



HAL
open science

Analyse moléculaire, enjeux et limites des thérapies ciblées en oncologie : extension des sensibilités aux anti-PARP dans les cancers ovariens par caractérisation de variants non annotés et nouveaux mécanismes de résistance dans les cancers bronchiques.

Amandine Billaud

► **To cite this version:**

Amandine Billaud. Analyse moléculaire, enjeux et limites des thérapies ciblées en oncologie : extension des sensibilités aux anti-PARP dans les cancers ovariens par caractérisation de variants non annotés et nouveaux mécanismes de résistance dans les cancers bronchiques.. Cancer. Université d'Angers, 2020. Français. NNT : 2020ANGE0003 . tel-03765293

HAL Id: tel-03765293

<https://theses.hal.science/tel-03765293v1>

Submitted on 31 Aug 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Cancérologie

Par

Amandine BILLAUD

Analyse moléculaire, enjeux et limites des thérapies ciblées en oncologie :
extension des sensibilités aux anti-PARP dans les cancers ovariens par caractérisation
de variants non annotés et nouveaux mécanismes de résistance dans les cancers
bronchiques.

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 30 Janvier 2020

Unité de recherche : Laboratoire d'oncogénétique de l'ICO Paul Papin, CRCINA INSERM U1232, Equipe 7

Rapporteurs avant soutenance :

Erick Gamelin Professeur, ELAC Therapeutics à North Hollywood
Dominique Stoppa-Lyonnet Professeur d'Université, Institut Curie de Paris

Composition du Jury :

Président (*à préciser après la soutenance*)
Prénom Nom Fonction et établissement d'exercice

Mario Campone Professeur d'Université, Institut de Cancérologie de l'Ouest
Isabelle Soubeyran Praticien spécialiste CLCC, Institut Bergonié de Bordeaux
Isabelle Tournier Maître de conférence d'Université, Université de Rouen Normandie
Dominique Vaur Praticien spécialiste CLCC, Centre François Baclesse de Caen

Directeur de thèse
Alain Morel Professeur d'Université, Institut de Cancérologie de l'Ouest

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>



A mon directeur de thèse

J'adresse mes plus sincères et respectueux remerciements au Pr Alain Morel, mon directeur de thèse. Je vous suis extrêmement reconnaissante pour la confiance que vous m'avez accordée au cours de ces années ainsi que pour toutes les heures passées à diriger ce travail. Votre disponibilité et votre bienveillance ainsi que les nombreuses discussions que nous avons eues ont été une source d'inspiration pour la poursuite de ma carrière scientifique.

Aux membres du jury

Je remercie le Pr Mario Campone, directeur de l'Institut de Cancérologie de l'Ouest, de m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse il y a trois ans et d'accepter aujourd'hui de participer à son évaluation.

Je remercie le Pr Erick Gamelin et le Pr Dominique Stoppa-Lyonnet d'avoir accepté, en tant que rapporteurs, de consacrer de leur temps à évaluer ce travail et de juger la qualité de mon manuscrit.

Je remercie de même le Dr Isabelle Soubeyran, le Dr Isabelle Tournier et le Pr Dominique Vaur d'avoir accepté de faire le déplacement pour faire parti de mon jury de thèse et d'examiner mon travail.

A l'équipe du laboratoire d'oncogénétique de l'Institut de Cancérologie de l'Ouest

Je remercie le Dr Louise-Marie Chevalier pour ses conseils et son soutien. Merci également d'avoir pris le temps de relire ce travail. Je remercie Jonathan, Luc, Sabrina, Adélaïde et toute l'équipe du laboratoire d'oncogénétique de l'ICO, je suis ravie d'avoir travaillé en votre compagnie. Votre bonne humeur, votre gentillesse et votre aide aux cours de ces trois années m'ont été d'un grand soutien.

A l'équipe 7 de l'unité CRCINA INSERM U1232

Je remercie le Dr Yves Delneste, responsable de l'équipe, ainsi que tous ses membres. Malgré les visites ponctuelles, vos nombreux conseils lors de mes présentations et des différentes réunions de laboratoire m'ont été très précieux et ont apporté un nouveau regard sur mes travaux.

Je remercie également le Dr Sophie Barillé et le Dr Christophe Fremin qui ont tous deux accepté de participer à mes comités de suivi de thèse. Les conseils conférés lors de ces présentations ont été sources de motivation.

Je remercie également les membres de l'équipe du Pr Olivier Coqueret parmi lesquels j'ai évolué lors des différentes expérimentations réalisées. Merci à Bertrand, Alice, Cécile, Mélanie, Coralie, Amine, Raneem, Julie, Anne et à tous les autres pour tous les bons moments partagés. Merci tout particulièrement à Jordan, mon camarade de thèse pour son soutien sans faille, courage nous y sommes presque !

A mes amis et ma famille

Merci à mes amis pour les rires et les délires partagés qui permettent de se changer les idées et de repartir remotiver. Enfin, merci à ma famille si importante pour moi. Merci à mes parents, Dominique et Christian, et à mes frères, Pierre et Thomas sans qui rien n'aurait été possible.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS.....	2
INTRODUCTION.....	4
1. Instabilité génétique et hétérogénéité mutationnelle : le développement des thérapies ciblées	6
1.1. Instabilité génétique, cause et conséquence de la tumorigénèse	6
1.1.1. Caractéristiques essentielles de la cellule tumorale.....	6
a) Découverte des oncogènes et suppresseurs de tumeur.....	6
b) Acquisition séquentielle de différentes propriétés essentielles à la tumorigénèse	7
1.1.2. Origines de l'instabilité génétique tumorale	8
a) Agents mutagènes endogènes et exogènes.....	8
b) Mécanismes de réparation de l'ADN et cancers.....	9
1.2. L'instabilité génétique, actrice de l'hétérogénéité tumorale.....	10
1.2.1. Accumulation d'anomalies génétiques et diversité mutationnelle	10
a) Notion de drivers et de passagers.....	10
b) Principaux oncogènes et suppresseurs de tumeurs en oncologie solide	10
c) Autres types d'anomalies génétiques	12
1.2.2. Une hétérogénéité tumorale à la fois spatiale et temporelle.....	12
a) Sélection clonale et hétérogénéité intratumorale	12
b) Hétérogénéité intertumorale	13
c) Hétérogénéité spatiale et temporelle.....	14
1.3. Thérapies ciblées et évolution vers une médecine personnalisée	15
1.3.1. Emergence des thérapies ciblées	15
a) Notions d'oncogénétique et de médecine personnalisée	15
b) Début des thérapies ciblées et évolution.....	16
1.3.2. Addiction oncogénique et létalité synthétique : les thérapies ciblées reposent sur différents principes 17	
a) Addiction oncogénique	17
b) Létalité synthétique.....	17
2. Addiction oncogénique et prescription des ITK dans les cancers du poumon non à petites cellules	19
2.1. Cancers bronchiques et thérapies ciblées.....	19
2.1.1. Place des CBNPC et caractéristiques.....	19
a) Les cancers bronchiques, généralités et épidémiologie	19
b) Différents types de cancers bronchiques.....	20
c) Hétérogénéité mutationnelle des CBNPC.....	20
2.1.2. Thérapies ciblées dans les CBNPC.....	21
a) Explosion du paysage thérapeutique dans les CBNPC	21
b) Les inhibiteurs spécifiques de l'EGFR.....	22
2.2. ITK-EGFR : cibles et mécanismes d'action.....	23
2.2.1. Le récepteur au facteur de croissance épithélial	23
a) Structure du récepteur.....	23
b) Mécanisme d'activation du récepteur	24
c) Activation des voies de signalisation	26
d) Régulation de l'activation et renouvellement du récepteur	26
2.2.2. Les ITK-EGFR contre l'activation constitutive oncogénique	27
a) Activation constitutive et mutations activatrices	27
b) Sensibilité aux ITK-EGFR.....	28
2.3. Résistance acquise aux ITK-EGFR	30
2.3.1. Résistance innée ou acquise ?	30
a) Résistance primaire aux ITK-EGFR.....	30
b) Résistance acquise : sélection clonale ou nouvelles mutations ?.....	31

2.3.2.	EGFR, acteur majeur de la résistance acquise « on-target »	32
a)	Mutations secondaires de l'EGFR	32
b)	Surexpression du récepteur	33
2.3.3.	Changement d'addiction oncogénique et résistance « off-target »	34
a)	Amplifications et changements d'addiction oncogénique	34
b)	Mutations ponctuelles et apparition de nouveaux drivers oncogéniques	34
c)	Changement du phénotype des cellules	36
2.3.4.	Résistance acquise aux ITK de troisième génération	37
3.	Létalité synthétique, prescription des inhibiteurs de PARP dans les cancers	
ovariens	40
3.1.	BRCA1 et BRCA2 dans les cancers de l'ovaire	40
3.1.1.	HGSOC et mutations de BRCA1/2	40
a)	Généralités sur le cancer de l'ovaire.....	40
b)	Profil mutationnel des HGSOC.....	41
c)	Mutations germinales de BRCA1 et BRCA2	42
d)	Une perte d'hétérozygotie essentielle ?	43
3.1.2.	Rôles de BRCA1 et BRCA2	44
a)	Recombinaison homologue : mécanismes et implications de BRCA1/2	44
b)	BRCA1, médiateur de la recombinaison homologue et autres rôles multiples	46
c)	BRCA2 : effecteur de la recombinaison homologue	48
3.2.	iPARP : mécanismes d'action et mise au point des inhibiteurs	49
3.2.1.	Rôles des membres de la famille PARP	49
a)	La PARylation, actrice de la signalisation cellulaire	50
b)	Rôle capital de PARP dans la réparation des CSB	50
c)	Implication des PARP dans le contrôle de la fourche de réplication	51
3.2.2.	Les iPARP en clinique, premières thérapies basées sur la létalité synthétique	51
a)	Apparition des iPARP et mécanismes d'action	51
b)	Les différentes molécules inhibitrices de PARP en clinique	53
3.3.	Limites actuelles des iPARP et champs d'investigation.....	55
3.3.1.	BRCAness : un challenge pour l'identification et le diagnostic	55
a)	Définition de BRCAness.....	55
b)	Hyperméthylation du promoteur de BRCA1	55
c)	BRCAness par analyse moléculaire de gènes individuels	56
d)	Signature transcriptionnelle et BRCAness	57
e)	HRD et signature mutationnelle : une évolution rapide	57
f)	Autres biomarqueurs fonctionnels de la recombinaison homologue.....	59
3.3.2.	Mécanismes de résistance aux iPARP.....	60
a)	Modification de la disponibilité du traitement.....	60
b)	Reprise de l'activité de la recombinaison homologue	61
c)	Diminution du piégeage de PARP1	62
d)	Stabilisation de la fourche de réplication.....	62
3.3.3.	VSI de BRCA1/2 : CRISPR-Cas9 pour la mise en place d'un test fonctionnel	63
a)	VSI de BRCA1 et BRCA2.....	63
b)	Méthodes actuelles de caractérisation fonctionnelle des VSI	64
c)	Edition génomique via la technologie CRISPR-Cas9	65

OBJECTIFS DE LA THESE 68

RESULTATS 70

1. Amélioration de la détection des mutations de l'EGFR dans les CBNPC et nouveaux mécanismes de résistance acquise, étude des enjeux actuels des ITK-EGFR..... 72

Article 1: Caractérisation moléculaire de l'EGFR dans les cancers bronchiques non à petites cellules : étude prospective comparative des technologies NGS et automate Idylla.	72
1.1.1. Résultats de l'article 1	93
1.1.2. Discussion de l'article 1	93

Article 2: A pre-amplification step enhances detection sensitivity of EGFR T790M mutation by PNA-clamping PCR and pyrosequencing	95
1.1.3. Résultats de l'article 2	104
1.1.4. Discussion de l'article 2	104
Article 3 : TBK1, voie de résistance aux ITK-EGFR : vers une nouvelle combinaison thérapeutique dans les CBNPC	108
1.1.5. Résultats de l'article 3	124
1.1.6. Discussion de l'article 3	124
Conclusion générale de la partie 1	127
2. Caractérisation fonctionnelle des variants de signification inconnue de BRCA1/2 dans les cancers ovariens, vers une extension des indications thérapeutiques des iPARP.	128
Article 4: Somatic mRNA analysis of BRCA1 splice variants provides a direct theranostic impact on PARP inhibitors	128
1.1.1. Résultats de l'article 4	147
1.1.2. Discussion de l'article 4	147
Article 5: Clinically applicable classification of variants of uncertain significance from essential tumor suppressor genes by CRISPR-Cas9 genome editing	149
1.1.3. Résultats complémentaires	150
1.1.4. Résultats de l'article 5	179
1.1.5. Discussion de l'article 5	179
Conclusion générale de la partie 2	183
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	186
BIBLIOGRAPHIE	193
TABLE DES FIGURES	214
TABLE DES TABLEAUX.....	216

Liste des abréviations

- AA** : Acides aminés
- ADN** : Acide désoxiribonucléique
- ADNct** : ADN circulant tumoral
- ADNsb** : ADN simple brin
- ADP-ribose** : Adénosine diphosphate ribose
- AMM** : Autorisation de mise sur le marché
- ARH** : ADP-ribosyl hydrolase
- ARN** : Acide ribonucléique
- ARNg** : ARN guide
- ARNm** : ARN messagers
- ATP** : Adénosine 5'-Triphosphate
- ATU** : Autorisation temporaire d'utilisation
- BER** : *Base excision repair*, réparation par excision de base
- BRCA1** : *Breast cancer associated gene 1*
- BRCA2** : *Breast cancer associated gene 2*
- CAF** : *Cancer associated fibroblast*, fibroblastes associés au cancer
- Cas9** : *CRISPR-associated 9*
- CBNPC** : Cancers bronchiques non à petites cellules (ou *NSCLC*)
- CBPC** : Cancer bronchique à petites cellules (ou *SCLC*)
- CDB** : Cassures doubles brins
- CIMBA** : *Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2*
- CIN** : *chromosomal instability*, instabilité chromosomique
- CRISPR** : *Clustered regulatory interspaced palindromic repeats*
- crRNA** : *CRISPR RNA*
- CSB** : Cassures simples brins
- CtIP** : *CtBP Interacting protein*
- DBD** : *DNA binding domain*, domaine de liaison à l'ADN
- DDR** : *DNA Damage response*, réponse aux dommages de l'ADN
- DR** : *Direct reparation*, reparation directe
- DTK** : Domaine tyrosine kinase
- EGF** : *Epidermal growth factor*, facteur de croissance épithélial
- EGFR** : *Epidermal growth factor receptor*, récepteur au facteur de croissance épithélial
- EMT** : *epithelio-mesenchymal transition*, transformation épithélio-mésenchymateuse
- ENOC** : *Endometrioid ovarian cancer*
- ENU** : N-éthyl-N-nitrosurée
- ER** : Récepteur à l'estrogène

FFPE : *formalin-fixed paraffin embedded*

GSEA : *Gene Set Enrichment Analysis*

HRD : *homologous recombination deficiency*, défaut de recombinaison homologue

HGSOC : *High grade serous ovarian cancer*, cancer ovarien séreux de haut grade

IACR : *International Association of Cancer Registries*

iPARP : Inhibiteurs de PARP

ITK-EGFR : Inhibiteur de tyrosine kinase ciblant l'EGFR (ou *TKI*)

LOH : *Loss of heterozygoty*, perte d'hétérozygotie

MMR : *Mismatch repair*, réparation des mésappariements

MRN : complexe protéique comprenant MRE11, RAD50 et NBS1

NER : *Nucleotide excision repair*, réparation par excision de nucléotide

NGS : *next generation sequencing*, séquençage de nouvelle génération

NHEJ : *Non-homologous end joining*, réparation des extrémités non homologues

NK : *Natural Killer*

NTP : Nucleotide triphosphate

OB domain : *Oligonucleotid binding domain*

PAM : *protospacer adjacent motif*

PARG : polyADP-ribose glycohydrolase

PARP : polyADP-ribose polymérase

PCR : *polymerase chain reaction*, réaction de polymérisation en chaîne

PNA : *Peptid nucleic acid*, acides nucléiques peptidiques

PTB : *Phosphotyrosin Binding*, liaison aux tyrosines phosphorylées

PTP : Protein Tyr-specific phosphatase

RA : Résistance acquise

RH : Recombinaison homologue (ou *HR*)

ROS : *Reactive oxygen species*, réactifs oxygénés

RPA : *Replication protein A*

RSV : *Rous sarcoma virus*

RTK : Récepteur tyrosine kinase (ou *TKR*)

SCD : SQ/TQ cluster domain

SDSA : *Synthetic dependant strand annealing*

SNP : *Single nucleotide polymorphism*

SSBR : *Single-stranded break repair*

SH2 : *Src Homology structure*

TBK1 : *Tank binding kinase 1*

TD : *Tower domain*

tracrRNA : *transactivating CRISPR RNA*

VSI : variant de signification inconnue (ou *VUS*)

Introduction

1. Instabilité génétique et hétérogénéité mutationnelle : le développement des thérapies ciblées

La cellule présente une machinerie complexe assurant sa prolifération, sa différenciation et sa mort. Cette régulation fine dépend de l'intégrité de son génome, expliquant sa stabilité à travers l'évolution et la présence de régions hautement conservées entre les différentes espèces. Le génome humain est ainsi répliqué avec une haute fidélité, le taux d'incorporation de mutations ponctuelles n'étant que de 0.77×10^{-9} par site tandis que les erreurs de ségrégation des chromosomes sont rares (1/100 divisions).¹ C'est pourtant la perte de cette intégrité qui va être l'origine du développement tumoral. Connue depuis l'Antiquité, le cancer reste aujourd'hui un problème de santé publique majeur, cause principale de mortalité avant 70 ans dans 91 pays sur 172.^{2,3} Chaque année dans le monde, 18.1 millions de nouveaux cas et 9.6 millions de décès sont dénombrés. Ces nombres sont d'ailleurs appelés à augmenter en raison d'un vieillissement général de la population et d'une exposition croissante aux carcinogènes. Récemment, des progrès technologiques et thérapeutiques majeurs ont été réalisés permettant une meilleure compréhension des caractéristiques des cellules tumorales et des traitements pouvant y être associés.

1.1. Instabilité génétique, cause et conséquence de la tumorigénèse

1.1.1. Caractéristiques essentielles de la cellule tumorale

a) Découverte des oncogènes et suppresseurs de tumeur

Les premières altérations génomiques caractérisées ont déterminé deux grandes classes de gènes dont les mutations favorisent le développement tumoral. L'identification du virus du sarcome de Rous (RSV) en 1908 donne une première définition des proto-oncogènes viraux. Il faut cependant attendre les années 70 pour que l'origine exclusivement virale des tumeurs ne soit remise en question grâce à la découverte d'une mutation ponctuelle de HRAS, le convertissant en oncogène et favorisant la prolifération tumorale.⁴ L'étude des rétinoblastomes, tumeurs infantiles de l'œil, et de RB1 permet ensuite la découverte des gènes suppresseurs de tumeur.⁵ Les oncogènes entraînent donc un gain de fonction et les suppresseurs de tumeur, au contraire, une perte de fonction.⁶ Cependant, ils ne permettent pas d'expliquer l'ensemble de la biologie tumorale. En effet, la seule présence des oncogènes HRas ou c-Myc ne suffit pas à induire la transformation de cellules primaires embryonnaires de rat et conduit plutôt à un arrêt du cycle.⁷ Ainsi, en 1982, Berenblum démontre l'évolution séquentielle de la transformation en cellule maligne.⁸ Ce processus est considéré comme analogue au principe de l'évolution darwinienne avec une succession d'altérations conférant un avantage prolifératif à la cellule. La carcinogénèse n'est donc pas un dysfonctionnement d'une voie précise mais plutôt une déstabilisation progressive des processus clés entraînant, à terme, un dépassement des défenses de la cellule.⁹ En 1993, Renan démontre que ce sont bien 4 à 7 éléments différents qui sont impliqués dans cette transformation tumorale.¹⁰

b) Acquisition séquentielle de différentes propriétés essentielles à la tumorigénèse

En ce sens, Weinberg et Hanahan décrivent en 2000 puis complètent en 2011, huit propriétés essentielles à la physiologie de la cellule tumorale.^{6,11} La première décrite reflète la prolifération chronique des cellules cancéreuses, caractéristique fondamentale, il s'agit du maintien des signaux prolifératifs par les oncogènes. En parallèle, la deuxième est donc l'échappement aux suppresseurs de tumeur, la plupart de ces signaux étant liés à une perturbation du cycle cellulaire. La résistance à la mort cellulaire est également une propriété essentielle, puisque la croissance des tumeurs dépend de la prolifération mais aussi de l'inhibition de la mort. Ceci peut être favorisé par la perte de régulateurs pro-apoptotiques (50% des tumeurs sont mutées TP53) ou encore de l'autophagie, de la nécrose. A cela, s'ajoute un potentiel de réplication illimité, contournant la limite de Hayflick qui marque l'entrée en sénescence répliquative des cellules suite à l'érosion progressive des télomères.¹² Les cellules tumorales sont immortalisées par leur maintien, en augmentant l'expression de la télomérase (85/90% des cellules tumorales) ou par échanges inter-chromosomiques. L'angiogénèse est la cinquième propriété décrite, une sortie de quiescence vasculaire est d'ailleurs observée avec génération de nouveaux vaisseaux promouvant le développement tumoral. Autres capacités acquises, l'invasion et la formation de métastases correspondent à la colonisation des sites distants dans lesquels les nutriments et l'espace ne sont pas limitants, impliquant des molécules d'adhésion entre cellules ou à la matrice ainsi que des protéases. Cette invasion métastatique intervient à un stade plutôt avancé du développement tumoral, stade auquel 90% des morts liés au cancer sont retrouvés.¹³ Une reprogrammation du métabolisme énergétique est également nécessaire au support de la croissance et de la prolifération, c'est l'effet Warburg.¹⁴ Avantageuse en conditions hypoxiques, la glycolyse est alors favorisée et soutenue par une augmentation de l'expression des transporteurs de glucose ainsi que des enzymes intervenant, bien qu'elle soit 18 fois moins efficace au niveau de la production d'ATP que la phosphorylation oxydative mitochondriale. La dernière caractéristique acquise par les cellules tumorales est l'échappement au système immunitaire. Ces huit propriétés inhérentes à la cellule tumorale vont faire intervenir de multiples voies de signalisation et partenaires.

Le développement tumoral s'inscrit dans un cadre et un environnement précis démontrant l'importance du microenvironnement tumoral et de la communication cellulaire. L'acquisition de ces huit propriétés va donc être facilitée par deux attributs : l'instabilité génétique des cellules tumorales, que nous développerons par la suite, et le contexte inflammatoire.¹¹ En effet, outre son implication dans la promotion néoplasique, le système immunitaire est un acteur majeur dans les différents stades du développement tumoral, affectant directement la réponse aux thérapies.¹⁵ Les études génomiques prédisent la présence de dizaines de mutations simultanément or, 50% de ces altérations créent des néo-antigènes pouvant être détectés par les cellules immunitaires. De plus, l'utilisation des différentes thérapies conduit à une nécrose massive libérant des antigènes favorisant l'inflammation. Cependant, ces antigènes ne déclenchent pas toujours une réponse immunitaire suffisante à l'éradication du clone.¹⁶ A l'exception des Natural Killer (NK), l'ensemble des cellules immunitaires exerce à la fois des effets pro et anti-tumoraux. Les cellules immunitaires, majoritairement issues de l'immunité innée, pourvoient les

cellules tumorales en nombreuses molécules actives tels que les facteurs de croissance mais libèrent simultanément d'autres substances chimiques comme les réactifs oxygénés (ROS) qui renforcent l'instabilité génétique. La dualité des rôles pro-tumoraux et anti-tumoraux du système immunitaire est donc complexe, la balance entre les deux régissant le devenir de la tumeur.

De même, le microenvironnement tumoral ajoute un niveau de complexité à cette transformation. De par la multiplicité des voies de signalisation associées à l'interaction tumeur-environnement ainsi que les nombreux types de cellules impliqués dans la biologie tumorale et identifiés simultanément¹¹ (cellules cancéreuses et cellules souches cancéreuses, cellules endothéliales, péricytes, cellules immunitaires, fibroblastes...). Cette hétérogénéité soulève des interrogations quant au nombre de voies de signalisation altérées ainsi que sur l'autonomie ou, au contraire, la dépendance en signaux du microenvironnement. L'ensemble des propriétés décrites précédemment vont favoriser la survie et la multiplication des cellules tumorales. La prolifération anarchique résultante entretient et renforce l'instabilité génétique des cellules cancéreuses échappant alors totalement au contrôle des mécanismes de réparation.

