switch angiogénique

L'angiogénèse: une balance dynamique entre activateurs et inhibiteurs



Une surexpression de VEGF va déséquilibrer la balance dans le sens de l'angiogénèse, ce qui est à l'origine de phénomènes tumoraux. La tumeur va donc produire des facteurs activateurs en vue d'amplifier l'angiogénèse.

1) Le VEGF

C'est une glycoprotéine homodimérique qui existe sous différentes formes (A +++, B, C, D et PlGF (Placenta Growth Factor)). Il est impliqué de façon physiologique au cours de :

- L'embryogénèse et le développement post-natal précoce,
- La formation enchondrale des os
- L'angiogénèse ovarienne
- La cicatrisation

En physiopathologie on s'intéressera majoritairement au VEGF A. Le gène qui le code possède 8 exons. L'épissage alternatif des exons 6a 6b et 7 et produit 4 isoformes principales. Ces isoformes ont des propriétés de liaison différentes à la MEC :

- le VEGF121, le plus court, est acide et soluble et ne lie pas l'héparine
- le VEGF165, basique, sécrété et se lie à la surface des cellules endothéliales et de la MEC
- le VEGF189 et VEGF206 sont séquestrés dans la MEC.

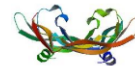
La sécrétion de VEGF par les cellules tumorales constitue un processus DYNAMIQUE : en effet la masse tumorale est le siège d'une hypoxie, ce qui induit la transcription de VEGF ; le VEGF121, ne liant pas l'héparine va aller agir directement sur les cellules endothéliales alors que les autres isoformes restent séquestrées dans la MEC. Dans un second temps, la lyse de la MEC les libère.

Le VEGF explique à la fois l'angiogenèse physiologique et tumorale. On cherche donc en thérapie un moyen d'annuler l'angiogenèse tumorale.

Il existe 3 types récepteurs au VEGF : VEGFR-1, 2 et 3. Les 3 participent la formation des vaisseaux sanguins, mais seuls les VEGFR-2 et VEGFR-3 participent à la formation des vaisseaux lymphatiques. Ainsi, VEGF A se liant à la fois au VEGFR-1 et au VEGFR-2, on doit en thérapie faire attention à inhiber uniquement la ou les voies voulues en agissant sur VEGF A.

On trouve des surexpressions de VEGF dans de nombreux cancers différents, ce qui en fait une excellente cible thérapeutique.

Expression de VEGF dans les tumeurs



tumeur	Expression VEGF (%)
Colorectal	37-100
poumon	47-59
Ovaire	43-97
sein	55-95

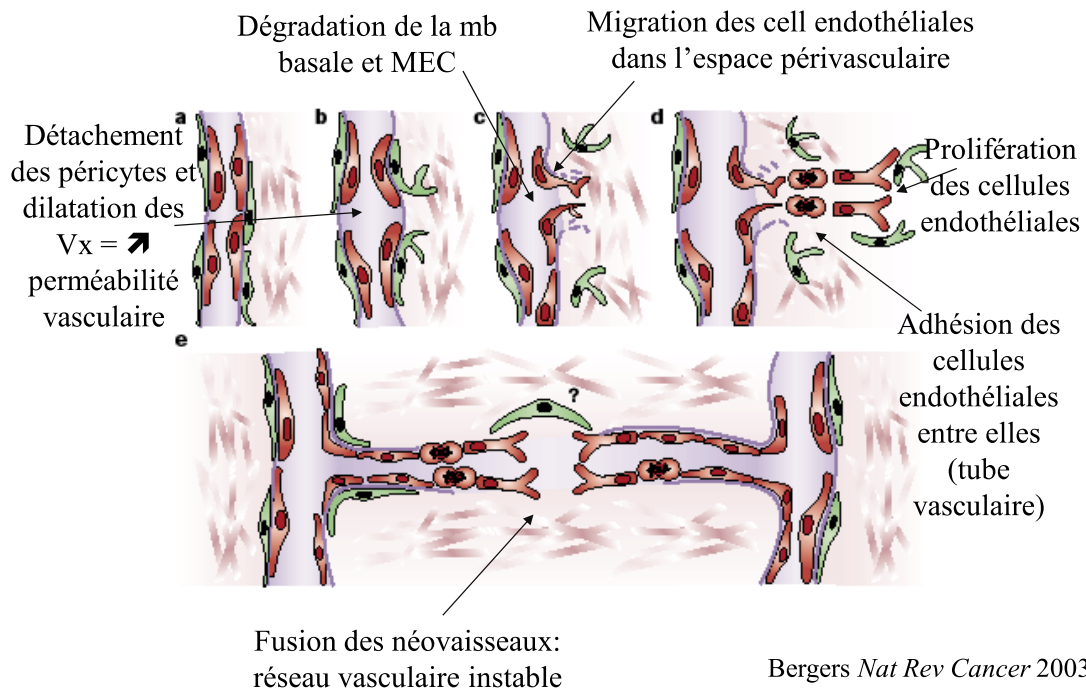
Ishigami Br J Cancer 1998, Amaya Cancer Lett 1997, Maeda Int J Mol Med 2000