1.1.2. Origines de l'instabilité génétique tumorale

a) Agents mutagènes endogènes et exogènes

L'instabilité génétique, caractéristique centrale de la transformation tumorale, résulte de la combinaison des dommages de l'ADN provoqués par des événements intra et extracellulaires et de l'incapacité de la cellule à les réparer favorisant leur accumulation. Les éléments exogènes stimulant l'apparition de dommages de l'ADN sont les rayons UV (10 000 lésions/cellule/jour, principalement des dimères de pyrimidines), le tabac (1000 lésions/cellule chez un fumeur à long terme), les xénobiotiques tels que produits chimiques industriels ainsi que la chimiothérapie ou la radiothérapie. Ces agents chimiothérapeutiques interviennent par l'intermédiaire de mécanismes différents^{17,18} : les sels de platine (carboplatine, cisplatine...) favorisant la formation de liaisons covalentes aberrantes entre les bases, les agents alkylants les bases nucléophiles (mitomycine C...), les anti-métaboliques bloquant la synthèse des acides nucléiques (pemetrexed, gemcitabine, fluorouracile...), les anti-mitotiques tels que les taxanes (paclitaxel, docetaxel...) qui altèrent les microtubules, les inhibiteurs de topoisomérases I (irinotécan, topotécan...) ou II (étoposide...) ou encore les anthracyclines inhibant la synthèse ADN (doxorubicine...).

Les éléments endogènes, quant à eux, comprenant les ROS générés entre autres par le métabolisme oxydant, les erreurs de réplication ainsi que les dépurinations ou déaminations spontanées liées aux propriétés chimiques de l'ADN. Ces processus endogènes, tous comme les éléments exogènes, sont mutagènes.¹⁸ La multiplicité des processus mutagéniques et la stabilité du génome humain dans le temps témoignent de l'importance des mécanismes de réparation de l'ADN qui assurent le maintien de l'intégrité du génome.

b) Mécanismes de réparation de l'ADN et cancers

La réponse aux dommages de l'ADN ou DDR (DNA Damage Response) repose sur plusieurs voies de signalisation distinctes, définies par le type de dommage qu'elles réparent (Tableau 1). La plupart suivent une même séquence d'événements très coordonnés comprenant la détection puis l'accumulation des effecteurs avant la réparation. Chaque mécanisme fait intervenir différentes protéines clés qui peuvent être des senseurs, des effecteurs ou encore des médiateurs. La DDR implique également l'activation de points de contrôles retardant le cycle cellulaire afin d'éviter la transmission des anomalies génétiques.

Tableau 1 : Principaux mécanismes de réparation de l'ADN associés aux localisations tumorales dans lesquels ils sont majoritairement impliqués.¹⁸

Mécanismes de réparation	Types de dommages	Protéines clés impliquées	Types de tumeur
Réparation par excision de base (BER)	Lésions oxydatives, produits d'alkylation, cassures simples brins	PARP1 et PARP2	
Réparation par excision de nucléotide (NER)	Cassures simples brins altérant la structure hélicoïdale de l'ADN (UV) Intervient pendant la transcription	ERCC1	Xeroderma pigmentosa
Jonction des extrémités non homologues (NHEJ)	Cassures doubles brins, lie les deux extrémités rompues donc entraîne des délétions et insertions Intervient dans toutes les phases du cycle.	KU70/80, DNAPK, LIG4	
Recombinaison homologue (RH)	Cassures doubles brins Intervient pendant les phases S et G2 Processus conservateur	BRCA1, BRCA2, RAD51, PALB2	Ovaire, pancréas, sein
Réparation des mésappariements (MMR)	Mauvaise incorporation de dNTP et formation de boucles d'insertion ou de délétion	MSH2, MLH1	Colorectal
Synthèse translésionnelle	Poursuite de la synthèse de l'ADN en présence de la lésion par des polymérase de faible fidélité	Polymérase de faible fidélité	
Complexe shelterin	Contrôle de l'intégrité des télomères empêchant leurs fusions	TERF1, TERF2, POT1, TIN2	
Réparation directe (DR)	Réparation des adduits de faible encombrement stérique tels que les méthylations des guanines	MGMT	Gliome

Ces différents mécanismes de réparation sont nécessaires au maintien de l'intégrité de l'ADN. Dans les cellules tumorales, l'inactivation des gènes impliqués dans la réparation n'est donc pas une réelle surprise, leur dysfonctionnement accentuant l'instabilité génétique. Les défauts des voies de réparation confèrent un avantage sélectif et sont un instrument de la progression tumorale facilitant l'acquisition des différentes capacités pro-tumorales mentionnées.¹¹ Certains types d'anomalies sont par ailleurs préférentiellement associés à des cancers. Ainsi, 15% des tumeurs colorectales sporadiques présentent une instabilité des

microsatellites liés à un dysfonctionnement de la réparation des mésappariements (MMR) et plus de 50% des adénocarcinomes ovariens séreux de haut grade sont liés à des anomalies de la recombinaison homologue. Ainsi, récemment, les analyses de 10 952 exomes et 1048 génomes dans 40 types de cancers ont permis la définition de 30 signatures mutationnelles, le dysfonctionnement d'un mécanisme de réparation laissant une empreinte particulière sur le génome.¹⁹⁻²²

Les propriétés tumorales mentionnées vont toutes dans le sens d'une survie et d'une prolifération chronique et anarchique des cellules cancéreuses, associées à une perturbation de l'ensemble des mécanismes protecteurs qui exacerbe leur instabilité génétique. En découlent, une augmentation de la diversité génétique et l'acquisition de nouvelles anomalies qui vont à leur tour venir renforcer les propriétés présentées, favorisant un auto-entretien et une évolution permanente de la tumeur ce qui expliquent sa capacité d'adaptation considérable.

1.2. L'instabilité génétique, actrice de l'hétérogénéité tumorale

1.2.1. Accumulation d'anomalies génétiques et diversité mutationnelle

a) Notion de drivers et de passagers

De l'instabilité génétique, résulte une accumulation de mutations dans les cellules tumorales. Ainsi, dans les tumeurs solides, 40 à 100 mutations peuvent être retrouvées simultanément au niveau des parties codantes des gènes mais seulement 5 à 15 vont réellement avoir un impact sur la biologie de la cellule tumorale.²³ Les mutations conférant un avantage prolifératif sélectif sont appelées drivers oncogéniques. Celles n'ayant pas d'impact sont appelées mutations passagers, elles sont sélectivement neutres ou provoquent un désavantage tels que la sénescence ou la mort.¹⁶ Ces dernières s'accumulent avec le temps expliquant pourquoi un cancer colorectal chez une personne âgée de 90 ans présentera deux fois plus de mutations qu'un cancer de même morphologie chez une personne de 45 ans. De même, les cancers du cerveau ou pédiatriques (9.6 mutations/cellule seulement) sont moins mutés.²⁴ De cette hétérogénéité mutationnelle découle une diversité des oncogènes et suppresseurs de tumeurs retrouvés dans les différents types de cancers.

b) Principaux oncogènes et suppresseurs de tumeurs en oncologie solide

Les progrès en matière de séquençage ont permis la mise en évidence de 138 gènes qui, une fois mutés, deviennent des drivers de la tumorigénèse dont 33 à 66 dans les tumeurs solides (Figure 1). Parmi ceux-ci, 74 sont des suppresseurs de tumeurs et 64 des oncogènes bien qu'une tumeur comprenne, le plus souvent, 2 à 8 mutations drivers simultanément.²⁴ Ces drivers sont principalement répartis (89% des tumeurs) en 10 voies de signalisation différentes : cycle cellulaire, Hippo, Myc, Notch, Nrf2, PI3K/Akt, RTK/Ras, TGF β , p53 et β -caténine/Wnt.²⁵

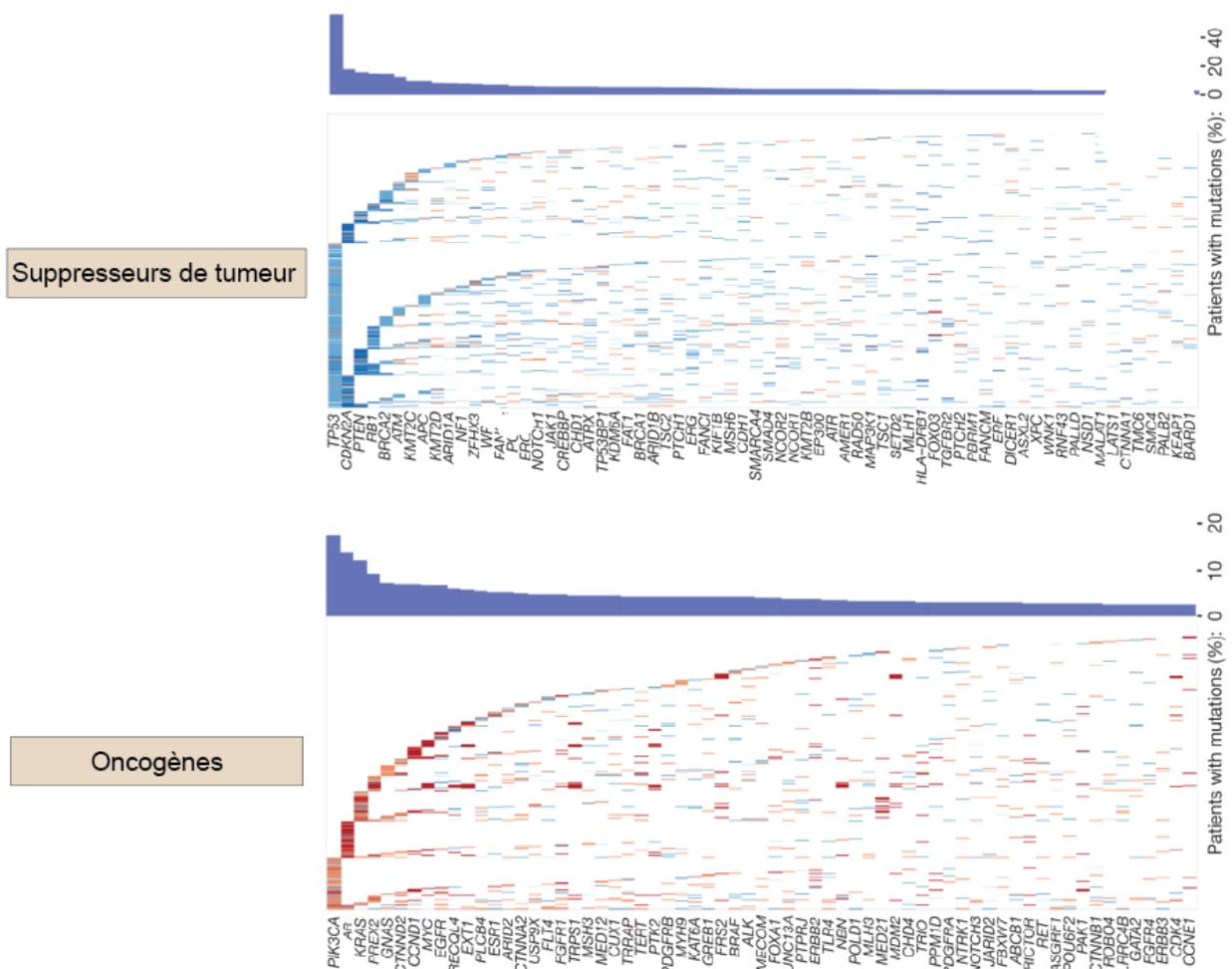


Figure 1 : Principaux supresseurs de tumeur et oncogènes identifiés dans les cancers solides métastatiques.²⁶

En 2017, Robinson et son équipe identifient, par DNA-seq et RNA-seq, les 5 gènes les plus fréquemment mutés dans les cancers métastatiques, sexes et origines confondus, en comparant ADN sain vs tumorale chez 500 patients : TP53 (53%), CDKN2A (16%), PTEN (15.8%), PIK3CA (13%) et RB1 (13.1%).²⁶ De plus, 12.2% des sujets présentaient également des mutations germinales dont 75% au niveau des gènes intervenant dans les voies de réparation de l'ADN (16% MUTYH, 14% BRCA2, 14% CHEK2, 8% BRCA1...), confirmant l'instabilité génétique accrue associée aux dysfonctionnements des mécanismes de réparation. Enfin, 95% de ces mutations sont des substitutions, les autres sont des délétions ou insertions. Dans cette cohorte, 92% des échantillons présentent moins de 500 mutations codantes par tumeur avec une moyenne de 119. Ce nombre est élevé puisqu'il s'agit ici de cancers métastatiques donc à un stade du développement tumoral avancé. Les 8% restants vont être considérés comme hypermutés. Cette hypermutation n'est pas synonyme d'une augmentation du nombre de driver dans la tumeur, la proportion du nombre de driver par rapport au nombre de passager étant diminuée. L'identification des drivers devient alors plus délicate.^{16,27} Ces tumeurs hypermutées peuvent être classées selon leur signature mutationnelle qui sont : APOBEC, l'exposition au tabac, MMR, mutation de l'ADN polymérase E ou encore exposition aux UV, syndrome de Lynch... Un dysfonctionnement de la réparation des mésappariements,

entraînant une forte instabilité microsatellitaire, comprend entre 10 et 100 mut/Mb, en cas de mutation des polymérase, ce taux peut dépasser les 100 mut/Mb. L'hypermutation semble être corrélée à une sensibilité aux anticorps bloquant les points de contrôle du cycle cellulaire mais la limite de distinction entre cancers hypermutés ou non reste difficile à déterminer. Auparavant estimée à 10 mutations/Mb, cette limite controversée serait plutôt à 13.8 selon une étude conduite sur plus de 10 000 tumeurs toutes localisations confondues.²⁸

c) Autres types d'anomalies génétiques

Outre les mutations ponctuelles, les cellules tumorales présentent également des perturbations d'ordre chromosomique (aneuploïdies, délétions, inversions, translocations, amplifications), il s'agit alors d'instabilité chromosomique ou CIN (chromosomal instability). 60 à 80% des tumeurs présentent des altérations chromosomiques liées à des erreurs de ségrégation des chromosomes lors des mitoses successives pouvant entraîner une perte de matériel génétique, l'activation des voies de signalisation de dommages de l'ADN et l'induction d'un stress protéique.²⁹ Cette CIN est corrélée au stade de la tumeur et au développement métastatique. Les cellules cancéreuses parviennent alors à adopter une tolérance par l'intermédiaire d'un changement transcriptionnel vers un état plus mésenchymateux avec activation des voies de réponses antivirales en raison de la libération d'ADN dans le cytosol par rupture des micronuclei.³⁰

De même, un autre niveau de complexité peut être ajouté avec la méthylation régulant l'expression des gènes comme MLH1, CDKN2A et BRCA1, c'est la régulation épigénétique. En moyenne, 50% des cancers humains ont des mutations des protéines intervenant dans la régulation de la structure de la chromatine la rendant restrictive ou permissive et facilitant ou restreignant l'accès de la machinerie transcriptionnelle.³¹ L'ensemble témoigne de l'importante diversité génétique des tumeurs.

1.2.2. Une hétérogénéité tumorale à la fois spatiale et temporelle

a) Sélection clonale et hétérogénéité intratumorale

Cette acquisition séquentielle de mutations génétiques suit un procédé d'évolution clonale des populations tumorales et une sélection progressive des sous-clones les plus compétitifs, ce que Nowell décrit dès 1976.³² La longue période nécessaire à l'apparition des symptômes du cancer résulte donc de l'accumulation progressive des altérations génétiques et du contournement des contraintes liées au microenvironnement.³³ Statistiquement, l'avantage prolifératif conféré par l'acquisition d'une nouvelle mutation n'est que de 0.4% en moyenne.²³ Cependant, tandis que le temps de doublement d'une cellule tumorale est de 1 à 2 jours, celui d'une tumeur n'est que de 60 à 200 jours, une tumeur mettant approximativement douze années avant d'atteindre une taille d'un cm. Cette différence peut être expliquée par la pression exercée par le microenvironnement en termes de ressources et d'espace.³³ En 2009, une représentation graphique de cette prolifération tumorale, avec une phase de plateau, est réalisée. Il s'agit de la croissance Gompertzienne.³⁴ En résulte une apparition progressive de sous-

populations clonales de plus en plus hétérogènes et génétiquement anormales. De même, l'intervention thérapeutique peut détruire les clones et leur environnement mais aussi provoquer une pression de sélection et l'expansion de variants résistants.³³ L'exposition à la chimiothérapie augmente le spectre mutationnel d'une tumeur et favorise ainsi l'instabilité génétique.⁹ Les cellules initiatrices de la tumeur et les cellules souches cancéreuses sont donc bien distinctes et les mutations acquises lors de la progression vont déterminer le phénotype et le devenir de la tumeur.³⁵

Devant l'importance de l'évolution tumorale et de son environnement, la classification actuelle, tenant compte du tissu d'origine, du stade et des différents marqueurs moléculaires, semble inappropriée. En 2017, Maley et son équipe mettent au point une nouvelle classification impliquant ces paramètres.³⁶ L'Evo-index renseigne sur la diversité et les changements au cours du temps allant d'une quiescence avec peu de clones à un renouvellement clonal dominant. L'Eco-index informe lui, sur les ressources disponibles et l'influence du microenvironnement, du stade de ressources limitées avec prédation immunitaire vers un renouvellement cellulaire considérable. Ces indications d'évolution et d'écologie classifient les tumeurs en seize catégories témoignant de leur agressivité et conditionnant le devenir des cellules cancéreuses permettant d'affiner la proposition de traitement. La multiplicité des oncogènes ou suppresseurs de tumeur associée à la diversité des localisations tumorales et des types histologiques entraînent une importante hétérogénéité à la fois histologique et fonctionnelle des tumeurs.

b) Hétérogénéité intertumorale

De par cette sélection clonale, une diversité des cellules au sein même de la tumeur s'installe. Il s'agit de l'hétérogénéité intratumorale entre cellules d'un même patient. La multiplicité des éléments favorisant la diversité génétique explique également l'existence d'une hétérogénéité intertumorale : différences entre patients présentant des tumeurs de même sous-type histologique. Lorsqu'il s'agit de comparer les différentes localisations tumorales, cette diversité devient encore plus notable. Mélanomes et cancers du poumon contiennent beaucoup plus d'altérations génétiques que la plupart des cancers, soit environ 200 mutations/tumeur dans les régions codantes. Reflétant l'exposition directe aux agents mutagènes, les cancers du poumon liés au tabagisme ont 10 fois plus de mutations que ceux des non fumeurs.³⁵ En conséquence, Lawrence et son équipe ont entrepris en 2013 un séquençage de l'exome de 3083 tumeurs de 27 types différents.³⁷ Des variations des altérations génomiques non seulement en termes de fréquences mais également au niveau du spectre mutationnel ont été caractérisées leur permettant de définir trois types d'hétérogénéités. (Figure 2) Le premier concerne la fréquence de mutations/Mb qui peut varier d'un facteur 1000 entre cancers d'origine pédiatrique (0.1 mut/Mb) et certains mélanomes (plus de 100 mut/Mb) témoignant d'une plus grande exposition aux agents mutagènes (les UV dans ce cas). Le deuxième niveau d'hétérogénéité recoupe l'hétérogénéité intertumorale mentionnée précédemment puisqu'il s'agit de celle entre tumeurs d'une même localisation, variant de 1 à 100 mut/Mb dans les mélanomes et de 0.1 à 100 mut/Mb dans les adénocarcinomes pulmonaires. A nouveau, l'influence des agents mutagènes est retrouvée, exposition aux UV ou encore anomalie de la réparation des

mésappariements. Le dernier niveau d'hétérogénéité est celui du spectre mutationnel cohérent avec les signatures mutationnelles décrites précédemment. Ainsi, dans les cancers du poumon, les transversions C en A sont plus courantes et liées à l'exposition au tabac. Dans les mélanomes, il s'agit des C en T, expliqués par l'exposition au soleil. Les îlots CpG sont impactés dans les cancers d'origines gastro-intestinales tandis que ce sont les îlots TpC dans les cancers du col de l'utérus, de la vessie ainsi que de la tête et du cou. Enfin, le taux de mutations des gènes faiblement exprimés est 2.9 fois plus important, et 2.1 fois plus important en ce qui concerne les régions tardivement répliquées en raison de la déplétion du pool de nucléotides.

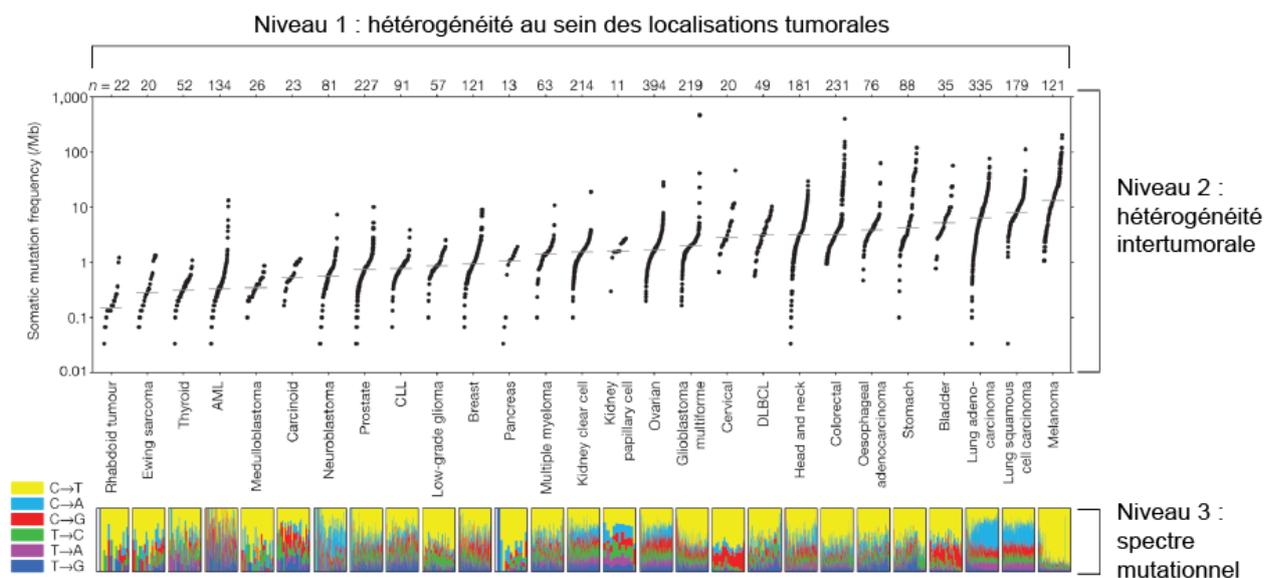


Figure 2 : Différents niveaux d'hétérogénéités tumorales démontrant la diversité génétique en oncologie solide.³⁷

c) Hétérogénéité spatiale et temporelle

L'importance de l'hétérogénéité tumorale ne s'arrête pas là puisque l'on peut également y associer des notions d'espace et de temps. Les populations sous-clonales peuvent s'entremêler ou encore être séparées dans l'espace, l'architecture tumorale variant de manière très significative au cours de la progression de la maladie. Il s'agit de l'hétérogénéité spatiale qui est plutôt liée à une évolution dans un contexte spécifique plutôt qu'une compétition mutuellement exclusive. La distribution génétique de ses sous-populations varie avec l'influence du microenvironnement, cependant les drivers majeurs, tels que BRAF et NRAS, restent constants. C'est le cas dans les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) qui sont très hétérogènes et dans lesquels 30% des mutations somatiques identifiés sont sous-clonales.³⁸ D'autre part, les cancers très hétérogènes (>48% d'altérations clonales) semblent entraîner une survie moyenne 4.9 fois moins importantes, l'instabilité génétique prenant une valeur pronostique¹. Les discordances entre sites primaires et métastatiques paraissent, elles, refléter l'apparition tardive des métastases dans le développement tumoral (5 ans selon les modélisations bioinformatiques). Ce n'est également pas toujours le même sous-clone qui devient circulant et entraîne la génération des différents sites métastatiques mais lorsque c'est le cas, l'environnement tumoral va influencer ce clone. Il a récemment été démontré, en

comparant les données génomiques des sites primaires et métastatiques appariés, que la génération des foyers métastatiques était dans 80% des cancers colorectaux très précoces. La dissémination métastatique aurait lieu avant même que le carcinome primaire ne soit cliniquement détectable, témoignant de l'importance d'une détection plus précoce.³⁹ Les principaux drivers, restants les mêmes, l'intérêt des thérapies les ciblant s'impose.

Mais, lorsque l'on parle d'hétérogénéité tumorale, il faut mentionner la notion de temporalité inhérente à la variation dynamique de la tumeur au cours du temps. Cette dernière est d'autant plus importante après administration de traitements, tels que les agents chimiothérapeutiques qui altèrent le spectre mutationnel ou encore les thérapies ciblées qui complexifient l'hétérogénéité génétique.¹ En 2012, Ding et son équipe comparent des séquençages de leucémies myéloïdes aiguës primaires avant et après rechutes avec administration de chimiothérapies permettant de démontrer l'apparition de nouvelles mutations et illustrant cette évolution clonale sous pression thérapeutique.⁴⁰ Un suivi de la tumeur en continu, donc du développement clonal, devient incontournable avec des répercussions sur la décision thérapeutique. Etant donné l'infaisabilité des répétitions d'actes chirurgicaux afin d'avoir plusieurs prélèvements de localisations différentes de façon répétées, d'autres méthodologies de suivi sont apparues : les biopsies liquides. Enfin, des réversions de la résistance acquise peuvent également apparaître après plusieurs mois sans traitement témoignant de l'évolution dynamique avec apparition, perte puis réémergence de clones résistants sous la pression du médicament, c'est la plasticité clonale.⁹ Face à toute la complexité de l'architecture tumorale, les thérapies anticancéreuses ciblées sont apparues, reposant sur différents types de mécanismes et exploitant les points faibles des cellules cancéreuses.

1.3. Thérapies ciblées et évolution vers une médecine personnalisée

1.3.1. Emergence des thérapies ciblées

a) Notions d'oncogénétique et de médecine personnalisée

Bien que la chirurgie soit la seule solution réellement efficace et potentiellement curative, il existe différents types de thérapies anticancéreuses. Connus depuis les années 50, les traitements à base d'agents chimiothérapeutiques sont encore aujourd'hui largement utilisés. Ces derniers exploitent les faiblesses des cellules tumorales en bloquant leur prolifération anarchique ou en induisant des dommages de l'ADN exacerbant leur instabilité génétique. Ces thérapies non ciblées vont préférentiellement agir sur les cellules tumorales mais impactent également les cellules saines expliquant les nombreux effets secondaires observés. Pour éviter cela et afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique, de nouvelles thérapies appelées thérapies ciblées ont été mises en place.

Dès le début du 20^{ème} siècle, un lien direct est fait entre hérédité et sensibilité aux médicaments : c'est la naissance de la pharmacogénétique.⁴¹ La présence d'un variant génétique peut alors directement déterminer la réponse de l'individu au traitement. Il faudra cependant attendre 1997 pour voir apparaître les premières recherches de thérapies anticancéreuses basées sur les données génomiques après

caractérisation des anomalies génétiques tumorales et la recherche des sensibilités que cela engendre dans la cellule cancéreuse.⁴² Cette étude traduit le début des traitements ciblant préférentiellement les cellules tumorales dans un contexte moléculaire particulier. La caractérisation moléculaire des tumeurs pour le développement des thérapies va favoriser la recherche de biomarqueurs et d'indicateurs biologiques de réponse.⁴³ Ce tournant thérapeutique des cytotoxiques généraux vers des thérapies plus ciblées sonne le début de la médecine personnalisée ou médecine de précision.⁴⁴ Il s'agit alors d'identifier le bon médicament ainsi que la dose la plus adaptée au patient pour un maximum d'efficacité tout en limitant les effets secondaires.

b) Début des thérapies ciblées et évolution

Les thérapies dites ciblées sont définies comme des traitements de nouvelle génération, conçues pour cibler des molécules spécifiques essentielles à la survie ou la prolifération des cellules tumorales⁴⁵. En 1998, le trastuzumab (Herceptin) apparaît sur le marché⁴⁶. Cet anticorps monoclonal ciblant le récepteur tyrosine kinase HER2 est administré aux patients atteints de cancers du sein métastatiques avec une importante expression protéique de ce biomarqueur, associée alors à un mauvais pronostic⁴⁷. Il faudra cependant attendre 2001 pour voir apparaître les premières thérapies ciblées basées sur le contexte moléculaire, marquant une rupture avec les médicaments anticancéreux précédents⁴⁶. Il s'agit d'un inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) administré aux personnes présentant des leucémies myéloïdes chroniques initialement résultantes de la présence de la protéine de fusion Bcr-Abl⁴⁸. L'Imatinib (Glivec) a, lors de l'essai clinique le comparant à l'association interféron alpha et cytosine arabinoside, conféré une amélioration de la réponse cytogénétique complète considérable, passant de 14.5% à 76.2% avec l'ITK⁴⁹. Puis, en 2005 et 2009, ce sont deux inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant l'EGFR (ITK-EGFR), respectivement l'Erlotinib et le Gefitinib, qui obtiennent leur Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). Ils sont administrés à des patients présentant des cancers bronchiques non à petites cellules avec des mutations activatrices du récepteur. Aujourd'hui, le paysage thérapeutique a considérablement évolué, en particulier dans le cancer du poumon, avec non seulement plusieurs générations d'ITK-EGFR mais également des inhibiteurs d'ALK, de MET, d'HER2, de ROS1, de BRAF, de RET, de NTRK1, de PIK3CA, de MEK1 ou encore l'immunothérapie. Les gènes mutés deviennent des biomarqueurs de réponse ou de résistance aux agents thérapeutiques. En 2012, une étude de plusieurs centaines de lignées cellulaires, représentant la diversité des tissus tumoraux ainsi que la diversité génétique des cancers humains, sont exposées à plus de 130 thérapies ciblées.⁵⁰ Elle confirme l'intérêt de l'oncogénétique et du profilage génétique des tumeurs pour guider l'administration du traitement. Cependant, l'hétérogénéité intra et intertumorale ainsi que les capacités d'adaptation considérables des cellules tumorales rendent ce choix difficile et les efficacités des traitements temporaires. D'autre part, les oncogènes ne sont plus les seuls à être ciblés, c'est maintenant le cas des suppresseurs de tumeur.

1.3.2. Addiction oncogénique et létalité synthétique : les thérapies ciblées reposent sur différents principes

a) Addiction oncogénique

En 2002, Weinstein et son équipe définissent le concept d'addiction oncogénique sur lequel vont se baser bon nombre de thérapies ciblées.⁵¹ Ils observent alors que malgré l'accumulation d'anomalies génétiques au cours du développement tumoral, la survie des cellules semble dépendre de l'activation continue d'un oncogène particulier. (Figure 3) Identifier puis cibler le type d'addiction oncogénique devient capital car cet oncogène est le « talon d'Achille » de la cellule.⁵² Lorsque cet oncogène est inhibé, les cellules tumorales vont entrer massivement et rapidement en apoptose tandis que cela a moins d'effet sur les cellules saines. Cette mort rapide est en réalité expliquée par une modification de la balance entre signaux pro-survies et pro-apoptotiques constituant un choc oncogénique.⁵³ En 2009, une autre caractéristique essentielle au développement tumoral est proposée : la capacité des cellules tumorales à gérer des stress qui peuvent avoir plusieurs origines.⁵⁴ Face à l'instabilité génétique et la prolifération anarchique, la cellule cancéreuse doit s'adapter et tolérer les stress répliatifs et dommages de l'ADN, stress protéiques, stress mitotiques et stress oxydatifs, qui deviennent des vulnérabilités pouvant ainsi être ciblés. C'est le principe de l'addiction non-oncogénique : gènes indispensables à la survie des cellules tumorales mais non mutés.

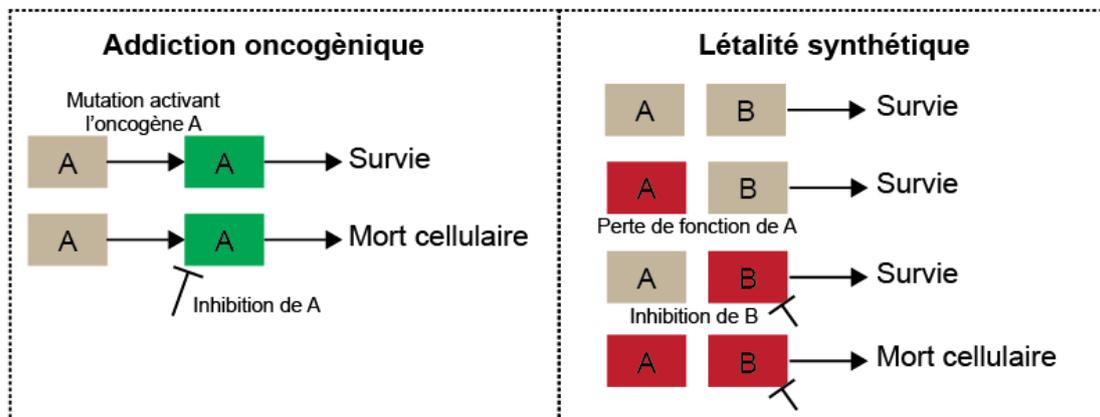


Figure 3 : Schéma reprenant les concepts d'addiction oncogénique et de létalité synthétique sur lesquels sont basées les thérapies ciblées.

Ces thérapies basées sur l'addiction oncogénique vont permettre de cibler uniquement les oncogènes. Malgré les preuves de leur efficacité, cela ne s'avère pas toujours possible expliquant le développement récent de traitements reposant sur un autre concept : la létalité synthétique.

b) Létalité synthétique

Nous pouvons parler de létalité synthétique entre deux gènes lorsque la perturbation d'un seul des deux est viable mais que leur inhibition conjointe conduit à la mort de la cellule.⁵⁵ (Figure 3) Ce concept a dans un premier temps été évoqué en 1946 lors d'études chez la drosophile et la levure.⁵⁶ Cibler à la fois les mutations oncogéniques et non oncogéniques démultiplie le nombre de cibles thérapeutiques

potentielles.⁵⁷ Une telle inhibition est un avantage considérable car elle n'affecte que les cellules tumorales mutées et limite les effets secondaires.

Le développement de thérapies basées sur la létalité synthétique nécessite une caractérisation au préalable des interactions génétiques essentielles telles que BRCA1/2 et PARP, TP53 et MK2, CHK1 et ATR ou encore KRAS et GATA2.⁵⁸ Ce criblage rencontre plusieurs difficultés.^{57,59} Tout d'abord, la létalité synthétique conduisant à la mort des cellules, il devient plus difficile de l'étudier. De plus, ces interactions essentielles dépendent de plusieurs conditions dont le fond génétique comme c'est le cas pour l'interaction BRCA1/2 et PARP et de la résistance induite par la perte de 53BP1. Les avancées technologiques notamment en ARN interférence et édition génomique ont permis de réels progrès quant à la caractérisation de ces gènes aux interactions essentielles. Une étude conduite chez la levure sur plus de 23 millions de doubles mutants a permis de mettre en évidence plus de 500 000 interactions létales démontrant tout le potentiel de ces possibilités thérapeutique.⁶⁰ Chez l'homme, de nombreuses études de ces interférences létales apparaissent actuellement utilisant des bibliothèques d'ARNg associées à la technologie CRISPR-Cas9, elles ont ainsi identifié par exemple la nécessité de TBK1 en présence de Ras oncogénique.^{61,62} Pourtant, bien que très attractifs pour la clinique, seuls les inhibiteurs de PARP (iPARP) associés aux mutations de BRCA1/2 apparus en 2005 sont actuellement disponibles.^{58,63,64}

L'ensemble des thérapies ciblées, qu'elles soient basées sur l'addiction oncogénique ou la létalité synthétique, font cependant face à certaines limites. Les cellules tumorales gouvernées par des voies de signalisation partiellement redondantes et ayant des capacités d'adaptation considérables, des phénomènes de résistance acquise apparaissent régulièrement après administration continue du traitement. D'autre part, la détermination de biomarqueurs spécifiques, qu'ils soient génétiques ou autres, est un préalable. Or, il n'est pas rare d'être face à une absence de biomarqueurs ou encore à des variants dont l'impact sur la fonction de la protéine est inconnue. Il devient alors impossible de proposer, dans de bonnes conditions, un traitement qui pourrait être inefficace voir délétère. Les travaux de thèse présentés ici seront divisés en deux grandes parties permettant d'aborder et de réfléchir sur ces limites actuelles des thérapies ciblées que sont la résistance acquise et les difficultés diagnostiques liées aux variants de signification inconnue. Ces deux aspects favoriseront également l'étude de la logique des deux grands types de mécanismes sur lesquels reposent les thérapies ciblées, qui sont l'addiction oncogénique et la létalité synthétique.

2. Addiction oncogénique et prescription des ITK dans les cancers du poumon non à petites cellules

2.1. Cancers bronchiques et thérapies ciblées

2.1.1. Place des CBNPC et caractéristiques

a) Les cancers bronchiques, généralités et épidémiologie

Bien qu'ils ne soient pas les plus répandus avec 2 millions de nouveaux cas/an, les cancers bronchiques demeurent les plus meurtriers entraînant 18.4% des décès liés au cancer². En France, ces chiffres s'élevèrent à 46 363 nouveaux cas pour 33 117 décès en 2018. En lien direct avec le tabagisme dans 75% des cas, sa prévalence tend à diminuer dans les pays les plus développés en partie grâce aux campagnes anti-tabac.⁶⁵ Cependant, l'International Association of Cancer Registries (IACR) estime que le nombre de nouveaux cas/an dans le monde pourrait s'élever à 10 millions d'ici 2030. En effet, l'augmentation importante du nombre de fumeurs en Chine (2/3 des hommes), représentant 1/3 du nombre total de fumeurs, ainsi que dans les pays en voie de développement au cours des 20 dernières années laisse penser que le pic de malades n'est pas encore passé.⁶⁵

Les facteurs de risque aux cancers bronchiques sont principalement exogènes avec majoritairement le tabagisme (pipe, cigare, cigarette) pour 75% d'entre eux. Le tabagisme passif est également responsable de 1.6% des cas et, chez l'enfant, le risque de développement d'une tumeur à l'âge adulte est multiplié par 3.6. D'autre part, 11% des cancers du poumon sont liés à la pollution atmosphérique que ce soient les hydrocarbures aromatiques qui induisent un stress oxydatif, l'exposition à l'amiante, à la poussière de silice ou encore à la radioactivité. De même, une consommation régulière d'alcool accroît le développement tumoral. Les facteurs endogènes aux cancers bronchiques sont également nombreux. Au-delà des prédispositions génétiques liées aux mutations constitutionnelles de gènes tels que TP53 et RB1, les cancers bronchiques sont également favorisés en cas de présence du variant germlinal p.Thr790Met du Récepteur au Facteur de croissance épithélial (EGFR).⁶⁶ Récemment, un risque de cancer bronchique accru a été associé à la présence de variants au niveau d'une région du chromosome 15 codant pour des sous-unités du récepteur nicotinique à l'acétylcholine CHRNA3, CHRNA4 et CHRNA5 (30% si altération d'un allèle, 70 à 80% si les deux allèles sont concernés).⁶⁷ La présence de ces variants augmenterait la vulnérabilité à l'addiction à la nicotine et en conséquence le risque de cancer bronchique. L'étude de ces variants pourrait donc avoir un but préventif. Les altérations des mécanismes de réparation de l'ADN tel que la réparation par excision de nucléotides (NER) par l'intermédiaire d'ERCC1 et RRM1 augmentent également le risque de cancer bronchique mais, paradoxalement, ils sont corrélés à un meilleur pronostic.⁶⁸ Enfin, la fumée de cigarette altère la barrière épithéliale, perturbant la production de mucus et favorisant la migration du microbiote dans les poumons ce qui contribue aux facteurs endogènes.^{69,70}

L'ensemble de ces facteurs exogéniques et endogéniques, l'exposition constante aux carcinogènes atmosphériques ainsi que le renouvellement important de l'épithélium pulmonaire vont contribuer à l'importante diversité génétique des cancers bronchiques³⁷.

b) Différents types de cancers bronchiques

Les cancers bronchiques représentent un ensemble de pathologies pouvant être divisés en cancers bronchiques à petites cellules (CBPC) et cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC). Malgré les avancés quant à leur détection et l'optimisation des traitements standards, ils sont diagnostiqués tardivement, le plus souvent au stade métastatique (70%), et sont donc associés à un mauvais pronostic.⁶⁶ Leur progression est caractérisée par une évolution clonale se traduisant d'abord par un changement de l'expression, chez les fumeurs, de l'IL8 et autres gènes de la réparation donnant des indications sur leurs origines moléculaires.⁷¹ Puis, interviennent des événements précoces récurrents tels que les pertes d'hétérozygoties des régions codants pour RASSF1A, FUS1, FHIT, CDKN2A et TP53⁷², les mutations de TP53, EGFR et KRAS et les hyperméthylations de CDKN2A, FHI, MGMT, DAPK, APC et RASSF1A⁷³.

Représentant 15% des cancers bronchiques, les CBPC sont localisés au niveau des alvéoles pulmonaires. Leur croissance tumorale rapide et l'instabilité génétique conséquente expliquent leur agressivité majeure et leur taux de survie à 5 ans de 7%.⁷⁴ L'absence d'avancés thérapeutiques depuis 30 ans les définissent comme des cancers récalcitrants, résistants à la chimiothérapie. Les inactivations de TP53 et RB1 sont des événements initiateurs capitaux des CBPC et dans 75% des cas ASCL1 est requis pour leur survie et leur croissance.⁷⁵ Leur lien direct avec l'exposition au tabac se traduit par différentes signatures et de manière générale une augmentation de la charge mutationnelle, mais peu de différences au niveau épigénétique.¹⁹

La grande majorité des cancers bronchiques (85%) demeure des CBNPC avec un taux de survie à 5 ans supérieur (23%).⁷⁶ Ils peuvent être subdivisés en trois sous-catégories : les adénocarcinomes (50% des CBNPC, issus des cellules productrices de mucus), les carcinomes épidermoïdes (liés au tabac, cellules bordant les voies aériennes) et les carcinomes des cellules larges.

c) Hétérogénéité mutationnelle des CBNPC

Malgré l'importante hétérogénéité tumorale des CBNPC, les progrès techniques et le séquençage haut débit ont permis la mise en évidence de nouveaux drivers oncogéniques et une extension considérable du paysage mutationnelle. En effet, seules les mutations de l'EGFR et de KRAS étaient détectées en 2004, mais plus d'une vingtaine de cibles sont caractérisées aujourd'hui. Les mutations de TP53 restent récurrentes puisqu'elles sont présentes dans 90% des carcinomes épidermoïdes et 50% des adénocarcinomes. Cependant, ce sont principalement les autres drivers face auxquelles des thérapies ciblées peuvent être administrées qui constituent le plus grand progrès^{70,76-80} (Figure 4) :

- KRAS : 25%, transversions G>T affectant les codons 12 et 13 de l'exon 2, en lien direct avec le tabagisme, des essais cliniques ciblant l'altération p.Glu12Cys de l'oncogène sont actuellement en cours⁸¹
- EGFR : 17%, proportion pouvant varier avec le sous-type histologique et l'origine ethnique ainsi cette fréquence passe à 40% chez les femmes asiatiques non fumeuses d'une quarantaine d'années⁸²
- ALK : 7%, récepteur tyrosine kinase (RTK) se réarrangeant notamment avec EML4 ce qui entraîne son activation constitutive⁸³
- NF1 : 4%, protéines tronquées
- MET : 3%, amplification
- HER2, BRAF et réarrangements de RET : tous à 2%
- ROS1, NTRK1, PIK3CA, AKT1, FGFR1 et FRGF2, RIT1 : tous à 1%
- MEK1, NRAS, PTEN, NRG1 : tous <1%

Enfin, le gène codant pour le suppresseur de tumeur LKB1 (ou STK11) est également fréquemment muté dans 34% des adénocarcinomes et 19% des carcinomes épidermoïdes mais cette fréquence passe à moins de 5% dans la population asiatique.⁸⁴ Encore aujourd'hui, aucun driver oncogénique n'est détecté dans 27% des cas démontrant la nécessité de la recherche de nouveaux biomarqueurs.

Les mutations intervenant au niveau des principaux drivers oncogéniques (KRAS, EGFR, MET, BRAF...) sont clonales et virtuellement mutuellement exclusives. Les autres ont plutôt tendance à être sous-clonales intervenant plus tardivement au cours de l'évolution tumorale.³⁸ En effet, 30% des variants identifiés sont sous-clonaux, ce qui est également le cas de 48% des altérations du nombre de copies témoignant de l'instabilité génétique. Tandis que les différences quant à la fréquence des mutations sous-clonales n'ont pas d'incidence sur la survie sans progression ce n'est pas le cas concernant les altérations du nombre de copies (1.8 vs 13.1 mois).³⁸ Par ailleurs, les séquençages d'exomes entiers ou de panels larges de gènes ont identifié des mutations mutuellement exclusives ou co-occurentes. D'un point de vue évolution clonale, la cooccurrence implique une coopération fonctionnelle tandis que l'exclusivité traduit plutôt une redondance ou un antagonisme.⁸⁰ En présence de variants de l'EGFR, ce sont plutôt les mutations des gènes TP53, RB1, CTNNB1 et PIK3CA qui sont fréquemment co-occurentes. Face à l'identification croissante de ces biomarqueurs et potentielles cibles thérapeutiques, des progrès considérables ont été réalisés en termes de thérapies ciblées.

2.1.2. Thérapies ciblées dans les CBNPC

a) Explosion du paysage thérapeutique dans les CBNPC

L'identification récente de nombreux drivers oncogéniques ont fait des CBNPC l'exemple même de l'efficacité et de l'évolution majeure du paysage thérapeutique depuis 2003 et les premiers ITK ciblant l'EGFR^{78,85}. Aujourd'hui de nombreux inhibiteurs spécifiques sont disponibles ciblant : ALK, MET, HER2, ROS1, BRAF, RET, NTRK1, PIK3CA et MEK1. (Figure 4)

Récemment, l'immunothérapie est apparue comme une nouvelle option, mais les résultats dans les CBNPC restent conflictuels⁷⁸. Tandis que le Pembrolizumab (anticorps anti-PD-1) a contribué à une amélioration de la survie des patients présentant >50% des cellules tumorales exprimant PDL1, par comparaison à la chimiothérapie (10.3 vs 6 mois), le Nivolumab a eu des résultats plus insatisfaisants (4.2 vs 5.9 mois). Cependant, il a été administré à tous les patients avec une expression PDL1 >5% et l'anticorps de diagnostic était différent. Ces derniers résultats étaient meilleurs rapportés à une charge mutationnelle élevée (9.7 vs 5.8 mois) mais à l'inverse, néfaste lorsqu'elle était faible (3.6 vs 4.2 mois). L'administration de Durvalumab, en entretien après la chimiothérapie, a permis des progrès considérables avec 16.8 mois vs 5.6 mois de survie.