Comme, on l'a vu précédemment l'hypoxie est à l'origine d'une surexpression de VEGF, mais il existe aussi de nombreux facteurs permettant la sécrétion par les cellules tumorales de VEGF comme l'IGF ou le PDGF.

En cas de vascularisation normale, les vaisseaux matures (possédant des péricytes) sont organisés et ont une perméabilité physiologique : ces vaisseaux ont une autonomie de survie et permettent un flux sanguin régulier.

Dans les tumeurs, la néovascularisation est désorganisée, présente des vaisseaux dilatés et tortueux entraînant une densité vasculaire hétérogène. On a donc une hyperperméabilité provoquée par une maturation vasculaire incomplète (péricytes sont absents) et entraînant un flux sanguin irrégulier (hypoxie). Ces vaisseaux néoformés sont sous la dépendance du VEGF.

Formation de neovaisseaux



2) Le VEGF comme cible thérapeutique

On a pu identifier plus de 300 inhibiteurs de l'angiogenèse et en développer 80 en étude clinique (investissement de 4 milliards de dollars).

Pourquoi viser la vascularisation plutôt que la tumeur ?

Toutes les tumeurs solides sont angiogenèse-dépendantes : pas de spécificité en fonction du type tumoral. Cette stratégie est donc plus universelle. De plus les cellules endothéliales sont normales, génétiquement stables, ce qui diminue le risque d'apparition de résistance.

Comment viser la vascularisation de la tumeur ?

Il faut atteindre spécifiquement les cellules endothéliales et discriminer entre la vascularisation normale et la vascularisation tumorale EC normalement quiescentes (0,01% sont en division). Les néovaisseaux sont immatures, le recouvrement par les cellules péri-endothéliales incomplet. Le VEGF-R et les intégrines $\alpha\beta 3$ sont faiblement exprimés dans endothélium quiescent (switch).

Quels sont les objectifs de la thérapie anti-VEGF ?

On cherche d'une part à inhiber la croissance des néovaisseaux tumoraux et de l'autre à normaliser la vascularisation tumorale, avec une restauration de la perméabilité et une meilleure vascularisation intra-tumorale pour mieux diffuser les agents anti-cancéreux.

Quels sont les avantages théoriques de la thérapie anti-VEGF ?

Tout d'abord elle est sélective (agit uniquement sur les néovaisseaux), or l'angiogenèse physiologique est faible chez l'adulte, ensuite elle agit à tous les stades de la carcinogénèse, elle a une activité potentielle dans tous les types de tumeurs, on peut l'associer avec d'autres anti-cancéreux, et enfin il n'y a pas de résistance du fait de la stabilité génétique des cellules endothéliales. Elle a comme inconvénients son effet non cytotoxique et des problèmes de cicatrisation et de toxicité (AVC, HTA, hémorragie).

La thérapie ciblant les VEGF la plus connue est l'Avastin TM (ou bevacizumab) qui est le premier anticorps monoclonal anti-VEGF. Il est à 93% humain et à 7% murin, qui lui permet de ne pas engendrer de réponse immunitaire chez l'homme. Il a une durée de demi-vie de 17-21 jours ce qui permet d'espacer les cures toutes les 3 semaines. Il existe en France une AMM pour l'Avastin dans le cadre du cancer colorectal métastatique. En association avec une chimiothérapie classique on a un gain de 1 an de survie globale.

Il a néanmoins des effets secondaires comme une perforation de la cloison nasale et un infarctus splénique.

On a différentes thérapies anti-angiogéniques actives soit en extra (anticorps monoclonaux anti intégrine, anti facteur de croissance tumorale) soit en intra cellulaire (inhibiteur tyrosine kinase ..). Il est très important et bénéfique de réaliser des associations entre ces thérapies car en ciblant une seule cible, par exemple avec seulement un anti VEGF on va normaliser la vascularisation autour de la tumeur ce qui va entraîner la mort des cellules tumorales entraînant une nécrose et une hypoxie et pouvant faire « peter » (de façon imagée) les vaisseaux à l'extérieur.