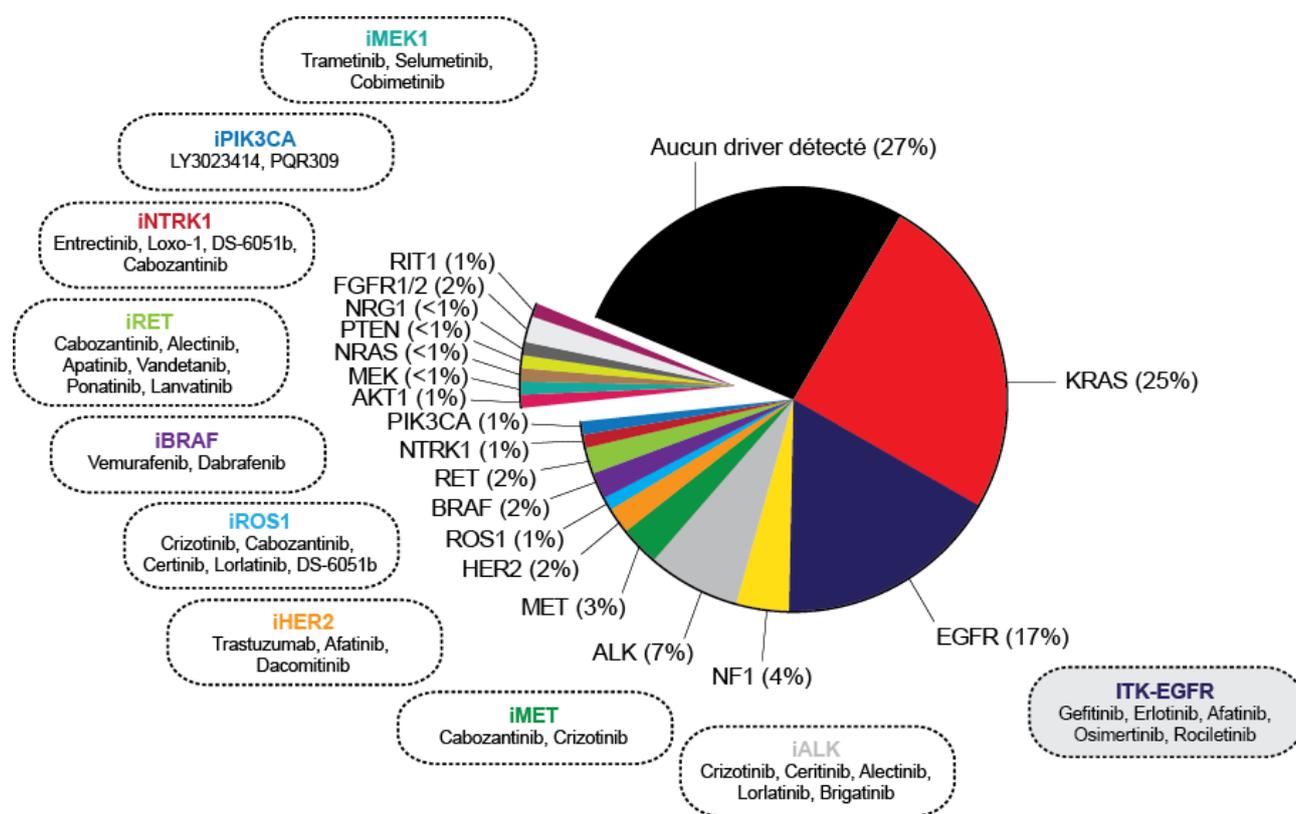


Figure 4 : Représentation schématique des différents drivers oncogéniques dans les CBNPC ainsi que les thérapies ciblées disponibles correspondantes.

b) Les inhibiteurs spécifiques de l'EGFR

Il existe deux types de ciblage de l'EGFR : par inhibition directe des signaux extracellulaires de prolifération ou neutralisation des ligands via des anticorps ou en utilisant des petites molécules perméantes bloquant spécifiquement la fonction tyrosine kinase du récepteur. Les anticorps bloquant ciblant cette protéine sont principalement utilisés dans les tumeurs digestives, et dans une moindre mesure dans les tumeurs bronchiques. Ils comprennent le trastuzumab (herceptin, inhibant principalement HER2), le panitumumab (vectibix), le cetuximab (Erbix) et le necitumumab (Portrazza).

Les inhibiteurs de tyrosines kinases ciblant l'EGFR ont fait partie des premières thérapies ciblées disponibles en clinique, se liant alors de manière réversible au récepteur. Apparus dès 2003, le Gefitinib a conféré un bénéfice clinique considérable par rapport aux cytotoxiques généraux (Carboplatine et paclitaxel) de 24.9 mois de survie sans progression contre 6.7 lorsqu'il a été administré en première ligne dans les CBNPC présentant des mutations activatrices de l'EGFR.⁸⁶ Des inhibiteurs de seconde puis troisième génération ciblant cette même protéine de manière irréversible ont depuis été développés (Tableau 2). Ces différentes molécules inhibitrices ont permis un bénéfice clinique considérable dans cette localisation tumorale en présence de mutations activatrices de l'EGFR.

Tableau 2 : Tableau répertoriant les différents ITK-EGFR associés à des essais cliniques de phase 2 ou plus avancés, ayant déjà publiés leurs résultats dans les CBNPC.

ITK-EGFR	Génération	Essais cliniques	AMM et ATU	Prescriptions	Ref
Gefitinib (Iressa)	1 ^{ière} Réversible	IPASS	Juin 2009	Réversible 1 ^{ière} ligne, mutation activatrice EGFR	87
Erlotinib (Terceva)	1 ^{ière} Réversible	EURTAC	Septembre 2005 2018	1 ^{ière} ligne, mutation activatrice EGFR Perte de l'intérêt clinique pour justifier un remboursement	88
Afatinib (Giotrif)	2 ^{ième} Irréversible	Lux-Lung	Septembre 2013 2014	1 ^{ière} ligne, mutation activatrice EGFR Pas de bénéfice clinique par rapport aux autres ITK-EGFR	89
Osimertinib (Tagrisso)	3 ^{ième} Irréversible	AURA FLAURA	Septembre 2017 Juin 2018	Résistance acquise ITK-EGFR de 1 ^{ière} génération, mutation T790M EGFR 1 ^{ière} ligne, mutation de sensibilité EGFR	90 91
Rociletinib	3 ^{ième} Irréversible	TIGER			

2.2. ITK-EGFR : cibles et mécanismes d'action

2.2.1. Le récepteur au facteur de croissance épithélial

a) Structure du récepteur

Le récepteur au facteur de croissance épithélial, ou ErbB1, est un récepteur tyrosine kinase membranaire de 1186 AA, il est codé par le chromosome 7 (7p12) et comprend 28 exons. Cette protéine est membre de la famille ErbB, tout comme ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) et ErbB4 (HER4). Exprimé dans de nombreux tissus épithéliaux, mésenchymateux ou encore neuronaux, l'EGFR intervient aussi bien dans le développement que dans la physiologie normale de la cellule, assurant survie, prolifération,

angiogénèse, apoptose ou encore invasion.⁹² Ce récepteur ubiquitaire est présent à la surface de toutes les cellules mais dans des proportions variantes de 20 000 à 200 000 récepteurs par cellule, pouvant même atteindre un million dans les tumeurs épithéliales.

Découverte dès 1990⁹³, cette protéine de 170kDa est composée de domaines distincts la faisant passer d'une conformation inactive vers une conformation active lors de la fixation d'un ligand (Figure 5). Le domaine N-terminal extracellulaire de l'EGFR est composé de 621 acides aminés (AA). Fortement glycosylé, il permet la reconnaissance du ligand. De même, 12 sites de N-glycosylation sont importants pour sa translocation à la surface cellulaire ainsi que sa maturation. Sa structure cristallographique complexée à l'EGF a démontré la présence d'une réplication en tandem de deux types de domaines.⁹⁴ Les domaines I et III, compacté en hélice, permettent l'association au ligand tandis que les domaines II et IV sont riches en cystéines et associés l'un à l'autre par un contact inhibiteur.⁹⁵ Une perturbation de l'asparagine en position 579 va affaiblir cette interaction inhibitrice conduisant à un domaine extracellulaire plus relâché et une augmentation de l'affinité pour le ligand.⁹⁵ De même, le variant p.Asn420Asp induit une activation constitutive du récepteur par formation spontanée de dimères, indépendamment de la présence de ligand. L'EGFR comprend également un domaine transmembranaire de 24 AA hydrophobes formant une hélice nécessaire à son ancrage à la membrane plasmique. Puis, un domaine juxtamembranaire intracellulaire joue un rôle crucial dans l'activation du récepteur, la phosphorylation de sa partie C-terminale ainsi que son recyclage par l'intermédiaire de son interaction avec les lipides membranaires.^{96,97} Il comprend deux parties majeures : JM-A (AA 645 à 663) et JM-B (AA 664 à 682).

Le domaine intracellulaire de l'EGFR comprend 542 AA dont le domaine tyrosine kinase (DTK) capital pour son activité. Ce dernier, codé par les exons 18 à 24, présente des similarités avec les protéines tyrosines kinases telles que Src. L'extrémité C-terminale de la protéine va elle contenir 229 AA (Glu958 à Ala1186) dont les tyrosines, phosphorylées lors de l'activation, avant transmission vers les protéines effectrices.⁹⁸ Les quatre principaux sites d'autophosphorylations sont localisés au niveau des résidus tyrosines 1068, 1086, 1143 et 1148.

b) Mécanisme d'activation du récepteur

Lors de son activation, l'EGFR passe d'une conformation monomérique ramassée vers une dimérisation de récepteurs qui s'associent dos-à-dos. En condition physiologique, cette activation dépend de l'expression à la fois spatiale et temporelle de ligands facilitant la formation d'homodimères ou d'hétérodimères, avec d'autres membres de la famille ErbB. Cependant, la surexpression du récepteur peut également y contribuer car la dimérisation est alors facilitée. D'autre part, une transactivation par l'intermédiaire du récepteur Wnt a également été démontrée dans les cellules saines tout comme dans les cellules mammaires cancéreuses.⁹⁹ Les ligands des récepteurs de la famille ErbB peuvent être divisés en trois groupes.^{92,100} (Figure 5) Le premier groupe se lie spécifiquement à l'EGFR et comprend l'EGF, le TGF α , l'AR et l'EPR. Le deuxième groupe se lie à l'EGFR ainsi qu'à ErbB4 et contient BTC, HB-EGF et EPR.

Enfin, le dernier groupe s'associe à ErbB3 et ErbB4 pour NRG1 et NRG2 ou seulement à ErbB4 (NRG3 et NRG4). L'ensemble de ces ligands est produit sous forme de précurseurs transmembranaires clivés par des métalloprotéases (principalement ADAM et MMP) permettant leur libération extracellulaire.¹⁰⁰ Aucun ne va se lier à HER2 qui ne possède pas de domaines II et IV, il n'est donc activé que par hétérodimérisation. La coopération entre ces récepteurs issus de la même famille est également indispensable pour ErbB3 qui ne possède pas de DTK.⁹⁵ Lors de cette dimérisation et suite à la fixation du ligand, une association directe entre les deux monomères est réalisée par l'intermédiaire du domaine II, la fixation du ligand entraîne une rotation à 130° des domaines I et II rompant le contact inhibiteur entre les domaines II et IV (Gly563 et His565).⁹⁵

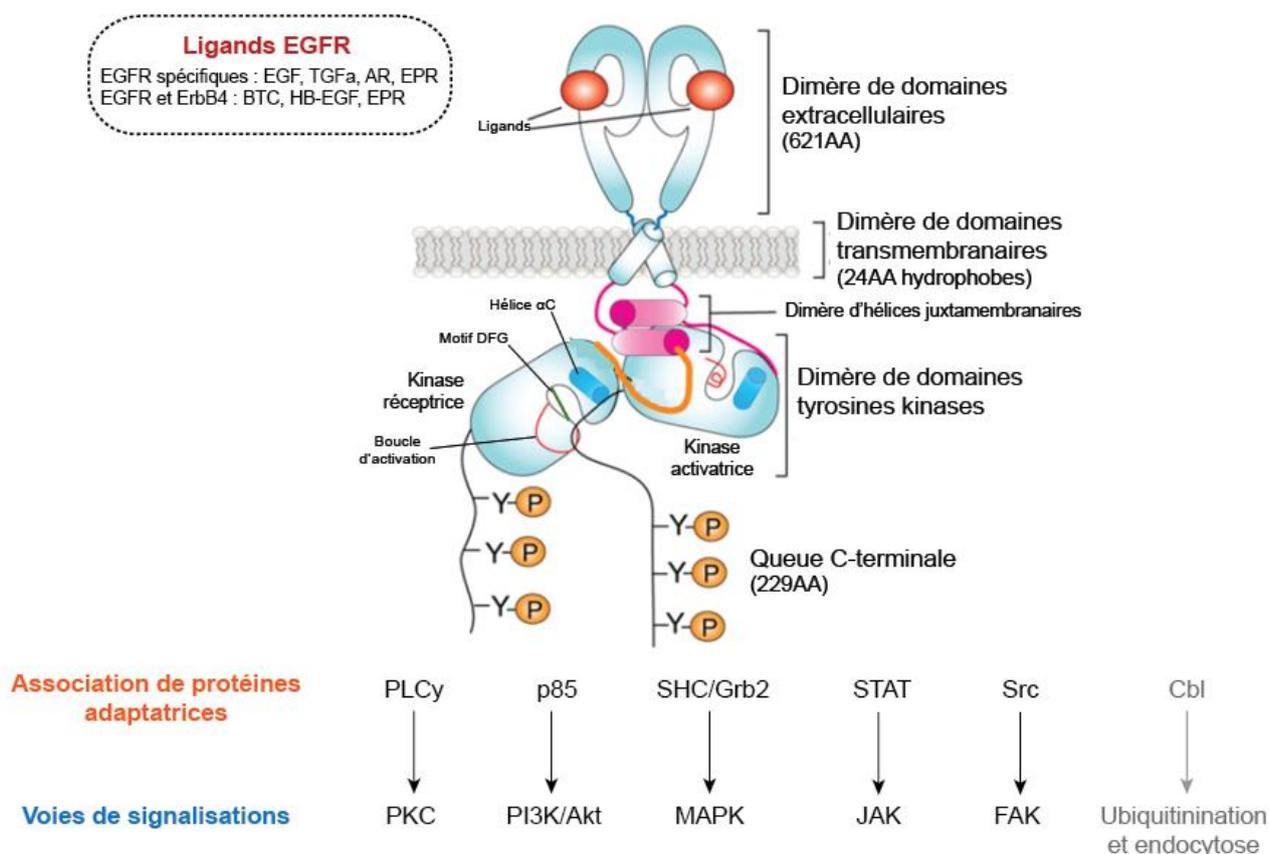


Figure 5 : Représentation schématique de la structure de l'EGFR lors de sa dimérisation et voies de signalisation associées à son activation.¹⁰¹

Suite à l'activation de l'EGFR, la dimérisation se poursuit avec la formation d'un dimère asymétrique au niveau des domaines tyrosines kinases cytoplasmiques. L'activité tyrosine kinase du récepteur naît de l'interaction entre le lobe C d'un DTK donneur ou activateur (Val924) et le lobe N d'un DTK accepteur (Ile682).^{101,102} L'association des résidus hydrophobes présents dans ces deux lobes est nécessaire à la stabilité de la conformation active de la protéine. Une rotation du lobe N est alors engagée favorisant un réarrangement de la boucle d'activation et permettant de le rapprocher du site de liaison à l'ATP. Cette boucle d'activation comprend les motifs DFG (Asp-Phe-Gly) particulièrement conservés au cours de l'évolution. En effet, la chaîne latérale de l'acide aspartique facilite son interaction avec l'ATP. En

configuration inactive, ce segment est localisé à l'extérieur du centre catalytique du DTK et c'est son réarrangement qui va conduire à l'association avec l'ATP.

Le domaine juxtamembranaire du récepteur est également capital à la phosphorylation de sa partie cytoplasmique. Le segment JM-B, mentionné précédemment, va former une pince s'échappant du lobe N et facilitant l'association au lobe C du DTK activateur, contribuant ainsi à la stabilisation du dimère. La dimérisation puis l'autophosphorylation du dimère stabilisé est asymétrique et légèrement supérieure au niveau de la queue C-terminale du DTK activateur, elle va ensuite permettre la fixation de protéines effectrices.

c) Activation des voies de signalisation

Les protéines effectrices ou adaptatrices recrutées sont chargées de transmettre le signal en intracellulaire. De nombreuses protéines à domaines SH2 (Src Homology structure) ou PTB (Phosphotyrosin binding), tel que GRB2, peuvent ainsi interagir avec le DTK du récepteur.¹⁰³ L'EGFR phosphorylé va donc activer au moins 6 voies de signalisation différentes en fonction des adaptateurs intermédiaires transmettant l'information. De multiples cascades de phosphorylations ainsi que des facteurs de transcription au niveau des voies de signalisation suivantes vont ainsi réguler cycle cellulaire, prolifération, apoptose, migration, différenciation et adhérence : MAPK (Ras-Raf-MEK-ERK1 ou ERK2), PI3K-Akt, JAK-STAT3 ou STAT5, kinase Src ou encore PLC/PKC.^{92,104} (Figure 5) Ces voies sont également activées par d'autres RTK interrogeant sur la spécificité du signal, il faut donc parler plutôt du réseau d'activation de l'EGFR plutôt que de l'activation d'une voie de signalisation précise. Enfin, parmi ces voies de signalisation, la voie PI3K/Akt semble tout particulièrement importante pour la signalisation EGFR-dépendante. En effet, il existe une corrélation entre un fort taux de phosphorylation d'Akt chez les patients et une amélioration du pronostic suggérant alors une plus grande sensibilité aux inhibiteurs de l'EGFR. Par extension, la phosphorylation d'Akt malgré l'administration de l'ITK-EGFR est une marque de résistance au traitement.¹⁰⁵ Une fois le récepteur activé et le signal transmis en intracellulaire et afin d'éviter une sur-activation du récepteur, une régulation de ce signal est mise en place.

d) Régulation de l'activation et renouvellement du récepteur

Le dynamisme de la transmission du signal fait intervenir des boucles de régulation qui vont être divisées en mécanismes de régulation précoces ou retardées.¹⁰⁶ Ils vont déterminer la durée, l'amplitude ainsi que la fréquence d'activation de l'EGFR. Le groupe des mécanismes de régulations précoces modifie les protéines dans les secondes ou minutes suivant l'activation. Ainsi des modifications secondaires telles que les déubiquitinylation par les enzymes AMSH ou UBPY régulant la dégradation du récepteur ou les déphosphorylations par des PTP (protein Tyr-specific phosphatase) vont intervenir. Les phosphorylations secondaires du récepteur en font également partie, qu'elles soient au niveau des tyrosines entraînant une stimulation du récepteur (tels que les tyrosines 845 et 1101 par Src), ou au niveau des sérines et thréonines ayant alors un rôle majoritairement inhibiteur. Ce groupe précoce comprend également la

régulation par l'intermédiaire des miRNA, la stimulation de cellules mammaires par l'EGF conduit d'ailleurs à une induction rapide d'une vingtaine de miRNA.¹⁰⁶ Enfin, élément de régulation majeur de ce groupe précoce, l'endocytose du récepteur activé favorise son recyclage ou sa dégradation par le protéasome. En effet, suite à la phosphorylation de l'EGFR (notamment la Tyr1045), l'E3 ubiquitine ligase c-Cbl va être recrutée¹⁰⁷ induisant une ubiquitinylation des résidus lysines du récepteur suivie d'une endocytose. Découverte dès 1999¹⁰⁸, c-Cbl joue un rôle clé dans la régulation négative de l'EGFR mais aussi dans celle de nombreux RTK. La régulation de sa stabilité ou de son activité modulent donc l'endocytose tout comme les principaux acteurs du cytosquelette. C-Cbl n'est cependant capable de dégrader que les homodimères de l'EGFR, les hétérodimères quant à eux sont recyclés¹⁰⁶.

Les mécanismes de régulations retardées de l'EGFR activé vont agir dans les minutes ou heures, induisant la production d'ARN ou de protéines.¹⁰⁶ Ces mécanismes vont faire intervenir des gènes immédiats (<45min) dont FOS, JUN ou encore ERG1, qui régulent le cycle cellulaire et les facteurs de transcription. Puis, ce sont les gènes retardés précoces (45min à 120min) dont DUSP et ZFP36. Enfin, viennent les gènes de réponse secondaire tardive (>120min) déterminant le devenir de la cellule et comprenant facteurs de transcription, acteurs du cytosquelette ou encore cadhérines et intégrines.

2.2.2. Les ITK-EGFR contre l'activation constitutive oncogénique

a) Activation constitutive et mutations activatrices

Dès 1984, Downward et son équipe mettent en évidence des similitudes entre l'EGFR et l'oncogène viral v-ErbB.¹⁰⁹ Il devient alors le premier récepteur reconnu comme oncogène lorsqu'il est altéré. Ses mutations ont depuis été observées, altérant son affinité pour l'ATP, sa capacité de dimérisation ou encore sa conformation enzymatique ; toutes contribuent à une activation facilitée.¹¹⁰ Les mutations drivers de cet oncogène vont principalement être localisées au niveau de son DTK et sont appelées mutations activatrices car elles augmentent l'affinité de fixation à l'ATP donc l'activation du récepteur. Les mutations impliquant les exons 18, 19 et 20 ainsi que la mutation p.Leu858Arg (exon 21) sont d'ailleurs toutes capables d'induire la transformation des fibroblastes et des cellules pulmonaires épithéliales.¹¹¹ Dans les cancers bronchiques, plus de 90% des mutations oncogéniques de l'EGFR sont des substitutions p.Leu858Arg ou des délétions de l'exon 19 (principalement la séquence LREA), dans 40 et 45% des cas respectivement. Les substitutions de la glycine 719, le variant p.Leu861Gln ainsi les insertions au niveau de l'exon 20 concernent 5% des cas. Les 5% restants sont des variants rares du récepteur.^{112,113} Tous ces variants sont oncogéniques in vitro et in vivo favorisant une hyperactivation du récepteur. Cependant, tous n'ont pas le même degré de dépendance en ligands et certains variants engagent seulement un récepteur partiellement actif.¹¹⁴ En conditions physiologiques, le choix entre DTK donneur et accepteur est effectué au hasard, ce qui n'est plus le cas lors de la présence de certains variants. Les DTK deviennent alors préférentiellement accepteur favorisant la dimérisation donc l'activation.¹⁰² Concernant la mutation p.Leu858Arg, le mécanisme conduisant à la suractivation du récepteur a été étudié. En effet, cette mutation au niveau de la boucle d'activation du DTK bloque l'enzyme en configuration active, augmentant

la capacité de dimérisation du récepteur donc baissant le seuil d'activation, tout en diminuant le désordre intrinsèque permettant la réalisation d'interactions faibles avec de nombreux partenaires protéiques.¹¹⁴ Les choses sont différentes avec le variant III de l'EGFR qui présente des délétions au niveau des exons 2 à 7 (268 AA). Caractérisé dans 5% des carcinomes épidermoïdes, ce variant entraîne la perte de la capacité de liaison au ligand et une activation constitutive du DTK en raison de la perte du contact inhibiteur entre les domaines II et IV.¹¹⁵

Outre ces mutations activatrices, la surexpression de l'EGFR est également présente dans 62% des CBNPC ainsi que dans de nombreuses localisations tumorales¹¹² (tête et cou, ovaire, vessie, col de l'utérus, estomac, œsophage, cerveau, sein, colon). Corrélée à un mauvais pronostic, elle facilite la dimérisation. D'autre part, l'hétérodimérisation avec ErbB3, fréquemment surexprimé, facilite l'activation des cascades de signalisation telle que la voie PI3K/Akt.¹¹⁶ De même, la surexpression de ligands contribue à cette activation constitutive établissant des boucles autocrines.¹¹² Bien qu'il n'existe pas d'étude liant spécifiquement un type de phosphorylation à une voie de signalisation, des phosphorylations différentes du récepteur activé ont été retrouvés entre les phénotypes de cancers bronchiques permettant de déterminer des phosphosignatures ayant une valeur prédictive.¹¹⁷ La présence de ces mutations activatrices va favoriser l'apparition d'une addiction oncogénique des cellules tumorales envers l'activation du récepteur. L'administration d'un inhibiteur spécifique de cette voie va donc entraîner la mort de ces cellules, principe sur lequel repose les ITK-EGFR.

b) Sensibilité aux ITK-EGFR

En 2002, le premier inhibiteur de tyrosine kinase ciblant l'EGFR, le Gefitinib, est approuvé au Japon après un essai clinique sur la population générale. Cependant, lors de l'extension de son administration aux USA en 2003, les nombreux effets secondaires observés ainsi que sa faible efficacité vont arrêter son expansion.¹⁰³ Il faudra attendre 2008 pour que l'importance des biomarqueurs soit prise en considération et que ce médicament soit administré uniquement en présence de mutations du récepteur. La découverte des mutations activatrices de l'EGFR va ainsi être associée à celle d'une sensibilité aux ITK-EGFR, la recherche de ces biomarqueurs devenant un préalable à l'administration.¹¹⁸⁻¹²⁰

Les mutations de l'EGFR prennent alors une valeur pronostic et prédictive de la réponse aux ITK-EGFR puisque 70% des patients vont alors répondre au traitement.^{76,121} Cette réponse aux ITK-EGFR est encore plus importante en présence d'une délétion de l'exon 19 du récepteur.¹²² En 2005, deux essais cliniques vont conduire à cette notion de théranostique, le Gefitinib a alors été administré à des patients présentant des cancers bronchiques avec ou sans mutations activatrices du récepteur.^{121,123} Dans les deux cas, une amélioration de la survie globale a été observée : 14.7 mois vs 4.7 dans le premier (54 patients Taïwanais) et 30.5 mois vs 6.6 dans le second (90 patients Coréens). Dans ce deuxième essai, l'impact de l'inhibiteur sur la phosphorylation d'Akt a également été étudié, elle ne prend une valeur prédictive que chez les patients présentant des mutations de l'EGFR. En 2009, un essai clinique de phase III confronte le Gefitinib aux agents de chimiothérapies classiques Carboplatine-Pemetrexed chez plus de 1200 patients.⁸⁶

La survie sans progression un an après le début du traitement passe alors de 6.7% à 24.9% en présence de l'ITK. D'autre part, cet essai a également démontré l'effet délétère de l'administration de ce traitement à des patients non mutés, puisque la survie était alors inférieure à celle observée en présence des agents chimiothérapeutiques. Cependant, 10 à 20% de ces patients non mutés ont tout de même eu une réponse partielle au Gefitinib. Les mutations du récepteur ne seraient donc pas les seuls biomarqueurs d'efficacité du traitement, certaines amplifications du récepteur ayant démontré une sensibilité à ces inhibiteurs.¹¹² D'autre part, bien que le Gefitinib et l'Erlotinib soient tous deux des ITK-EGFR de première génération, ils n'ont pas les mêmes conséquences en fonction du type de mutation oncogénique et des effecteurs impliqués¹¹⁰, le Gefitinib entraînant une inhibition plus forte de c-Cbl tandis que l'Erlotinib agit majoritairement sur STAT5.