Contrairement au cas du cancer du sein avec surexpression de HER2, seul cas où le Trastuzumab est réellement utile, même quand le VEGF n'est pas surexprimé, il participe à l'angiogenèse tumorale donc l'Avastin a une activité potentielle dans tous les cancers.

III- Thérapie ciblée et mélanome.

1) Mélanome

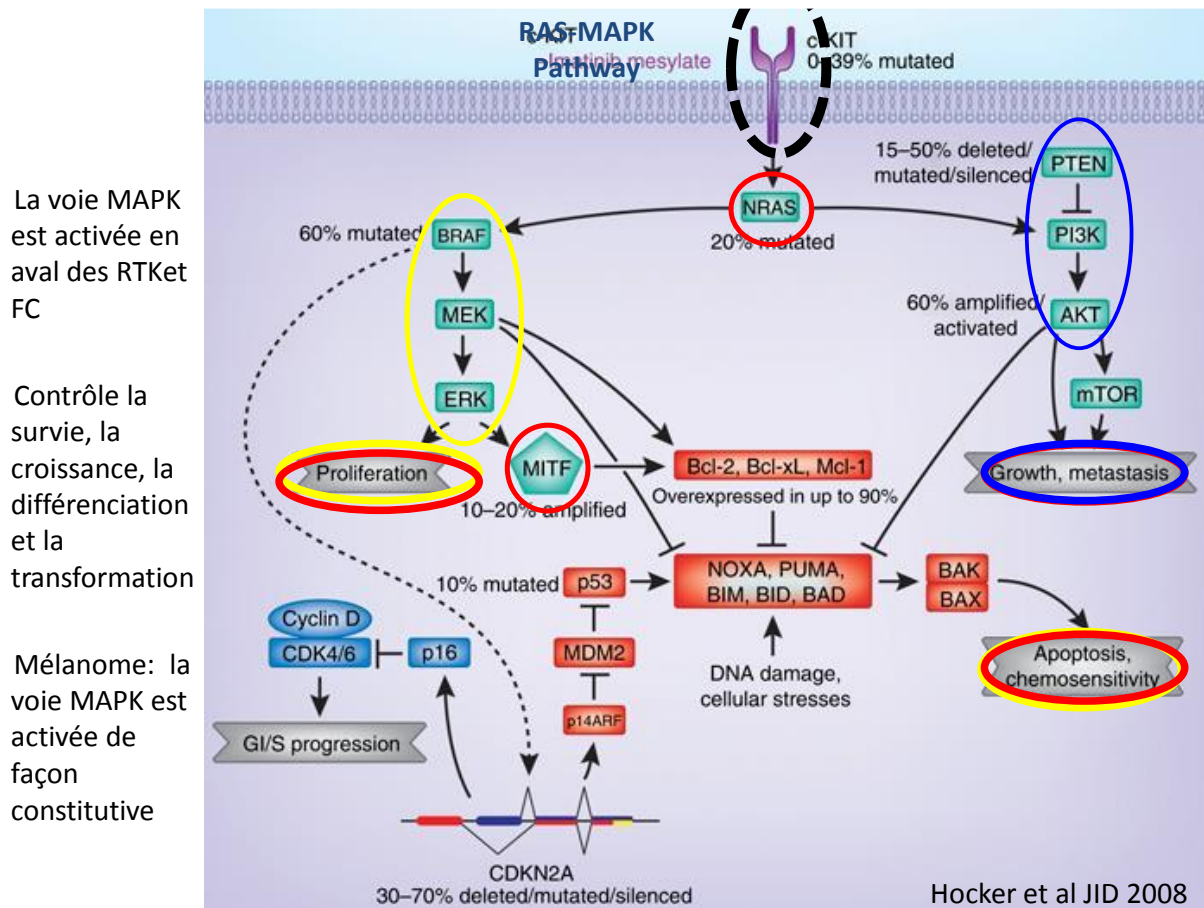
Le mélanome est le cancer cutané le plus grave en raison de son potentiel métastatique élevé et de son mauvais pronostic. Il est très complexe. 8000 nouveaux cas par an en France et il est résistant au traitement (à la chimio, à la radio). La majorité des mélanomes sont cutanés mais 20% touchent les muqueuses.

Cependant on trouve différentes mutations qui représentent autant de cibles potentielles.

La voie MAPK contrôle la survie, la croissance, la différenciation et la transformation
Mélanome: la voie MAPK est activée de façon constitutive

BRAF (une kinase impliquée dans le voie de MEK/ERF (survie et prolifération)) est mutée dans près de la moitié des mélanomes et NRAS est mutée dans 20% des cas. Ces deux mutations sont exclusives : on ne peut pas avoir l'une si on a l'autre. On a aussi des mutations de PTEN et de AKT, ou encore de c-KIT (ce dernier étant impliqué dans les mélanomes muqueux, des extrémités et ceux compliqués par le soleil).