La réalisation d'une méta-analyse de 6 essais cliniques, donc plus de 1200 patients mutés au niveau de l'EGFR (délétion exon 19 ou L858R de l'exon 21), conduite sur ces ITK de première génération versus chimiothérapie, a permis d'interroger leurs conséquences sur la survie globale.¹²⁴ De manière surprenante, aucune différence au niveau de la survie globale n'a pu être démontrée que ce soit en comparant ITK et chimiothérapie, délétion exon 19 et variant p.Leu858Arg ou encore l'âge, le sexe, l'ethnie ou l'histologie, contredisant les premiers essais cliniques en présence de ces médicaments. L'effet sur la survie sans progression a cependant été confirmé (11 mois vs 5.6) tout comme le pronostic légèrement plus favorable en présence de la délétion de l'exon 19.

Cependant, après plusieurs mois d'administration continue, inexorablement une rechute est constatée, stimulant la mise au point d'ITK-EGFR de deuxième puis de troisième génération s'associant eux de manière irréversible au récepteur (Tableau 2). L'Afatinib a d'abord été comparé à un placebo et administré en deuxième ligne, à la rechute sous ITK de première génération.⁸⁹ La survie sans progression était alors légèrement augmentée (3.3 mois vs 1.1 mois) cependant la survie globale était diminuée (10.8 mois contre 12 mois). Seuls 7% des patients avaient alors une réponse partielle. Le manque d'efficacité observé en présence de cet ITK de seconde génération ainsi que les nombreux effets secondaires observés ont favorisé le développement d'un ITK de troisième génération, l'Osimertinib. D'abord, mis au point pour cibler la mutation de résistance p.Thr790Met de l'EGFR ainsi que les autres mutations de sensibilité, cette molécule a été administrée en deuxième ligne conférant 70% de réponse.⁹⁰ Sa capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique, démontrée dans des modèles murins¹²⁵, a contribué fortement à son efficacité. D'autre part, il cible préférentiellement l'EGFR muté limitant fortement les effets secondaires. Cette dernière molécule a depuis été testée en première ligne, dans les CBNPC mutés EGFR, et comparée aux ITK-EGFR de première génération.⁹¹ La survie sans progression est alors considérablement augmentée passant de 10.2 mois à 18.9 en présence de l'Osimertinib entraînant 80% de réponse contre les 70% déjà observés précédemment en présence des ITK de première génération.

Que ce soit avec les inhibiteurs de première, deuxième ou troisième génération, une rechute lors d'une administration continue est observée, démontrant à nouveau la capacité d'adaptation considérable des

cellules tumorales ainsi que la redondance partielle des voies de signalisation. L'étude de ces mécanismes de résistance acquise, freinant l'efficacité thérapeutique, est un des enjeux actuels de ces thérapies ciblées.

2.3. Résistance acquise aux ITK-EGFR

2.3.1. Résistance innée ou acquise ?

a) Résistance primaire aux ITK-EGFR

Le développement d'une résistance acquise dans les 6 à 12 mois suivant le début d'administration est le propre de ce type de traitement illustrant parfaitement l'hétérogénéité ainsi que la capacité d'adaptation des tumeurs. Cette résistance acquise répond à une liste de critères précis définis par Jackman en 2010. Ce mécanisme caractérise des patients présentant des mutations de sensibilité de l'EGFR, auxquels un ITK a été administré et où un bénéfice clinique a ensuite été suivi d'une progression de la maladie au cours du temps.¹²⁶ La résistance innée ou résistance primaire quant à elle, traduit une absence de réponse au traitement voire même une progression de la maladie. Elle est observée chez 4 à 10% des patients présentant des CBNPC mutés EGFR et peut alors avoir deux origines : l'hôte ou la tumeur.¹²⁷

Concernant les facteurs dépendants de l'hôte, le tabagisme participe à cette résistance. En effet, la fumée de cigarette induit CYP1A1, un des cytochromes impliqués dans le métabolisme des ITK, favorisant donc une dégradation plus rapide du médicament.¹²⁸ De même, le tabagisme inhibe l'ubiquitinylation du récepteur donc sa dégradation contribuant à sa surexpression.^{127,129} La présence de certains polymorphismes contribue également à cette résistance primaire. Ainsi, des polymorphismes de la protéine pro-apoptotique BIM favorise la résistance.¹³⁰ Des polymorphismes au niveau du récepteur lui-même sont également décrits, 0.5% des résistances primaires sont dues à la présence des variants p.Thr790Met ou p.Val834Ile. Outre la résistance primaire, la présence de la mutation p.Thr790Met engage aussi une prédisposition génétique à développer un CBNPC, démontrée dans une famille où les 6 membres porteurs de la mutation l'ont développé, dont 4 avec apparition d'une mutation activatrice en cis.¹³¹ De même, l'activation de NFκB via la surexpression de c-FLIP ou la diminution de son inhibiteur IκB réduisent l'efficacité thérapeutique.¹³²

Des facteurs dépendants de la tumeur sont également responsables de la résistance primaire. Elle provient majoritairement de mutations de l'EGFR, les insertions au niveau de l'exon 20 constituant 4-9% d'entre elles. Ces insertions de 3 à 12 bases ont pour conséquence une diminution de l'affinité du récepteur pour les ITK d'un facteur 100 par rapport à d'autres variants.^{112,133} Cependant, toutes n'entraînent pas une résistance. De nouveau, le variant p.Thr790Met de l'EGFR est un facteur de résistance primaire pouvant donc être dépendant de l'hôte ou uniquement tumoral. Il est détecté dans 0.5% des cas, ce qu'il faut toutefois nuancer en fonction de la méthode de détection. L'activation des récepteurs ErbB2 et ErbB3 contribuent également à cette résistance primaire.¹³⁴ Enfin, les pertes de PTEN, présentes dans 70% des CBNPC (avec <10% liées à des mutations) sont responsables de 1-3% des

résistances primaires aux ITK-EGFR.¹³⁵ La réexpression de la protéine régulant Akt sensibilise ces cellules aux inhibiteurs de l'EGFR.¹³⁶ Cette résistance primaire ne représente que 4-10% des cas mais pourrait être largement sous-évaluée. Certaines études démontrent en effet que la résistance acquise pourrait être due à la préexistence d'un clone subissant la sélection thérapeutique.

b) Résistance acquise : sélection clonale ou nouvelles mutations ?

L'une des problématiques majeures liées au mécanisme de résistance acquise aux ITK-EGFR interroge son origine : sélection clonale d'un clone préexistant ou apparition d'une mutation secondaire conférant à la cellule un avantage prolifératif ? La mutation p.Thr790Met de l'EGFR illustre parfaitement ce questionnement. L'apparition de cette mutation secondaire à la fois dans les cohortes de patients d'origines européennes ou asiatiques et dans les mêmes proportions malgré les différences en termes d'incidence de mutations de l'EGFR tendraient plutôt en faveur d'une acquisition de la mutation sous pression du médicament et non de la préexistence d'un clone. Ce variant est d'abord rarement détecté dans les échantillons primaires mais cela pourrait être lié aux méthodes de détection utilisées. En effet, des études plus récentes sur l'ADN circulant tumoral (ADNct) réalisées sur 27 patients mutés EGFR mais naïfs d'ITK-EGFR, à l'aide de puce, ont validé la présence des mutations activatrices mais également de la mutation de résistance p.Thr790Met dans 33% des cas, ce qui est bien supérieur aux 0.5% constatés avec les méthodes classiques.¹³⁷ Cette analyse démontre la présence du variant dans une fraction très faible de clones tout en confirmant la corrélation entre sa préexistence et une diminution de la survie sans progression car conférant un avantage sélectif lors d'une exposition aux médicaments. De même, dans une étude plus récente réalisée à l'aide d'acides nucléiques peptidiques (PNA), ce variant a été identifié dans 65% des tumeurs primaires.¹³⁰

D'autre part, les mutations de l'EGFR sont localisées de manière plutôt homogène au niveau de son domaine tyrosine kinase. Cependant les mécanismes impliqués dans la résistance acquise sont très hétérogènes que ce soit entre les sites tumoraux, dans le temps ou au sein d'un même patient. Ainsi, l'analyse de 7 sites tumoraux prélevés chez un même individu, a validé la présence de la mutation activatrice du récepteur (délétion de l'exon 19) dans l'ensemble des prélèvements mais seulement 6 arboraient la p.Thr790Met.¹³⁸ Dans un autre cas clinique, la mutation p.Thr790Met n'a été détectée que dans un des sites tumoraux tandis qu'une amplification de HER2 était responsable de la résistance d'un autre.^{127,139} Ces deux cas cliniques démontrent toute l'hétérogénéité des mécanismes de résistance ainsi que l'impact réel de l'environnement sur la sélection. La résistance acquise serait alors issue d'une combinaison de ces deux types de mécanismes, sélection clonale et pression sélective, imposée par les ITK-EGFR.

2.3.2. EGFR, acteur majeur de la résistance acquise « on-target »

La résistance acquise aux ITK-EGFR comprend un ensemble de mécanismes très diversifiés pouvant être classés en résistance « on-target » impliquant l'EGFR lui-même, résistance « off-target » conduisant à un changement d'addiction oncogénique et changements phénotypiques.¹⁴⁰ (Figure 6)

a) Mutations secondaires de l'EGFR

La mutation p.Thr790Met, localisée au niveau de l'exon 20, de l'EGFR est responsable de 50% des résistances acquises aux ITK-EGFR¹⁴¹⁻¹⁴³, elle apparait la plupart du temps en cis de la mutation primaire.¹⁴⁴ (Figure 6) La concentration requise pour inhiber le récepteur est alors 100 fois supérieure à celle nécessaire en présence de mutations de sensibilité, pour les ITK-EGFR de première génération ou l'Afatinib.¹⁴⁵ Cette mutation est en effet un résidu déterminant pour la spécificité des inhibiteurs, la méthionine interagissant avec les résidus hydrophobiques entourant le site actif et stabilisant le récepteur en configuration active. L'affinité pour l'ATP est alors décuplée ce qui entraîne une inhibition compétitive de la fixation des inhibiteurs au récepteur.¹⁴⁶ Cette affinité est encore plus importante pour le double mutant p.Leu858Arg/p.Thr790Met.

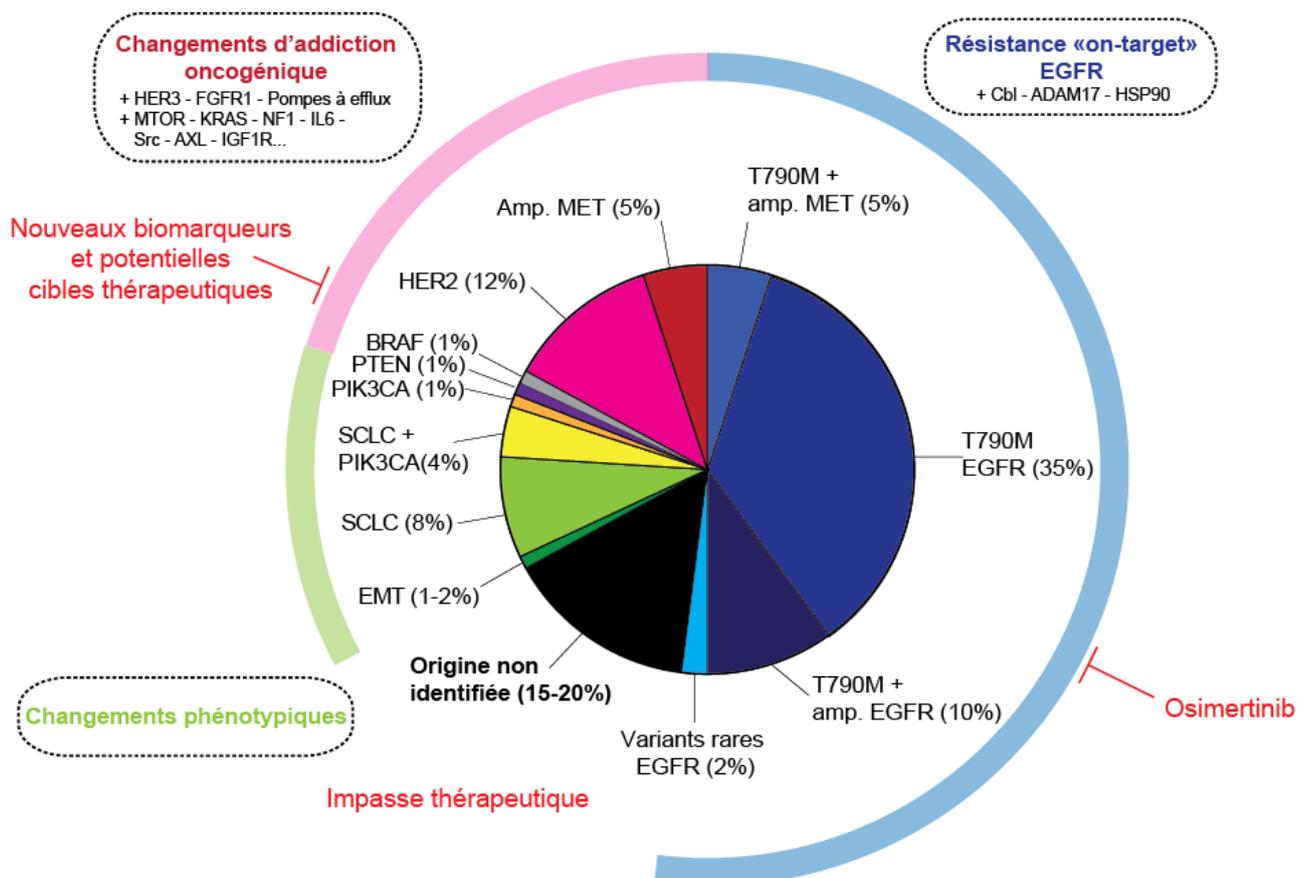


Figure 6 : Représentation schématique des proportions des différents mécanismes de résistance acquise aux ITK-EGFR de première génération dans les CBNPC.

La fréquence importante d'apparition de la p.Thr790Met est liée au type même de la mutation : une transition C en T au niveau d'un dinucléotide CpG. La méthylation des cytosines au niveau de ces dinucléotides étant une des modifications les plus communes de l'ADN, ce sont des hotspots mutationnels en raison des déaminations spontanées favorisant la transition C en T. L'hyperméthylation de ce dinucléotide va favoriser l'apparition de la p.Thr790Met.¹⁴⁷ Cependant, la mutation est sous représentée dans le génome tumoral par rapport au nombre total d'allèles de l'EGFR soulevant deux hypothèses : le variant de résistance n'est présent que dans certaines cellules tumorales ou alors dans une minorité de copies au sein de chaque cellule tumorale.¹⁴⁴ Paradoxalement, la présence de cette mutation est devenue de meilleur pronostic avec l'apparition d'un ITK de troisième génération, l'Osimertinib, interagissant précisément de manière irréversible à son niveau. D'autres mutations de l'EGFR causent également une résistance acquise mais dans une proportion moindre (2%) : p.Asp761Gln, p.Leu747Ser, p.Thr854Ala...^{142,143,148} Cependant, ces mutations secondaires ne sont pas les seuls mécanismes de résistance acquise impliquant directement le récepteur.

b) Surexpression du récepteur

L'amplification de l'allèle muté de l'EGFR va contribuer à cette résistance acquise, la concentration en molécule thérapeutique administrée devenant insuffisante chez 10% des patients.^{112,149} (Figure 6) Cette amplification intervient simultanément à d'autres mécanismes de résistance, elle est également déjà présente dans 62% des CBNPC. Il devient donc difficile d'évaluer en termes de fréquence son impact réel sur la résistance acquise. D'autres mécanismes peuvent intervenir sur le niveau d'expression du récepteur comme les mutations de c-Cbl altérant son association avec le récepteur donc la régulation de son activation et de sa localisation membranaire.¹⁵⁰ La surexpression de certaines protéines chaperonnes en sont un autre exemple. Jouant un rôle dans la maturation et la conformation des kinases telles que l'EGFR, HER2 ou encore MET, elles favorisent l'expression donc l'activation de protéines mal conformées qui auraient dû être dégradées.¹⁵¹ Des inhibiteurs de HSP90 sont d'ailleurs actuellement en cours d'investigation. Enfin, la surexpression de la métalloprotéase ADAM17, ou autres membres de la même famille, concoure également à cette résistance en favorisant l'apparition de boucles autocrines par surexpression de ligands donc suractivation de HER2 ou ErbB3 se dimérisant alors au récepteur et entraînant son activation constitutive.^{112,152,153}

L'apparition de mutation secondaire ou la surexpression du récepteur favorisent des résistances acquises dépendant de la cible de la molécule thérapeutique. Cependant, d'autres mécanismes existent entraînant des changements d'addiction oncogénique et contournant la nécessité du driver principal, l'EGFR : ce sont les résistances « off-target ».

2.3.3. Changement d'addiction oncogénique et résistance « off-target »

a) Amplifications et changements d'addiction oncogénique

Ces mécanismes de résistance hors cibles des ITK-EGFR peuvent être subdivisés en trois catégories distinctes : les amplifications, les mutations ponctuelles favorisant l'apparition de nouveaux drivers oncogéniques et les changements phénotypiques. (Figure 6) Tous favorisent un changement d'addiction oncogénique conférant aux cellules la capacité à échapper à l'inhibition.

Autre RTK présent sur le même chromosome que l'EGFR, les amplifications de MET sont présentes dans 10% des résistances acquises aux ITK-EGFR. Activant directement la voie PI3K-Akt, l'activation de MET permet de contourner l'inhibition de l'EGFR favorisant un changement d'addiction oncogénique. Cette protéine est également capable d'hétérodimérisation avec les RTK de la famille ErbB et plus spécifiquement avec ErbB3.^{148,154} Cependant, dans la moitié des cas, elles interviennent simultanément à l'apparition du variant p.Thr790Met de l'EGFR. L'inhibition de MET par ARN interférence restituant la sensibilité aux ITK-EGFR, des essais combinant ces deux inhibitions sont actuellement en cours. Les amplifications de HER2 sont, quant à elles, responsables de 12% des résistances acquises aux ITK-EGFR. Le KO de ce gène dans une lignée surexprimant ce RTK, permet d'ailleurs de retrouver la sensibilité à l'Afatinib.¹⁵⁵ Dans ce cas, aucune mutation p.Thr790Met n'a été détectée simultanément. Les amplifications d'ErbB3 ont les mêmes conséquences. Autre RTK, les amplifications de FGFR1 et de son ligand FGF2 sont également responsables d'une résistance acquise aux ITK-EGFR.¹⁵⁶ En 2013, une étude identifie 18 kinases, ou gènes associés à des kinases, dont la surexpression peut se substituer à l'activation des voies PI3K-Akt et MAPK par l'EGFR dans la lignée d'adénocarcinome pulmonaire PC9 (délétion exon 19 de l'EGFR).¹⁵⁷ Sept des neuf kinases citées sont de la famille Src : FGFR1, FGFR2, NTRK1, NTRK2, ITK, MOS, MST1R et RAF1. Toutes ces cibles sont de potentiels acteurs d'une résistance acquise. Enfin, les amplifications des pompes à efflux affectant directement la biodisponibilité du médicament peuvent également favoriser une résistance acquise. Ceci est d'ailleurs le cas pour ABCG2 ou pour d'autres membres de la famille des transporteurs glycoprotéiques ABC^{158,159}. L'acquisition de mutations au cours de la résistance est un autre mécanisme hors cible permettant l'apparition de nouveaux drivers oncogéniques.

b) Mutations ponctuelles et apparition de nouveaux drivers oncogéniques

L'apparition de nouveaux drivers oncogéniques favorisant la résistance acquise est un phénomène plutôt rare, chaque driver étant identifié dans de très faibles proportions et pouvant être classés en fonction de la voie de signalisation dans lesquels il intervient.¹⁴⁰ Concernant la voie PI3K-Akt, primordiale dans la signalisation dépendante de l'EGFR, plusieurs gènes peuvent être impliqués dans la résistance acquise. Ainsi, 5% sont liées à PIK3CA, 1% à la perte de PTEN tandis que des amplifications de MTOR sont également identifiées.¹⁴⁰ Les inhibitions conjuguées de l'EGFR et de cette voie de signalisation n'ont cependant pas donné des résultats concluants en raison des nombreux effets secondaires constatés, la

tolérance étant meilleure avec les inhibiteurs de PI3K. S'agissant de la voie des MAPK, des mutations de BRAF interviennent dans 1% des cas, la perte de NF1 qui est un régulateur négatif de RAS est également répertoriée favorisant des réactivations d'ERK.¹⁶⁰ Bien que les mutations de KRAS et de l'EGFR soient mutuellement exclusives, des variants de KRAS peuvent également apparaître sous pression du médicament. Une réversion de cette perte de sensibilité aux ITK-EGFR est constatée en associant ces derniers à des inhibiteurs de MEK.¹⁶¹ La réactivation de la voie JAK-STAT malgré la présence de l'inhibiteur est un mécanisme d'adaptation précoce des cellules tumorales notamment grâce à l'augmentation du ligand IL-6.¹⁴⁰ Cependant, dans les essais associant les inhibitions de l'EGFR et de cette dernière voie, seulement 5% de réponse sont constatées, cette combinaison n'étant pas capable d'inverser la résistance. Suite à l'identification d'activation de la voie Src, d'autres essais combinant son inhibition à celle de l'EGFR sont également en cours, cette combinaison paraît pour le moment efficace et bien tolérée.¹⁶²

Outre les membres des principales voies de signalisation, des mutations de RTK moins conventionnels ont également été démontrées. L'IGF1R en est un bel exemple, son activation constitutive favorise l'activation de la voie PI3K-Akt.¹⁶³ Les mutations activatrices de ce récepteur ne sont cependant pas les seules responsables de son intervention dans la résistance acquise aux ITK-EGFR. En effet, une tolérance réversible par l'intermédiaire de mécanismes épigénétique favorisant sa liaison à IRS-1, intermédiaire entre le récepteur et la voie PI3K/Akt, a été démontrée dans une lignée d'adénocarcinome pulmonaire exposée de manière prolongée au Gefitinib.¹⁶⁴ Enfin, AXL est un autre RTK dont l'activation constitutive a des répercussions sur la signalisation par l'intermédiaire des voies PI3K-Akt, MAPK ou encore NFkB promouvant alors la survie et l'invasion métastatique. Il en est de même pour la surexpression d'un ligand de ce récepteur, GAS6. Des essais cliniques combinant l'inhibition d'AXL et de l'EGFR sont actuellement en cours d'investigation.¹⁴⁰

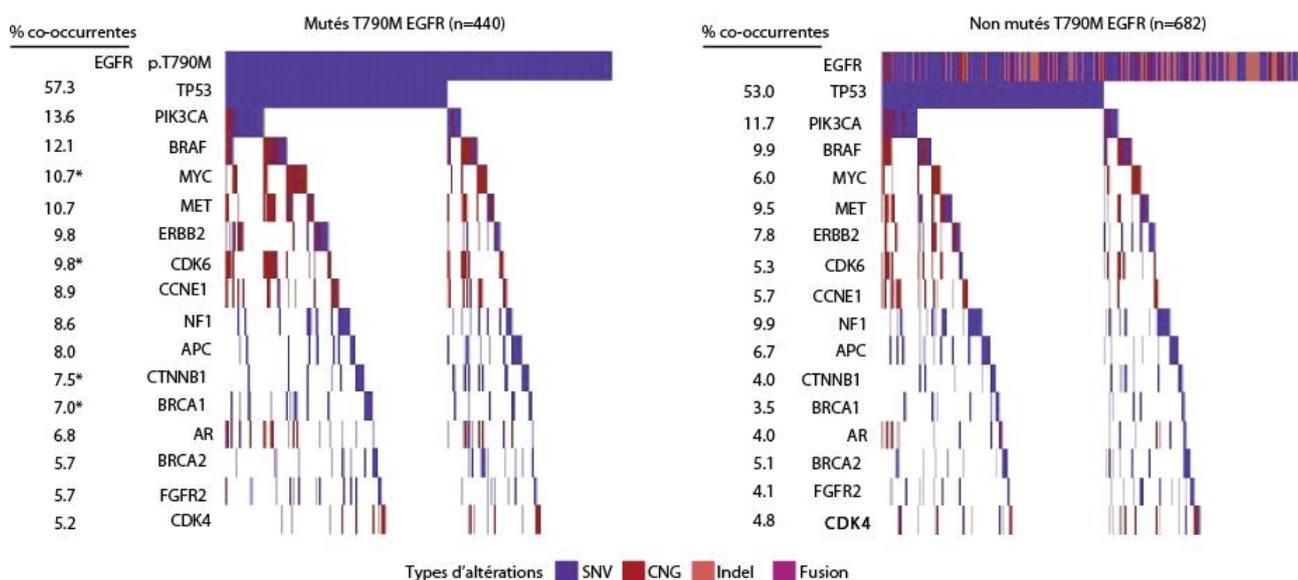


Figure 7 : Altérations génétiques intervenant simultanément lors de la résistance acquise aux ITK-EGFR dans les CBNPC en fonction de la présence ou non de la mutation p.Thr790Met de l'EGFR¹⁶⁵.

L'ensemble de ces drivers deviennent alors des biomarqueurs ainsi que des potentielles nouvelles cibles thérapeutiques. (Figure 4) Certains apparaissent très rarement et ne sont pas recherchés lors du diagnostic, il devient alors difficile d'évaluer leur impact réel en clinique. D'autre part, les mutations oncogéniques intervenant au niveau des drivers sont la plupart du temps considérées comme mutuellement exclusives. En conséquence, les mutations co-occurentes sont peu étudiées, que ce soit avant le traitement ou à la rechute, malgré leur potentiel impact déterminant sur le devenir de la tumeur.¹⁶⁵ Les analyses génomiques de plus de 1122 cancers bronchiques mutés au niveau de l'EGFR ont justement permis d'identifier de nombreuses mutations présentes simultanément, en présence ou non de la mutation p.Thr790Met, et d'identifier de nouvelles voies de signalisation pouvant limiter l'efficacité des ITK : voie Wnt- β -caténine et gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. (Figure 7) Cette étude démontre toute la complexité de l'identification des mécanismes de RA et au-delà des biomarqueurs pouvant être ciblés.

c) **Changement du phénotype des cellules**

Dernier mécanisme de résistance « off-target », les changements phénotypiques des cellules tumorales ont été démontrés en clinique. Le premier de ces mécanismes est la transformation de CBNPC vers un CBPC intervenant dans 12% des cas. Elle est caractérisée par une morphologie différente ainsi qu'un marquage positif de la synaptophysine, la chromogranine ou encore NCAM.^{127,148} Sans preuve d'une présence de petites cellules avant la résistance acquise, ces cellules émergentes arborent toujours la mutation primaire de l'EGFR prouvant l'origine commune des CBNPC et des CBPC.¹⁶⁶ Ce changement phénotypique a également été observé avant exposition des cellules aux ITK-EGFR ainsi que dans des cellules ne présentant pas de mutation du récepteur, l'exposition au médicament n'est donc pas l'unique origine de cette transformation. Elle est associée à une perte de l'expression de RB1, même si elle n'est pas suffisante pour l'induction d'une transformation dans des modèles murins¹⁶⁶, et s'accompagne le plus souvent de mutations de PIK3CA.

La transition épithélio-mésenchymateuse ou EMT est impliquée dans 1-2% des mécanismes de résistance acquise.¹⁴⁸ Les cellules épithéliales résistantes acquièrent alors des caractéristiques mésenchymateuses s'accompagnant de changements morphologiques et phénotypiques : perte de l'adhérence cellulaire, diminution des expressions de l'E-cadhérine et de la β -caténine, augmentation des expressions de la vimentine, de la N-cadhérine et des facteurs de transcription SNAIL, SLUG, ZEB1 et TWIST.¹⁶⁷ Ces augmentations de la mobilité et de l'invasion sont associées à un niveau élevé de TGF β stimulant la production d'IL-6 et activant la voie JAK-STAT de manière autocrine. Ce mécanisme de résistance pourrait impliquer les augmentations de NOTCH1, de MET ou encore celle d'AXL comme démontré dans plusieurs lignées cellulaires ainsi que dans des modèles murins.¹⁴⁵ L'évaluation de ce changement phénotypique n'étant pas réalisée en pratique courante, son importance est donc sous-évaluée.¹⁶⁸ Des séquençages génomes entiers de plusieurs lignées cellulaires dérivées de patients progressant sous ITK-EGFR ont identifié FGFR1 comme le médiateur le plus important de cette résistance. Les inhibitions combinées de

l'EGFR et de FGFR suppriment cette résistance acquise dans un modèle de xéno greffes murines.¹⁶⁸ Le microenvironnement est également acteur de cette EMT comme démontré lors de co-cultures avec des CAF (Cancer-associated fibroblast) favorisant la résistance par sécrétion de facteurs solubles tels que HGF, TGB α , HB-EGF ou encore GAS6. L'hypoxie et la production de HIF1 associée contribuent de même à cette résistance.¹⁴⁰

L'ensemble des mécanismes impliqués dans la résistance au traitement d'un patient démontre la difficulté à identifier le traitement secondaire le plus adapté. (Figure 6) La cooccurrence de certains de ces mécanismes complexifie d'autant plus ce choix. Encore aujourd'hui, et malgré les progrès considérables de ces dernières années, 15 à 20% de ces résistances acquises demeurent d'origine inconnue. D'autre part, plus de 50% sont des résistances intervenant sur la cible même de l'ITK. Face à l'apparition de ces mutations secondaires, un ITK de 3^{ème} génération est à présent sur le marché. Cependant, lui aussi favorise l'apparition d'une résistance acquise lors d'une exposition continue.

2.3.4. Résistance acquise aux ITK de troisième génération

La disponibilité de cet ITK-EGFR de troisième génération (Osimertinib) étant récente, les études concernant la résistance acquise à cette thérapie sont moins nombreuses. Il est par ailleurs trop tôt pour savoir si les études cliniques vont rejoindre les prédictions des études précliniques.¹⁶⁹ Nous savons cependant que la résistance acquise mise en place va alors dépendre de trois paramètres : la nature de la mutation de sensibilité de l'EGFR, la présence ou non de la mutation de résistance p.Thr790Met et l'identité de la mutation tertiaire concourant à cette résistance.

Ce traitement a, dans un premier temps, été administré lors des rechutes sous ITK-EGFR de première génération, en présence de la p.Thr790Met. Une première étude de la résistance acquise suivant son administration conduite chez 15 patients a permis d'identifier la mutation de résistance p.Cys797Ser de l'EGFR chez 6 d'entre eux.¹⁷⁰ Pour 4 patients, la p.Thr790Met n'était plus détectée lors de la rechute, la mutation primaire étant toujours identifiée dans tous les cas. Ce variant est localisé précisément au niveau du site de liaison covalente de l'inhibiteur, diminuant son affinité de fixation.¹⁶⁹ Les cellules résistantes deviennent alors des triples mutants de l'EGFR, résistantes à tous les ITK-EGFR disponibles, en particulier si les mutations sont localisées sur le même allèle.¹⁴² Une autre étude forçant cette résistance acquise par une exposition continue au Rociletinib (ITK-EGFR de troisième génération) après une exposition à un agent mutagène insérant des mutations ponctuelles de manière aléatoire a caractérisé deux nouvelles mutations de résistance de l'EGFR, p.Leu718Gln et p.Leu844Val, ainsi que le variant p.Cys797Ser déjà mentionné.¹⁷¹ Les variants p.Gly796Ser et p.Gly796Arg ont également été rapportés comme favorisant une résistance acquise, ils sont localisés au niveau des régions hydrophobiques proches du lieu de fixation de l'inhibiteur. Cependant, certains variants peuvent favoriser une résistance acquise aux ITK de troisième génération mais être sensibles aux ITK de première génération complexifiant à nouveau la décision thérapeutique, des combinaisons peuvent alors être envisagées.¹⁶⁹

De nouveaux essais cliniques ont depuis démontré que l'apparition de la résistance acquise suite à une exposition à l'Osimertinib en première ligne apparaît plus tardivement qu'avec le Gefitinib ou l'Erlotinib (18.9 mois vs 10.2 mois). Cette thérapie est donc à présent administrée en première ligne.⁹¹ Les mécanismes de résistance commencent donc tout juste à être caractérisés et diffèrent cependant de ceux identifiés lors de l'administration du traitement en seconde ligne.¹⁷² (Tableau 3) Comme attendu, aucun variant p.Thr790Met n'a alors été détecté.

Tableau 3 : Mécanismes de résistance acquise à l'Osimertinib, ITK-EGFR de troisième génération, administré en première ou deuxième ligne.¹⁷²

Mécanismes de résistance	RA ITK en 2 nd e ligne (%)	RA ITK en 1 ^{ère} ligne (%)
	AURA	FLAURA
Perte de T790M	68	-
Maintien T790M	32	-
Mutations EGFR (C797S, G724S, L718Q...)	22	7
Amplification de l'EGFR	Démontrée ¹⁷³	-
Changements d'addiction oncogénique		
Amplifications de MET	10	15
Amplifications d'HER2	-	2
Mutations de KRAS	2	2
Mutations de BRAF	5	3
Mutations de PIK3CA	10	7
Fusions de RET	2	-
Fusions de FGFR3	2	-
Fusions de BRAF	2	-
Transformation en CBPC	15	Démontrée ¹⁷⁴
Origine non identifiée	60	-

Un ITK-EGFR de quatrième génération (EI045) est actuellement en cours de développement, il est efficace contre ces triples mutants lorsqu'il est combiné au Cetuximab (ciblant la partie extracellulaire du récepteur).¹⁷⁵ A nouveau, certains des mécanismes de résistance acquise décrits apparaissent simultanément, ils sont beaucoup plus hétérogènes et la majorité demeure d'origine inconnue.

Malgré les progrès cliniques considérables, les thérapies ciblées de manière générale disposent encore de perspectives d'évolutions considérables. Une amélioration de la détection des biomarqueurs afin de pouvoir définir le traitement le plus adapté ou d'identifier la résistance de manière plus précoce est primordiale. Les mécanismes de résistance acquise et leur importante hétérogénéité en sont l'autre versant avec pour objectif une meilleure identification ouvrant sur de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le patient. Les inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant spécifiquement l'EGFR dans les CBNPC constituent un exemple type de ces enjeux thérapeutiques et font l'objet de la première partie de ces travaux de thèse.

3. Létalité synthétique, prescription des inhibiteurs de PARP dans les cancers ovariens

3.1. BRCA1 et BRCA2 dans les cancers de l’ovaire

3.1.1. HGSOC et mutations de BRCA1/2

a) Généralités sur le cancer de l’ovaire

De par son développement asymptomatique, le cancer de l’ovaire est le cancer d’ordre gynécologique le plus mortel, avec 295 414 nouveaux cas en 2018 dans le monde (4500 à 4800 femmes en France) pour 184 799 décès.^{2,176} Il est diagnostiqué tardivement chez 75% des patientes en raison des difficultés de détection et de contrôle, 70% vont ainsi rechuter dans les 3 années qui suivent le premier traitement. En conséquence, la survie nette à 5 ans est de 46%.^{2,176,177} Les cancers ovariens d’origines épithéliaux regroupent des sous-types histologiques distincts présentant des caractéristiques génomiques différentes. En 2017, Wang et son équipe les classifient d’ailleurs en fonction des types de dommages de l’ADN et donc des signatures mutationnelles qui y sont retrouvées.⁶² (Figure 8)

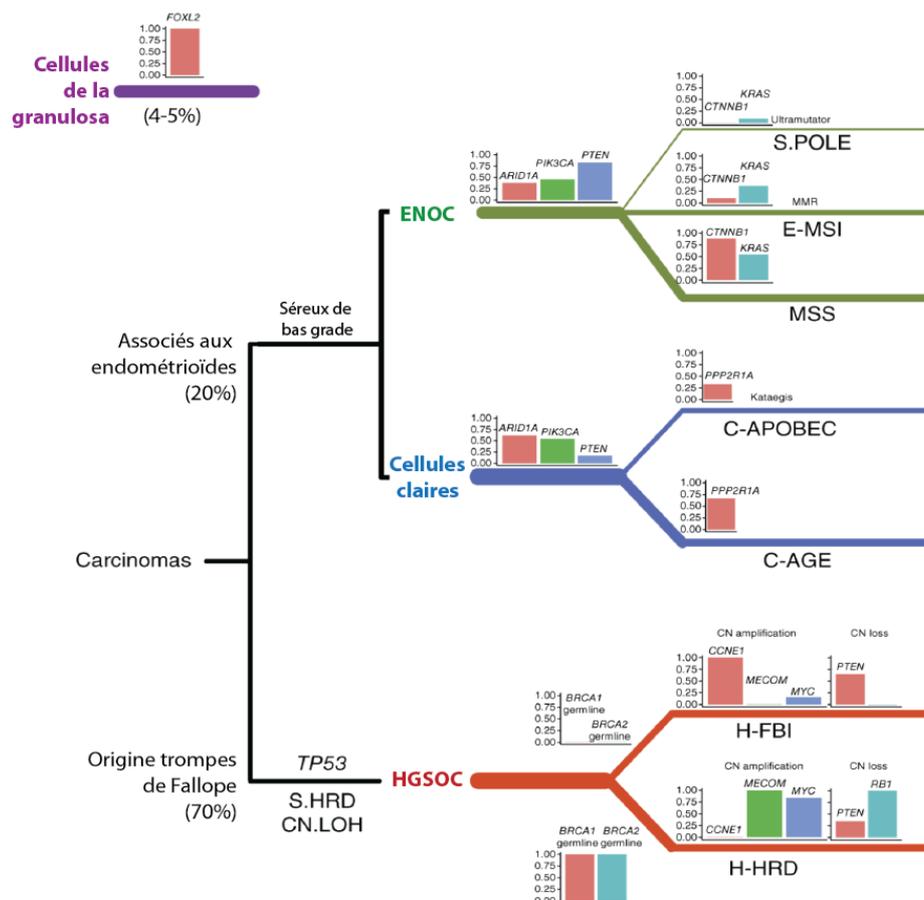


Figure 8 : Représentation schématique des différents sous-types de cancers ovariens d’origines épithéliales associés à leurs principaux biomarqueurs et signatures moléculaires.⁶²

La majorité des cancers de l’ovaire (70%) sont des cancers ovariens sévères de haut grade ou HGSOC (high grade serous ovarian cancer), que nous développerons par la suite. Les autres sous-types tels que

les endométrioïdes (ENOC - 20%), les mucineux et les cancers ovariens à cellules claires sont le plus souvent résistants à la chimiothérapie et associés à la présence de mutations oncogéniques également retrouvées dans d'autres localisations tumorales (ARID1A, PTEN, KRAS, CTNNB1, PIK3CA...).

Dans 15% des cancers ovariens, des mutations d'origines héréditaires accroissent le risque de développement tumoral.¹⁷⁸ Deux types de gènes en sont principalement responsables : les gènes BRCA1 et BRCA2 (75%) et les gènes de réparation des mésappariements ou MMR (25%).¹⁷⁶ Les mutations de BRCA1/2 sont largement associées aux HGSOC tandis que les dysfonctionnements du MMR sont préférentiellement retrouvés dans les endométrioïdes.

b) Profil mutationnel des HGSOC

Le cancer ovarien séreux de haut grade est le sous-type le plus commun. Dans la plupart des cas, il est associé à un Ki67 élevé et une chimio-sensibilité malgré le mauvais pronostic (Figure 9). D'autre part, la perte du suppresseur de tumeur TP53 semble être un événement précoce majeur de leur développement puisque 96% sont mutées.^{176,177} Ces caractéristiques leur confèrent une certaine homologie avec les cancers du sein triples négatifs. Malgré l'absence de driver oncogénique clairement établi, la mutation de TP53 est suivie de différents processus mutationnels générant une tumeur génétiquement instable avec peu de drivers et quelques altérations du nombre de copies, évoluant dans le temps mais aussi avec les différentes lignes de traitement.

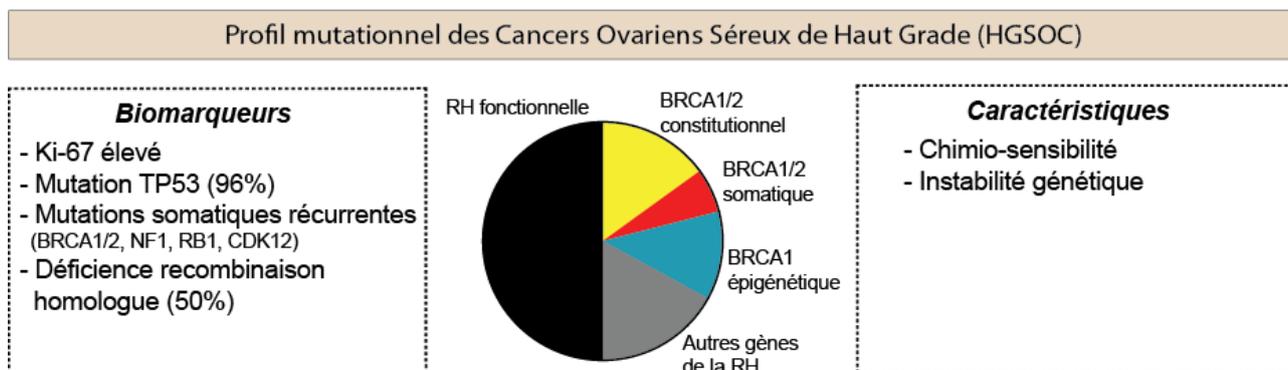


Figure 9 : Schéma reprenant les caractéristiques principales des HGSOC.

En 2011, Bell et son équipe réalisent une analyse des ARNm, des microRNA, de la méthylation de promoteurs de 489 HGSOC et les exomes de 316 d'entre eux.¹⁷⁷ Cette étude conséquente va permettre d'établir le profil mutationnel de ce sous-type ovarien et confirme les divergences avec les autres sous-types mentionnées plus tôt. Des mutations de TP53 ont alors été retrouvées dans 96% des tumeurs, 9 gènes présentaient des mutations somatiques récurrentes (NF1, BRCA1, BRCA2, RB1, CDK12...), 113 gènes avaient des altérations du nombre de copies et 168 présentaient des hyperméthylations de leur promoteur. Enfin, plus de 50% de ces HGSOC étaient également associés à une recombinaison homologue déficiente. Cette dernière fréquence a depuis été confirmée à plusieurs reprises, notamment dans une cohorte de 500 tumeurs d'adénocarcinomes ovariens de haut grade dont 25.7% étaient liés à des

altérations germinales ou somatiques de 13 gènes impliqués dans cette voie de réparation de l'ADN.^{179,180} Puis, en 2019, ces chiffres ont été associés à une classification des HGSOE d'un point de vue moléculaire les divisant en quatre : mésenchymateux, immunitaire, différencié ou prolifératif.¹⁷⁶ Mis à part ces cancers RH déficients, certaines voies de signalisations sont également communément altérées et semblent de bonnes cibles thérapeutiques : RB, RAS/PI3K, FOXM1 et NOTCH.

La recombinaison homologue déficiente chez un HGSOE sur deux peut résulter de différentes altérations, dont 33% concernent BRCA1 ou BRCA2. (Figure 9) Les 17% restants sont liés à des perturbations d'autres gènes de la recombinaison homologue (RAD51C, RAD51D, BRIP1, BARD1, PALB2, ATM...). Concernant, les altérations des suppresseurs de tumeur BRCA1 et BRCA2, 15% des HGSOE présentent des mutations constitutionnelles, 5-7% des mutations somatiques et 11 à 13% une inhibition épigénétique.¹⁷⁷ La prévalence de ces mutations d'origine héréditaire peut également varier avec l'origine ethnique, ainsi cette fréquence est plus élevée dans les populations juives ashkénazes et à moindre titre dans les populations Norvégiennes, Danoises, Islandaises et Canadiennes. D'autre part, bien que ces fréquences soient identiques entre les populations de l'Ouest de l'Europe et Chinoises, les spectres mutationnels quant à eux varient.¹⁸¹ Ces mutations germinales n'affectent qu'un seul des deux gènes simultanément et sont héritées de manière autosomique dominante.

c) Mutations germinales de BRCA1 et BRCA2

Dès 2002, les implications de BRCA1 et BRCA2 dans la tumorigénèse sont bien connues, la présence d'une mutation germinale pathogène élevant le risque d'avoir un cancer du sein avant 70 ans à 85%.¹⁸² L'instabilité génétique générée par leur perte est étudiée, notamment au niveau de la structure des chromosomes.¹⁸³ Plus récemment, des études ont également prouvé que des mutations de ces gènes prédisposent aux cancers de l'ovaire, de la prostate, du pancréas ou encore de l'estomac et du larynx. Ainsi, tandis qu'environ 1.3% des femmes ont un risque de développer un cancer de l'ovaire, ce chiffre passe à environ 40 à 60% en présence d'une mutation de BRCA1 et 11 à 27% pour BRCA2.^{180,181} Avec des mutations de BRCA2, le risque relatif est multiplié par 20 dans la prostate (risque de développement d'un cancer de la prostate en présence d'une mutation de BRCA2 de 0.1%) et par 10 dans le pancréas (0.5%).¹⁸⁴ D'autre part, bien que toutes deux prédisposent à la tumorigénèse, les mutations de BRCA1 et BRCA2 n'ont pas les mêmes conséquences, des différences étant observées au niveau de la localisation tissulaire, du sexe de la personne ou encore de la pénétrance de la maladie. Cette prédisposition majoritairement dans les cancers du sein et de l'ovaire est probablement liée aux forts signaux prolifératifs hormonaux que subissent les cellules au cours des cycles menstruels. Par ailleurs, les cellules mutées BRCA1 présentent également fréquemment une déficience en récepteur à l'estrogène (ER). Une autre théorie à cette prédisposition met en cause les ROS surexprimées suite aux variations hormonales au cours des cycles menstruels, ces ROS causeraient des dommages de l'ADN et la génération d'un stress répliatif non pris en charge en raison de la perte de BRCA1 ou 2.¹⁸⁵

De par cette hérédité, le statut BRCA1/2 des patientes devient un enjeu thérapeutique et théranostique majeur avec une réelle valeur pronostique. Leurs évaluations génétiques sont essentielles pour la prise en charge du risque, l'administration du traitement et la prévention pour la patiente elle-même mais aussi pour ses apparentés. Suite à des consultations oncogénétiques, les femmes porteuses de mutations germinales de BRCA1 ou 2 se voient donc proposer des chirurgies prophylactiques (salpingo-ovariectomie bilatérale) pour réduire le risque de développement tumoral.^{176,177}

d) Une perte d'hétérozygotie essentielle ?