92,5% des mutations de BRAF ont lieu sur le codon 600 et consistent en une valine transformée en glutamate, qui résulte en une activation constitutive.



2) Méthode de mise au point des nouvelles thérapies

Pour inhiber la voie MAPK, BRAF est une cible potentielle.

On cherche donc des inhibiteurs de BRAF, ou des BRAFi, capables de se nicher dans le site catalytique de BRAF. On utilise des chimio-tech pour la modélisation in silico avec un logiciel qui teste des millions de molécules pour chercher des candidats potentiellement capables de se loger dans la poche ATP. On réalise ensuite un kinome qui teste les différentes molécules régissant avec BRAF ainsi qu'avec de nombreuses autres kinases afin de trouver la molécule qui réagit le plus avec BRAF et le moins avec les autres kinases. On teste ensuite in vitro puis in vivo.

On a trouvé ainsi le PLX4032 ou Vemurafenib (suffixe ib = petite molécule dans le site catalytique). Les essais cliniques ont montré que cette molécule agit beaucoup mieux si ce n'est exclusivement sur les mélanomes présentant la mutation de BRAF V600E que sur des souris wild type porteuses de tumeurs quelconque.

Pour la première fois un traitement obtient un taux de réponse positive supérieur à 50% avec une durée de survie d'environ 7 mois.

3) L'Institut National du Cancer

En 2009 l'Institut National du Cancer (INC) a mis au point un plan cancer pour assurer l'équité d'accès à l'innovation et aux thérapies ciblées pour tout le territoire, métropole et DOM/TOM, en proposant des tests moléculaires de haute qualité pour les leucémies, tumeurs (nécessaires à certaines thérapies ciblées qui ne fonctionnent qu'en présence de mutations particulières, 28 plateformes ont donc été mises en place avec la coopération multidisciplinaire des biologistes, des pathologistes et des oncologues.

La demande de génotypage est contrôlée, les dossiers sont analysés, les patients sont contrôlés les uns après les autres, de la, l'oncologue ou le clinicien fait une demande de RCP pour un génotypage pour un patient, l'anapath reçoit le prélèvement tumoral puis celui-ci envoie la tumeur avec sa fiche au laboratoire réalisant le génotypage. Enfin, après analyse, le labo envoie à l'anapath et au clinicien dans les 7 jours. **Cette procédure est valable pour toutes les tumeurs dès lors qu'il faut un ciblage thérapeutique.**

IV-Mécanisme de résistance aux inhibiteurs de BRAF dans le mélanome

Le vemurafenib (ou PLX4032) est efficace dans près de 50% des mélanomes, c'est-à-dire dans les mélanomes métastatique portant des mutations BRAF.

Cependant, la thérapeutique mise en place fonctionne de façon variable, certains patients rechutent assez rapidement. Cela est dû à des mécanismes de résistance spécifiques à chaque pathologie. De nombreux mécanismes de résistances ont été mis en évidence notamment à l'émergence de cellules tumorales résistantes aux BRAFi :

-quand BRAF est inhibé, la voie COT vient phosphoryler MEK, qui est en aval de BRAF dans la voie BRAF/MEL/ERK

-switch des kinases : la voie CRAF/ARAF prend le relais sur BRAF (il suffit d'une seule isoforme active de RAF pour activer la voie) .

-mutation des protéines en aval : MEK activé constitutivement sans la régulation de BRAF

-activation de RTK ou N-RAS par PDGFR qui active la prolifération et la survie cellulaire

-switch IGF-1R/PI3K qui active uniquement la survie cellulaire

-augmentation du nombre de copies d'ADNg de BRAFV600E

L'environnement participe aussi à la prolifération de la tumeur, ainsi les mécanismes peuvent aussi jouer sur la sécrétion des facteurs de croissance par la matrice extracellulaire.