BRCA1 et BRCA2 sont des suppresseurs de tumeurs, une perte de fonction des deux allèles est donc attendue afin de faciliter le développement tumoral. Ainsi, en parallèle de la mutation de BRCA1 ou BRCA2 (somatique ou constitutionnelle), une perte de l'allèle sauvage appelée aussi perte d'hétérozygotie (LOH) a initialement été reportée. Cependant, ce paradigme a récemment été remis en question. Tandis que la perte des deux allèles de BRCA1, BRCA2 ou RAD51 est létale, certaines études ont pu mettre en évidence que des souris *Brca1*+/- et *Brca2*+/- n'avaient pas d'augmentation de la tumorigénèse par rapport à des souris WT.^{186,187} Pourtant, dans les souris *Brca1*+/- *Trp53*+/- une légère augmentation des carcinomes mammaires était observée par comparaison aux souris *Trp53*+/- . L'ensemble des tumeurs présentaient un maintien du niveau d'expression de BRCA1 écartant l'hypothèse d'un silencing épigénétique. Des résultats similaires ont été observés avec BRCA2.^{186,188,189} De même, une étude conduite sur 30 patientes atteintes de cancers du sein mutés BRCA1/2 n'a pu mettre en évidence une perte d'hétérozygotie chez seulement 18 patientes.¹⁹⁰ Cependant, une seconde étude fait état de 80 LOH sur 90 cas de tumeurs mammaires présentant des mutations de BRCA1/2 ou hyperméthylation de BRCA1.²² Il faut cependant garder à l'esprit la méthode d'analyse de la LOH dans le tissu tumoral car une faible contamination d'allèle WT provenant du tissu sain est envisageable. Ces différents arguments prouvent que la LOH ne serait donc pas indispensable à la tumorigénèse des HGSOc mutés BRCA1/2, sa significativité en tant que biomarqueur serait quant à elle discutable.

Le statut de TP53 semble lui jouer un rôle crucial. Muté dans 50% des cancers, cette fréquence est beaucoup plus élevée dans les tumeurs mutées BRCA1/2. De nombreuses études suggèrent une coopération entre la perte de TP53 et BRCA1/2. Certaines mutations de TP53 y sont par ailleurs particulièrement associées tels que p.Thr150Ile, p.Gly199Arg et p.Arg202Ser. Les cellules tumorales conservent alors leurs activités de transactivation des points de contrôles et pro-apoptotiques mais ne parviennent plus à contrer leur transformation.¹⁹¹ De même, la perte d'ATM et de CHK2, agissant dans la même voie de signalisation que TP53, favorisent le développement tumoral chez les souris mutées BRCA1 mais de façon moins importante. D'autre part, les pertes simultanées de RB1 sont associées à un bon pronostic.¹⁹² Ainsi, la cooccurrence avec certaines mutations semble à la fois indispensable au développement tumoral et pourrait avoir une valeur prédictive.

3.1.2. Rôles de BRCA1 et BRCA2

Localisés sur deux chromosomes différents, les suppresseurs de tumeurs BRCA1 et BRCA2 (Breast Cancer Associated Genes) sont deux grands gènes d'environ 70kb, riches en séquences répétées. Ne possédant pas d'orthologue chez la levure, ils sont donc apparus tardivement au cours de l'évolution avec un rôle fondamental chez le mammifère.¹⁸³ Bien que ces deux protéines soient toutes deux centrales dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN par recombinaison homologue, elles n'ont pas d'activité redondante et ont d'ailleurs très peu d'homologie entre elles.¹⁸¹

a) Recombinaison homologue : mécanismes et implications de BRCA1/2

La recombinaison homologue permet la réparation des cassures doubles brins (CDB) de l'ADN qui peuvent apparaître suite à la réplication, l'exposition à des radiations ionisantes ou encore à d'autres composants génotoxiques. Les cassures simples brins (CSB) peuvent également être converties en cassures doubles brins au cours de la réplication. Découverte dès le milieu des années 90 et quantifiée lors de la découverte de Rad51 chez la souris, la RH est essentielle au maintien de l'intégrité du génome.^{193,194} Ainsi, une séquence d'ADN homologue intervient pour guider la réparation avec une haute fidélité : c'est un mécanisme conservateur des cellules proliférantes. Elle intervient donc pendant les phases S tardives et G2 du cycle cellulaire, ce qui est d'ailleurs une différence majeure avec la NHEJ qui peut intervenir à tout moment.^{184,195} Cette dernière est non conservatrice et va fusionner les extrémités des CDB sans tenir compte de la séquence homologue conduisant à l'apparition d'insertions ou de délétions de matériel génétique. Certaines de ces mutations peuvent alors promouvoir le développement tumoral expliquant la prédisposition à la carcinogénèse en cas de mutations germinales de BRCA1/2.¹⁹⁵ En effet, lors d'un défaut des protéines impliquées dans la RH, la NHEJ prend le relais. De même, la RH est augmentée lorsqu'un des composants de la NHEJ est muté.¹⁹⁶⁻¹⁹⁸ Il s'agit donc d'une compétition réelle entre ces deux mécanismes de réparation, la liaison des composants de la NHEJ à l'ADN empêchant la résection nécessaire à la RH. Cette RH est également contrôlée par l'intermédiaire de ses cibles pendant les différentes phases du cycle cellulaire. Cette régulation est effectuée par les CDK ou encore par l'hélicase B qui supprime la résection pendant la phase G1, PALB2 est dégradée par le protéasome au cours de cette phase du cycle. Enfin, l'état de la chromatine au cours de la phase S peut également être impliqué.¹⁹⁹

La première étape de la RH comprend la coupure puis la résection des extrémités de la CDB. (Figure 10, étapes 1 et 2) Celle-ci est réalisée par le complexe MRN (composé de MRE11, RAD50 et NBS1) servant d'échafaudage à l'activation d'ATM. Brièvement, l'activité endonucléasique de MRE11 coupe l'ADN jusqu'à 300nt en amont de la cassure et son activité 3'-5' exonucléasique forme un ADN simple brin (ADNsb) en 5' avant de promouvoir le recrutement des hétérotrimères Replication Protein A (RPA1, RPA2 et RPA3) au niveau du site CDB. La présence de l'endonucléase CtBP Interacting protein (CtIP) appelée aussi RBBP8 est nécessaire à l'activité de MRE11. Puis, l'exonucléase EXO1 dont l'activité est stimulée par l'hélicase BLM, digère le brin 5' afin de former la queue en 3' d'ADNsb. A nouveau, des RPA sont recrutés sur le site pour maintenir l'ouverture des structures secondaires de l'ADN. MRE11 et CtIP sont des cibles de la

phosphorylation par les CDK, limitant ainsi la résection aux phases S et G2 du cycle cellulaire.²⁰⁰ A l'issue de cette étape, l'ADNsb formé est essentiel à l'invasion par RAD51, il est lui aussi protégé par des RPA.

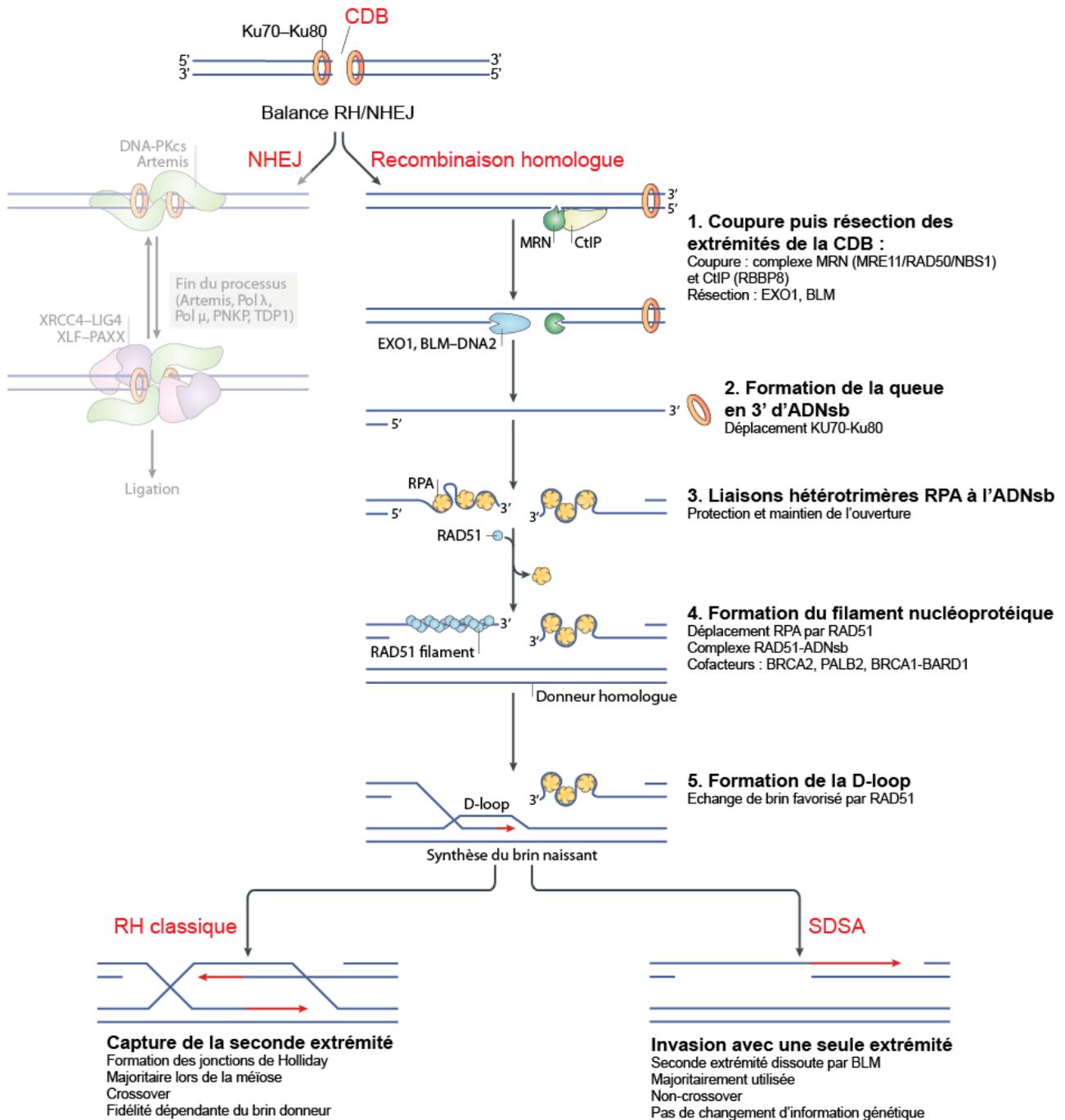


Figure 10 : Représentation schématique de la recombinaison homologue intervenant suite à des cassures doubles brins de l'ADN. Modifié depuis Scully et al, 2019¹⁹⁹

La seconde étape majeure de ce mécanisme de réparation comprend la formation du filament nucléoprotéique, structure dynamique composée de RAD51, une ATPase DNA-dépendante, et de l'ADNsb précédemment formé.^{201,202} (Figure 10, étapes 3 et 4) Les RPA permettent dans un premier temps d'empêcher la fixation de RAD51 sur l'ADNsb car des cofacteurs (parmi lesquels BRCA2, PALB2, BRCA1-BARD1) sont nécessaires au préalable. Puis, une fois le filament nucléoprotéique formé, RAD51 catalyse l'étape biochimique cruciale de la RH : l'invasion du duplex homologue par l'ADNsb. (Figure 10, étape 5) Si

la complémentarité entre l'ADNsb et l'homologue est suffisante, la synapse est stabilisée et le brin non lié est déplacé formant la D-loop (displacement loop), un complexe synaptique supportant la formation d'une hélice intermédiaire à trois ADN.^{199,200} Le duplex homologue envahit, appelé aussi duplex donneur, sert de modèle pour la réparation.

Différentes recombinaisons homologues interviennent finalement, en fonction du devenir de la synapse formée par RAD51. (Figure 10) La seconde extrémité de l'ADN est, en effet, soit dissoute par l'hélicase BLM pour former un non-crossover (pas de changement d'information génétique), soit capturée pour former les jonctions de Holliday conduisant à un crossover. Puis, une DNA polymérase (principalement Pol δ) est recrutée à l'extrémité 3' du brin invasif utilisant le brin homologue comme modèle. Finalement, le duplex ADN néoformé est dissocié par une ATP hydrolase.²⁰⁰

La SDSA (synthetic dependant strand annealing) est majoritairement utilisée, l'invasion de duplex dirigée par RAD51 est alors effectuée avec seulement une des deux extrémités de la CDB tandis que la résection de l'autre est effectuée mais reste passive, la terminaison par liaison au brin naissant est alors facilitée. C'est un non-crossover. La classique RH est majoritaire lors de la méiose permettant la génération de cellules germinales haploïdes, un crossover a lieu suite à la formation de jonction de Holliday. La fidélité de la RH va entièrement dépendre du brin donneur homologue servant de modèle lors de la réparation. Il peut s'agir du chromatide sœur, la restauration sera alors complète, ou du chromosome homologue. Dans ce dernier cas, une perte d'hétérozygotie peut être observée car l'information du chromosome homologue est copiée au détriment de celle du chromosome parental. Cependant, cela reste moins fréquent en raison de la proximité, de la similarité des séquences et de la cohésion physique.¹⁹⁹ La RH inter-homologue est responsable de certains développements tumoraux comme les rétinoblastomes héréditaires où elle conduit à la perte de RB1 WT dans 40% des tumeurs même si, le plus souvent, la NHEJ reste responsable des réarrangements chromosomiques.

La présence de mutations de BRCA1 ou 2 est tout à fait caractéristique d'une déficience de la recombinaison homologue. Sont retrouvées une instabilité chromosomique spontanée avec induction de dommages, une absence de formation de foci RAD51, une sensibilité aux radiations ionisantes, une sensibilité ICL sévère ou encore une anomalie des centrosomes.¹⁸⁶ Mais, alors qu'une augmentation de la NHEJ est observée en parallèle des mutations de BRCA1, ce n'est pas le cas avec BRCA2 soulignant leurs rôles différents. BRCA1 est donc impliqué plus précocement dans la voie de la recombinaison homologue.

b) BRCA1, médiateur de la recombinaison homologue et autres rôles multiples

Localisée au niveau du chromosome 17 (17q21), les 22 exons de BRCA1 codent pour une protéine pléiotropique de 1863 acides aminés. Fondamentale dans le processus de recombinaison homologue, elle joue le rôle de médiateur liant senseurs et effecteurs de la réparation des CDB et intervient donc aux différentes phases du processus. Cependant, cette protéine aux rôles multiples interagit également avec

des suppresseurs de tumeur, des protéines de la réparation, des régulateurs du cycle et de la transcription à travers ses différents domaines et partenaires protéiques (Figure 11).

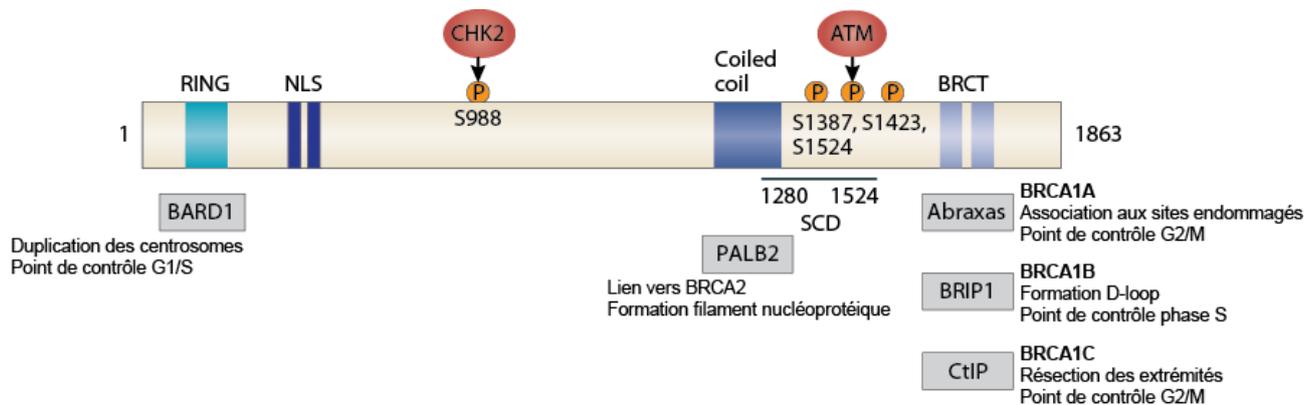


Figure 11 : Représentation schématique de la structure protéique de BRCA1 et visualisation des différents domaines ainsi que des partenaires protéiques qui y sont associés. Modifié depuis Roy et al, 2011.¹⁸⁴

Les mutations de BRCA1 sont principalement localisées au niveau de ses domaines RING et BRCT où elles vont le plus impacter sa fonctionnalité. Le domaine RING, impliqué dans l'ubiquitinylation des protéines, contient une E3 ubiquitine ligase, c'est à ce niveau que va s'associer la protéine BARD1 catalysant cette activité.^{184,203} L'hétérodimère formé contrôle la duplication des centrosomes en régulant l'ubiquitination des gamma-tubuline²⁰⁴ et joue un rôle dans la vitesse de progression de la fourche de réplication.²⁰⁵ L'activité du complexe peut être inhibée par BAP1. Enfin, ce complexe BRCA1-BARD1 est impliqué dans l'activation du point de contrôle G1/S du cycle cellulaire. En effet, BRCA1 facilite la phosphorylation de p53 sur la sérine 15 nécessaire à la transcription de l'inhibiteur de CDK, p21.¹⁸⁴ Une étude de l'impact fonctionnel d'un variant de ce domaine dans un modèle murin a permis de confirmer cette fonction.¹⁸⁶ En effet, le variant C61G de BRCA1 empêche l'hétérodimérisation avec BARD1 mais n'altère pas la RH, ce qui reste suffisant pour favoriser une sensibilité aux inhibiteurs de PARP.

BRCA1 comprend également deux domaines BRCT en C-terminal placés en tandem. Ils sont composés de répétitions d'environ 90 AA favorisant l'interaction avec des protéines phosphorylées au niveau des sérines du motif SXXF par ATM. Ainsi, BRCA1 va pouvoir se lier à différentes protéines formant des complexes distincts avec des rôles propres :

- Complexe BRCA1A : Abraxas se lie directement au domaine BRCT permettant le recrutement de RAP80, lui-même associé aux histones H2AX polyubiquitinylés. Ce complexe permet le recrutement de BRCA1 au niveau des sites de dommages. Le complexe BRCA1-Abraxas-RAP80 est également impliqué dans la régulation du point de contrôle G2/M activé suite à des dommages de l'ADN par radiation ionisantes.¹⁸⁴ Ils assurent une inhibition transitoire de l'entrée en mitose afin d'éviter une ségrégation aberrante des chromosomes.²⁰³ En effet, les cellules ayant perdu Abraxas ou RAP80 n'ont plus d'accumulation de BRCA1 au niveau des sites de dommages ainsi qu'une perte du point de contrôle G2/M du cycle cellulaire.²⁰⁶

- Complexe BRCA1B : La DNA hélicase BRIP1 se lie également au domaine BRCT suite à sa phosphorylation, elle permet de dérouler l'ADN en déplaçant les protéines du site endommagé. Un excès de BRIP1 peut également inhiber la formation de la D-loop. Ce complexe BRCA1-BRIP1-TOPBP1 est nécessaire au point de contrôle de la phase S en réponse à un blocage ou un arrêt de la fourche de réplication.
- Complexe BRCA1-C : CtIP phosphorylé par les CDK se lie au domaine BRCT pour permettre la résection des extrémités de la CDB. Cette résection CtIP-dépendante a lieu pendant les phases S et G2, promeut le RH et inhibe la NHEJ. Le complexe BRCA1-CtIP-MRN joue un rôle essentiel dans la détection des dommages et l'activation de la voie ATM-ATR, importante pour le point de contrôle G2/M.

D'autre part, le domaine SCD (SQ/TQ cluster domain) de BRCA1 comprend une dizaine de sites pouvant être phosphorylés par ATM. BRCA1 comprend finalement un quatrième domaine d'interaction présent en amont des répétitions BRCT, le domaine superhéliçoïdal (coiled-coil), permettant son association à PALB2. PALB2 fait ainsi le lien entre BRCA1 et BRCA2. Phosphorylée par ATM/ATR, BRCA1 régule à son tour la phosphorylation de différentes protéines de cette voie telles que p53, NBS1, Chk1 et Chk2.²⁰³ Ces phosphorylations sont différentes selon les stress subis par la cellule prouvant l'implication de BRCA1 dans des voies bien distinctes en fonction de ses partenaires protéiques.

c) BRCA2 : effecteur de la recombinaison homologue

Le gène de BRCA2, localisé au niveau du chromosome 13 (13q12.3), comprend 27 exons et code pour une protéine de 3418 AA. Il possède plusieurs domaines qui assurent principalement sa liaison à RAD51 et à l'ADN.^{184,207} (Figure 12) BRCA2 est, en effet, un médiateur de la formation du filament nucléoprotéique essentiel à sa fonction prédominante, la recombinaison homologue. Ainsi, les cellules déficientes en BRCA2 ne peuvent plus recruter RAD51.²⁰⁸ Le second rôle de BRCA2 est au niveau de la protection de la fourche de réplication. Le variant p.Ser3291Ala de BRCA2 ne perturbe pas la recombinaison homologue mais va induire un défaut de protection de la fourche de réplication, favorisant une sensibilité aux inhibiteurs de PARP.²⁰⁹

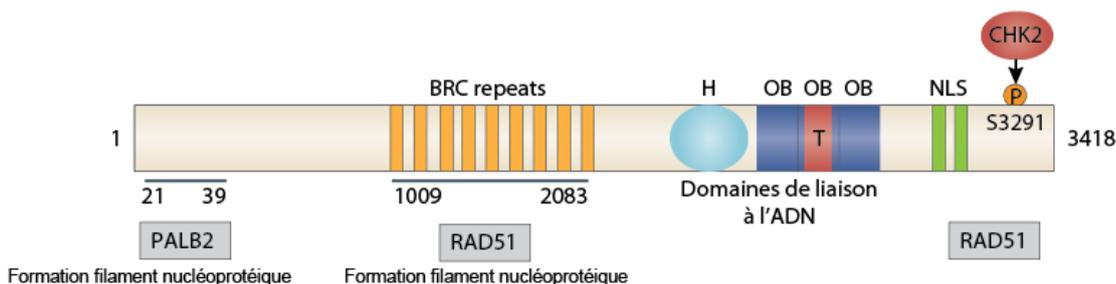


Figure 12 : Représentation schématique de la structure protéique de BRCA2 et visualisation des différents domaines ainsi que des partenaires protéiques qui y sont associés. Modifié depuis Roy et al, 2011.¹⁸⁴

Au centre, BRCA2 comprend 8 domaines répétés comprenant une trentaine d'acides aminés appelés BRC 1 à 8. Ces derniers présentent tout de même quelques distinctions, ce qui explique leurs affinités d'association différentes avec RAD51. Un seul d'entre eux permet la formation du filament nucléoprotéique en présence d'ATP, en maintenant la forme active de la liaison RAD51-ADNsb. Certains vont accélérer le déplacement des RPA par RAD51 et tous vont stimuler l'invasion et l'échange de brin indispensable à la RH.²⁰⁷ BRCA2 possède également un domaine carboxy-terminal qui, après avoir facilité le recrutement de RAD51 au niveau des ADNsb suite à la résection des extrémités, permet de stabiliser le filament nucléoprotéique.²¹⁰ D'autre part, BRCA2 comprend plusieurs domaines de liaison à l'ADN (DBD) non indispensables à la RH : une α -hélice, 3 domaines OB de liaison aux oligonucléotides et un tower domain (TD) liant l'ADN double brin.

Enfin, BRCA2 comprend un domaine d'interaction avec PALB2 situé en N-terminal, permettant le lien physique entre BRCA1 et BRCA2. Cette interaction semble être dépendante d'une phosphorylation préalable par Chk2 au niveau de la sérine 988 de BRCA1. Des mutations de cet acide aminé induisent une déficience en RH mais la régulation des points de contrôles mitotique est conservée favorisant une résistance aux radiations ionisantes et soulignant la complexité de la régulation et les rôles multiples que peuvent jouer ces protéines.

Le Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA) sur plus de 31 000 mutations de ces gènes a confirmé l'augmentation du risque de développement de cancer et son lien avec la position et le type de mutation. Les rôles primordiaux de ces protéines pour l'intégrité du génome expliquent leurs fréquentes altérations en cancérologie. Récemment, des progrès thérapeutiques considérables ciblant les variants pathogènes de BRCA1/2 ont été réalisés grâce au développement des iPARP.