V- Immunothérapie anti-tumorale

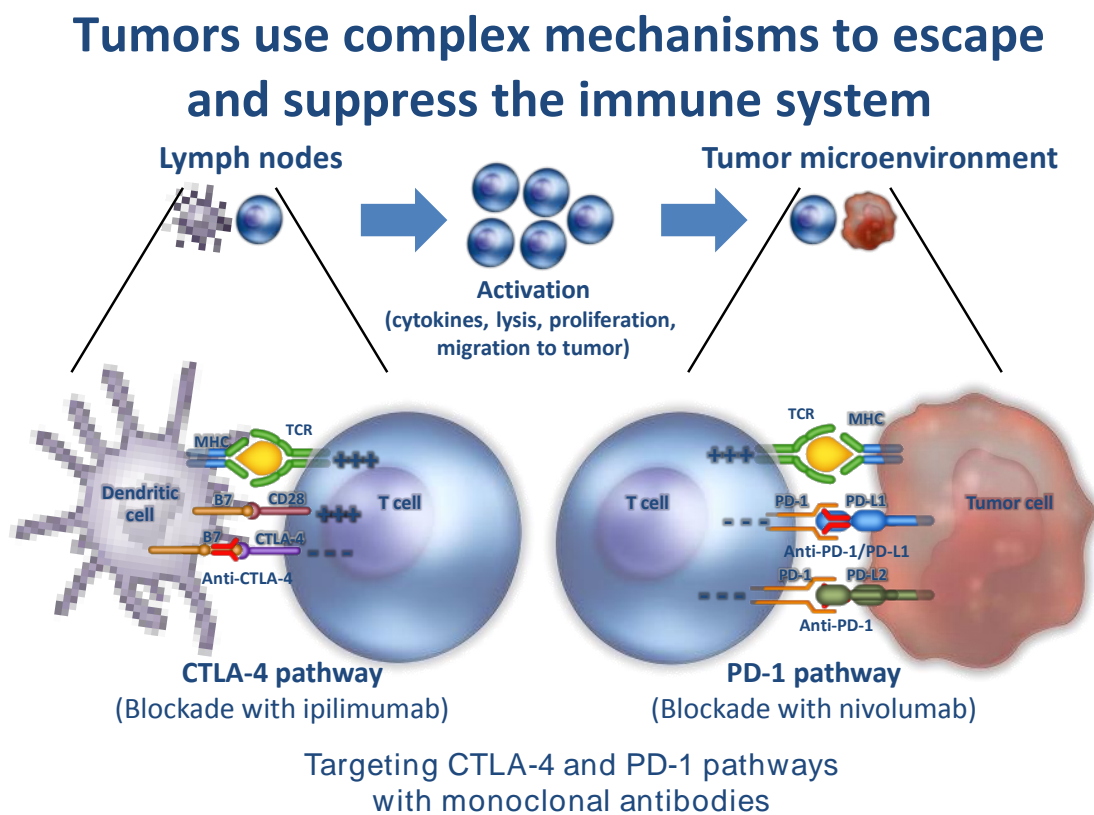
Ont révolutionné le traitement des cancers.

Les cellules tumorales produisent des antigènes tumoraux qui vont être reconnu par un lymphocyte T inactif, cela va les activer et donc lorsqu'ils vont rencontrer la cellule tumorale ils vont être capables de la détruite par cytotoxicité.

Cependant les cellules tumorales sont capables d'endormir tout ce système, par 2 biais :

-par le recepteur CTLA-4 porté par les LT, est reconnu par les cellules dendritiques, en effet par le contact dendritique/LT, la cellule LT va être endormie. Sachant que les cellules tumorales favorisent l'expression du recepteur CTLA-4, on comprend qu'elles favorisent l'inactivation des LT indirectement.

- par le recepteur PD-1 porté par les LT, et le ligand PD-L1 ou PD-L2 porté par la cellule tumorale, lors de cette association la cellule tumorale inactive LT.



CTLA-4 = cytotoxic T-lymphocyte antigen-4; MHC = major histocompatibility complex; PD-1 = programmed cell death 1; PD-L1 = programmed cell death ligand-1; TCR = T-cell receptor. Adapted from Pardoll DM. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:252–264.

D'où la naissance d'une hypothèse en voulant inhiber le récepteur CTLA-4 et PD-1 pour réactiver le système immunitaire -> naissance d'un médicament, l'Ipilimumab (ou l'Ipi). Cela entraîna de grand progrès dans la recherche contre le cancer puisque de nombreuses études montrèrent la nette augmentation de survie des patients atteint par des tumeurs.

Conclusion :

Les thérapies ciblées ont montré leur efficacité ces dernières années mais elles ont quand même l'inconvénient d'engendrer le plus souvent des résistances ou d'être réversible.

L'immunothérapie (anti-PD-1+ anti CTLA-4), contrairement aux thérapies ciblées, entraîne des réponses de très longue durée. Peu de rechutes sont observés.

Avec l'association entre thérapie ciblée et l'immunothérapie, on observe le plus de réponse positive et le moins de rechute.

Le challenge d'aujourd'hui est de savoir quel traitement est adapté pour qui, et pour combien de temps.