3.2. iPARP : mécanismes d'action et mise au point des inhibiteurs

L'apparition des inhibiteurs de PARP fait suite à l'application du concept de létalité synthétique, mentionné précédemment. Dans ce contexte, c'est l'inhibition conjointe de la recombinaison homologue (mutations BRCA1 ou BRCA2) et des protéines PARP par l'intermédiaire des iPARP. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de ces traitements, nous commencerons par détailler le rôle des protéines qu'ils ciblent.

3.2.1. Rôles des membres de la famille PARP

L'ensemble des inhibiteurs actuels ciblent au moins la protéine PARP1, une abondante protéine nucléaire. Cependant, il existe 17 enzymes PARP distinctes identifiées sur les bases de leur homologie avec PARP1. Elles sont donc divisées en 4 sous-familles en fonction de leur architecture : les DNA-dépendant PARP (PARP1, 2, 3), les tankyrases, les CCCH (Cys-Cys-Cys-His) et les macro-PARP.²¹¹ Seuls PARP 1 à 3 vont jouer un rôle dans la réparation par excision de base (BER) et vont donc nous intéresser ici.²¹²

a) La PARylation, actrice de la signalisation cellulaire

L'activité des membres de la famille PARP est étroitement liée à celle de la signalisation cellulaire. Ce sont des ADP-ribosyl transferase transmettant un groupe ADP-ribose négativement chargé d'un donneur NAD⁺ vers les résidus Glu, Asp ou Lys de la protéine cible : c'est la PARylation. Cette activité est permise par un domaine catalytique comprenant 3 résidus : His-Tyr-Glu. Tous les membres de la famille PARP ne possèdent pas cette activité et certains fonctionnent plutôt comme des monoADP-ribose transférase.²¹¹ La PARylation des protéines permet une adaptation rapide au stress par trois grands types de régulations : l'inhibition des interactions protéine-protéine ou protéine-acide nucléique, la régulation de la localisation des protéines ou la promotion de leurs interactions et enfin la régulation de l'ubiquitinylation. Elle intervient ainsi dans de nombreux processus cellulaires tels que la réparation de l'ADN, la régulation transcriptionnelle, l'interférence ARN, les fonctions mitochondriales ou encore les divisions cellulaires. Cette implication directe de la PARylation dans la biologie cellulaire suppose une destruction catabolique rapide et coordonnée des résidus PAR. Ainsi, des protéines, les PARG (polyADP-ribose glycohydrolase) et les ARH (ADP-ribosyl hydrolase), les dégradent presque immédiatement après leur synthèse.²¹¹

Les modifications post-traductionnelles peuvent également altérer et réguler l'activité des membres de la famille PARP en influant sur la reconnaissance de leurs cibles. D'ailleurs, cette interaction reste encore très méconnue, l'architecture du domaine d'interaction de chaque membre est probablement importante. En ce qui concerne PARP1 et ses partenaires, le domaine BRCT de BRCA1 se liant aux phosphoprotéines dirige leurs interactions.²¹¹ D'autre part, la PARylation du domaine BRCT de BRCA1 par l'intermédiaire de RAP80 est un préalable à la RH puisqu'elle permet l'association avec Abraxas et la formation du complexe BRCA1A.²¹³ La perte de cette régulation va favoriser une RH excessive, une instabilité génétique et la tumorigénèse.

A ce jour, ce sont surtout les fonctions de PARP1, PARP2 et des tankyrases qui ont été caractérisées et ce majoritairement de par leur rôle dans la réparation des cassures simples brins de l'ADN.

b) Rôle capital de PARP dans la réparation des CSB

PARP1 et PARP2 possèdent un domaine de liaison à l'ADN, comprenant 3 motifs zinc-finger, qui leur permettent la reconnaissance de structures secondaires de l'ADN tels que les cassures simples et doubles brins, les structures cruciformes et les nucléosomes. La liaison de PARP1 à l'ADN entraîne un changement de conformation de la protéine et une modulation de son site actif. Lors de la présence d'une CSB, l'accumulation de résidus chargés négativement par PARylation facilite le recrutement des effecteurs de la réparation.

Les implications de PARP1 et PARP2 dans la voie SSBR (Single-stranded break repair), une forme de BER, sont les plus connues. Ces protéines servent alors à la fois de senseurs et de transducteurs des signaux. PARP1 se lie à la cassure simple brin et initie le processus de détection à l'aide de son domaine en doigt de zinc. La protéine change alors de conformation et s'auto-PARyle avant de réaliser la PARylation de la zone

endommagée pour faciliter le recrutement des effecteurs tels que XRCC1 et les histones H1 et H2B.²¹⁴ Cependant, le rôle de PARP1 dans le BER est controversé. Ainsi, il a été démontré que PARP1 n'est pas indispensable au BER dans les cellules mais réduit le renouvellement de ses composants, les cellules non RH déficientes ne sont pas affectées par les iPARP.²¹⁵⁻²¹⁷ Les KO des principaux acteurs de la BER (APE1, Polβ ou XRCC1) chez la souris entraînent une létalité embryonnaire ce qui n'est pas le cas des souris PARP1-/-.²¹⁶⁻²¹⁸ D'autre part, tandis que la réparation par BER est très hautement conservée à travers l'évolution des espèces, ce n'est pas le cas des protéines PARP.

De manière intéressante, les inhibiteurs de PARP ont des effets totalement contraires à ceux observés lors de la déplétion de PARP1 par siRNA. En effet, ces iPARP vont bien inhiber la BER en piégeant les intermédiaires de la réparation sur l'ADN.²¹⁵ Ainsi, lors de l'inhibition de l'activité des PARP, la réparation des cassures simples brins de l'ADN est bien évidemment compromise. Cependant, l'efficacité des inhibiteurs de PARP n'est pas seulement liée à leurs impacts sur les voies de réparation de l'ADN.

c) Implication des PARP dans le contrôle de la fourche de réplication

Dans les cellules humaines, des milliers d'origines de réplication sont activées de manière coordonnée pendant la phase S du cycle cellulaire, la vitesse de la fourche de réplication est ainsi finement ajustée. Lors d'un stress réplicatif, cette fourche est bloquée alimentant l'instabilité génomique de la carcinogénèse. Or, contrairement aux premières hypothèses, l'inhibition de PARP accélère la vitesse de progression de la fourche de réplication de 40% exacerbant l'apparition des dommages de l'ADN.²¹⁹ Les protéines PARP sont donc des modulateurs cruciaux de sa vitesse de progression au même titre que les suppresseurs de tumeurs p21 et p53. Ainsi, PARP1 et p53 coordonnent la PARylation de l'ADN ainsi que p21, suppresseurs de la vitesse de progression de la fourche de réplication.²¹⁹⁻²²¹

PARP1 et PARP2 sont donc des senseurs du stress réplicatif, activés par le blocage, mais sont également capables de la relancer en collaborant avec Mre11.²²² Leurs rôles à la fois dans la réparation des cassures simples brins et dans la régulation fine de la réplication de l'ADN en font des acteurs clés de l'instabilité génétique caractéristique en cancérologie. Ces éléments démontrent d'autant plus l'intérêt de leur inhibition thérapeutique.

3.2.2. Les iPARP en clinique, premières thérapies basées sur la létalité synthétique

Les iPARP développés depuis une quinzaine d'années représentent un agent thérapeutique émergent de choix dans différentes pathologies humaines impliquant des stress génotoxiques ou pro-inflammatoires tels que les infections, l'obésité, les maladies cardio-vasculaires et bien sûr les maladies cancéreuses.²¹¹

a) Apparition des iPARP et mécanismes d'action

Les iPARP sont les premières thérapies anticancéreuses basées sur le concept de létalité synthétique. Leur développement a commencé il y a 30 ans, par observation d'une faible capacité inhibitrice des

analogues du nicotinamide et du NADH (produit de l'activité catalytique de la PARylation). Ces molécules inhibent la PARylation, augmentant la cytotoxicité et les dommages de l'ADN, ils sont donc d'abord considérés comme des chimio-sensibilisateurs.¹⁹⁵ Initialement, le postulat était que l'ajout d'iPARP aux traitements de chimiothérapies ou radiothérapies conventionnelles potentialiserait l'accumulation de dommages de l'ADN. Des essais cliniques associant fortes doses d'iPARP à des faibles doses de chimiothérapies sont donc en cours actuellement.^{223,224}

En 2005, deux équipes décrivent le mécanisme de létalité synthétique dans des cellules souches embryonnaires humaines présentant une recombinaison homologue déficiente (mutations de BRCA1 ou 2) suggérant l'idée d'une nouvelle stratégie thérapeutique.^{63,64,225} Ils démontrent qu'en présence d'une RH dysfonctionnelle, les cellules sont 1000 fois plus sensibles à l'inhibiteur, des CSB non réparables apparaissent favorisant une accumulation de CDB puis une catastrophe mitotique. Nombre d'études font donc état de cette double implication PARP/RH dans le maintien de la stabilité du génome mais se pose alors la question de celle de la NHEJ. En effet, le rôle crucial de cette voie de réparation a été démontré dans les cellules ayant une RH déficiente sous inhibiteur de PARP.²²⁶ Une augmentation de la phosphorylation de DNA-PK est alors observée signant une activité plus importante de la NHEJ lors de l'ajout d'iPARP ou de siPARP sur des cellules BRCA déficientes. De manière intéressante, la déplétion de DNA-PK, de LIG4 ou de KU80, donc l'inhibition de cette NHEJ, reverse la sensibilité aux iPARP ou siPARP.^{226,227} Cette observation permet de confirmer le rôle crucial de la NHEJ dans cette létalité synthétique. En effet, les CSB sont alors accumulées puis transformées en CDB lors de la réplication, seule la NHEJ peut alors intervenir favorisant l'incorporation d'insertions et/ou de délétions dans le génome conduisant à la mort par catastrophe mitotique. Cela souligne également l'importance de la balance entre RH et NHEJ, la régulation fine de ces deux mécanismes de réparation des cassures doubles brins est essentielle pour la biologie des cellules.²²⁸

A ce jour, plusieurs industries pharmaceutiques ont mis sur le marché des iPARP, d'autres sont encore en phase de développement. Ces molécules vont interagir au niveau du domaine catalytique de la protéine mais vont avoir des effets cytotoxiques différents car ils ne ciblent pas la protéine de la même façon. Certains (Rucaparib, Olaparib, Niraparib et Talazoparib) vont piéger PARP1 et PARP2 sur l'ADN et ainsi empêcher son auto-PARylation et son relâchement du site endommagé ce qui perturbe le cycle catalytique de la protéine. D'autre part, le fait de piéger la protéine sur l'ADN empêche l'action de la machinerie de réplication et accélère la vitesse de la fourche de réplication. Cela semble d'ailleurs le mécanisme principalement responsable de la toxicité des iPARP, car le piégeage de la protéine au niveau des cassures est plus cytotoxique que l'inactivation seule. Le Veliparib va lui principalement inhiber la PARylation.¹⁹⁵ Cette capacité à piéger PARP est différente selon les inhibiteurs avec l'ordre suivant : Niraparib > Olaparib >>Veliparib.²²⁹ D'autre part, cette étude permet également de mettre en évidence, mis à part la RH, d'autres voies essentielles à la formation des complexes PARP-ADN telles que la réparation post-réplication, la voie associée à l'anémie de Fanconi, la polymérase β ou FEN1, suggérant d'autres applications à ces inhibiteurs.

b) Les différentes molécules inhibitrices de PARP en clinique

L'Olaparib ou AZD2281 (Astrazeneca, KuDOS) est le premier iPARP à obtenir son AMM en 2014. Lors de la phase I, il est administré aux patients présentant des mutations germinales de BRCA1/2 ayant reçus au moins trois lignes de chimiothérapies. 63% des patients ont alors montré un bénéfice clinique, les effets secondaires étant inférieurs à ceux observés avec les agents de chimiothérapies classiques. L'essai est alors étendu, permettant de démontrer une corrélation entre sensibilité aux sels de platine et aux iPARP. D'autre part, 15% des patients mutés BRCA1/2 ayant reçu l'Olaparib sont des répondeurs longs, ils sont stables 5 ans après le début du traitement. Une étude approfondie de ce type de réponse pourrait permettre d'identifier des marqueurs prédictifs ainsi que de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Le Niraparib (Merk, Tesaro) est le premier iPARP à obtenir une AMM donnant accès au traitement sans mutation de BRCA1/2 chez les femmes présentant des HGSO, en rechutes sensibles au platine.²³⁰ Cependant, une PFS encore plus importante est observée chez les patientes ayant des mutations germinales de BRCA1/2, ce qui est cohérent avec les effets observés sur le piégeage de PARP. Depuis, d'autres iPARP ont été développés tels que le Veliparib (Abbvie), le Rucaparib (Pfizer, Clovis) et plus récemment le Talazoparib (Lead/Biomarin/Medivation/Pfizer).

Le tableau ci-dessous (Tableau 4) reprend les différents essais cliniques des principaux iPARP. Sont répertoriés uniquement les essais de phase II ou de phase III ayant déjà publiés leurs résultats dans les différentes localisations tumorales. Les AMM ou autorisation temporaire d'utilisation (ATU) y sont associées lorsque les thérapies sont disponibles en clinique.

Tableau 4 : Principaux iPARP disponibles en cliniques associés aux localisations tumorales dans lesquels ils sont administrés.

iPARP	Localisations	Essais cliniques	AMM et ATU	Prescriptions	Ref
Olaparib (Lynparsa)	Ovaire	Study 19 SOLO 1 et 2 PAOLA 1 (ESMO 2019)	Décembre 2014 Juin 2019	Rechute, platino-sensible, muté BRCA (germinal ou somatique) 1 ^{ère} ligne, platino-sensible, muté BRCA (germinal ou somatique) Maintenance, non muté BRCA	231,232
	Sein	OlympiAD		RH+ et triple négatifs	233
	Prostate	PROfound		Métastatique résistant à la castration, muté BRCA ou ATM	234
	Pancréas	POLO1			235

Niraparib (Tesaro)	Ovaire	NOVA PRIMA (ESMO 2019)	Novembre 2017	Rechute platino-sensible, non muté BRCA 1 ^{ère} ligne, platino-sensible, non muté BRCA	230,236
Rucaparib (Rubraca)	Ovaire	ARIEL 3	Mars 2018	Rechute platino-sensible, muté BRCA (germinal ou somatique)	237
Talazoparib (Talzenna)	Sein	EMBRACA	Juin 2019	Avancé ou métastatique, muté BRCA (germinal ou somatique), non muté HER2, non résistante au platine	238,239
	Ovaire	NCT02326844			240
Veliparib (ABT-888)	Cancer bronchique à petites cellules	NCT01642251			241

Concernant le Veliparib, des essais ont été réalisés dans de nombreuses localisations tumorales sans parvenir à démontrer une réelle amélioration de la survie globale, mis à part les cancers bronchiques à petites cellules où le bénéfice observé demeure faible. Cette différence d'efficacité avec les autres inhibiteurs est liée à son mécanisme d'action, sa capacité à piéger PARP1 sur l'ADN étant moindre.

De nombreux autres essais cliniques comprenant ces molécules sont également recensés. Dans des phases moins avancées, ils reprennent ces iPARP dans de nombreuses localisations tumorales mais les testent également en réalisant différentes combinaisons thérapeutiques. C'est le cas des anti-angiogéniques, dans l'essai PAOLA, l'Olaparib est testé en combinaison avec le Bevacizumab (anti-VEGF), il en est de même avec le Cediranib.²⁴² D'autres associations avec des inhibiteurs de PI3K, d'acteurs du cycle cellulaire ou de la réparation tels que WEE1, ATR, CHK1/2 sont également en cours. Des combinaisons entre iPARP et immunothérapies ciblant CTLA4 ou PDL1 sont réalisées comme dans l'essai MEDIOLA associant Olaparib et Durvalumab (anti-PDL1). Enfin, suite aux succès des iPARP, d'autres thérapies ciblant les dommages de l'ADN sont en cours de développement, ce n'est plus seulement la RH qui est ciblée mais également le MMR entre autres, par l'intermédiaire de protéines comme DNA-PK, ATM, ATR, CHK1, CHK2, ou encore WEE1.²⁴³

L'ensemble de ces iPARP est efficace en premier lieu chez les patients présentant des mutations de BRCA1/2, mais également dans les tumeurs présentant des défauts d'autres gènes de la RH définissant ainsi le concept de BRCAness. Les difficultés rencontrées actuellement quant à la définition de ce phénotype BRCAness démontrent les limites encore présentes concernant ce type de traitement.

3.3. Limites actuelles des iPARP et champs d'investigation

3.3.1. BRCAness : un challenge pour l'identification et le diagnostic

a) Définition de BRCAness

Le terme de BRCAness est apparu dès 2004 et définit les tumeurs présentant un phénotype similaire à celui des cancers mutés BRCA1/2, en particulier en termes de déficience de la RH. Dans les HGSOC, 50% des tumeurs sont déficientes en RH et seules 20 à 23% consécutives à des mutations de BRCA1/2 laissant entrevoir toute l'importance de cette définition.¹⁷⁷ L'hypothèse initiale est que ces tumeurs pourraient répondre aux mêmes approches thérapeutiques.^{244,245} Pour cela, nous rappellerons d'abord certaines des caractéristiques à la fois moléculaires et histologiques des cellules mutées BRCA. Celles-ci sont associées presque dans tous les cas à des mutations de TP53 (96%). Une amplification de MYC ainsi qu'une perte du récepteur à l'estrogène sont également répertoriés lorsque BRCA1 est muté, ce qui n'est pas le cas en présence de variants de BRCA2. Dans les deux cas, un infiltrat lymphocytaire et une instabilité génomique sont observés. Cette dernière est associée à une importante fréquence d'insertions et délétions ainsi qu'un désordre chromosomique. Ces tumeurs sont sensibles aux inhibiteurs de la fourche de réplication : sels de platine, mitomycine C, camptothecin ainsi que les iPARP.

Des similarités ont été observées en cas d'hyperméthylation de BRCA1 et de mutations d'autres gènes impliqués dans cette voie de réparation des CDB ou dans la stabilité de la fourche de réplication (ATM, ATR, CHEK1, CHEK2, DSS1, RAD51...). C'est également le cas d'un groupe de gènes impliqués dans l'anémie de Fanconi (famille FANCC), de par leur rôle dans la RH et la réparation des dommages de l'ADN. Cette rare pathologie récessive est caractérisée par des anomalies du développement, une insuffisance médullaire progressive et une augmentation des risques de cancers.²⁴⁴ Les mutations de CDK12 modifiant les ARN polymérases des longs ARN non codants et la perte d'ERCC1 sont également regroupés sous le terme de BRCAness. D'autre part, des amplifications d'EMSY (17%), délétions ou mutations de PTEN (7%) ou des translocations TMRSS2-ERG et EWS-FLI1 ou EWS-ERG sont également associés à une sensibilité aux iPARP.¹⁷⁷

L'ensemble de ces éléments, que nous développerons par la suite, témoigne de l'insuffisance de la seule présence de mutations de BRCA1/2 comme indicatrice de la sensibilité aux iPARP, d'autres biomarqueurs thérapeutiques sont nécessaires.²¹²

b) Hyperméthylation du promoteur de BRCA1

L'inactivation de BRCA1 par hyperméthylation de son promoteur est retrouvée dans 11-14% des cancers du sein et 11-13% des cancers ovariens. Ces mécanismes épigénétiques conduisent à une méthylation aberrante des cytosines des îlots CpG qui sont sous-représentés dans le génome et généralement localisés au niveau des régions promotrices des gènes. L'expression de BRCA1 est alors non détectable et cela peut parfois être associé à une LOH.²⁴⁶ Cette méthylation n'est pas retrouvée dans les

tissus sains et semble limitée aux cancers du sein et de l'ovaire. Aucune preuve d'une telle régulation n'a été faite dans les cancers du colon, de la tête et du cou, dans les leucémies, bien qu'elle ait déjà été observée dans des cancers du poumon.²⁴⁷ Les caractéristiques tumorales de l'hyperméthylation de BRCA1 sont proches de celles observées en présence de mutations de BRCA1/2, cependant elle n'a pas la même valeur pronostic.¹⁷⁷

De manière surprenante, il n'y a pas de mécanisme répertorié d'inactivation de BRCA2 par méthylation. Mais, une amplification du gène EMSY qui interagit avec l'exon 3 de BRCA2 semble liée à son inactivation par régulation transcriptionnelle.²⁴⁸ Ce gène est impliqué dans 13% des cancers du sein et 17% des HGSO.

c) BRCAness par analyse moléculaire de gènes individuels

Le concept de BRCAness comprend initialement les gènes acteurs de la RH ou régulant la fourche de réplication (PALB2, ATM, ATR, BRIP1, CHEK2, RAD51) où les gènes de la famille FANC. Des altérations de ces gènes sont retrouvées dans une grande variété de cancers dont ceux de l'ovaire, du sein, de la prostate et du pancréas.²⁴⁴ Afin de mieux caractériser les mutations de ces gènes dans ces localisations tumorales, différentes études utilisant des panels de gènes conséquents ou l'analyse génome entier ont été réalisées.

Le séquençage d'une trentaine de gènes, dont BRCA1 et 2 ainsi que 11 autres gènes de la RH (ATM, BARD1, BRIP1, CHEK1, CHEK2, FAM175A, MRE11A, NBS1, PALB2, RAD51C et RAD51D), de 390 carcinomes ovariens a permis de détecter des mutations délétères d'au moins un des 13 gènes de la RH dans 31% des cas, 24% germinales et 9% somatiques.¹⁷⁹ Ces altérations ont également une valeur prédictive de la réponse aux sels de platine et de la survie globale (66 mois pour les altérations germinales et 59 pour les somatiques contre 41 mois dans les autres cas). Toujours dans l'ovaire, l'analyse génome entier de 114 tumeurs provenant de 92 patientes atteintes de HGSO a permis de confirmer la fréquence des mutations de TP53 ainsi que celles des altérations de ces gènes BRCAness (somatiques ou germinales).²⁴⁹

La réalisation d'exomes des tumeurs de 507 femmes présentant des cancers du sein a permis de mettre en évidence un défaut de RH dans 30% des cas. 10% avaient des mutations germinales d'ATM, BRIP1, CHEK2, NBS1, PTEN, PALB2 ou RAD51C et 20% des mutations germinales ou somatiques de BRCA1 ou BRCA2.²⁵⁰ Parmi les 150 cancers métastatiques de la prostate, l'analyse génome entier a démontré que 19% d'entre eux avaient au moins une mutation de BRCA1, BRCA2, ATM ou CDK12.²⁵¹ Dans le pancréas (exome entier de 100 tumeurs), ce chiffre passe à 24% avec, tout de même, 8% d'altérations d'ATM.²⁵²

En 2018, Zimmermann et son équipe réalisent une étude de ces cibles BRCAness par criblage des gènes et des voies impliquées dans la sensibilité à l'Olaparib à l'aide de la technologie CRISPR-Cas9. Ils identifient ainsi 73 gènes qui, lorsqu'ils sont mutés, entraînent une sensibilité accrue aux iPARP.²⁵³ Cet ensemble de

gènes est enrichi en gènes codants pour des acteurs de la RH mais comprend également de manière surprenante les gènes codants pour l'hétérotrimère de la ribonucléase H2 (RNASEH2B). Nous pouvons noter que l'inhibition de la réparation par excision de nucléotides (NER) favorise également l'accumulation de CSB ce qui exacerbe l'instabilité génétique lorsque le BER est également inhibé. Sachant que la RNASEH2B est fréquemment délétée dans les cancers de la prostate (34%) et les leucémies lymphatiques chroniques (43%), la caractérisation de cette protéine pourrait être un biomarqueur à ajouter.

d) Signature transcriptionnelle et BRCAness

De nombreuses études ont tenté d'identifier les tumeurs BRCAness ou iPARP-sensibles par l'intermédiaire de signatures transcriptionnelles et mutationnelles en partant des signatures associées aux défauts de BRCA1/2. Ces hypothèses sont basées sur l'observation des grands réarrangements génomiques reflétant l'utilisation d'un système de réparation non conservateur chez les patients, appelés aussi cicatrice mutationnelle.¹⁹⁵ Ces signatures seraient alors des biomarqueurs permettant de prédire la réponse aux iPARP et aux sels de platine.

Dès 2002, Jazeari publie une étude transcriptionnelle afin de donner des signatures associées aux mutations de BRCA1 et BRCA2 à l'aide de puces à ADN.²⁵⁴ 61 échantillons tumoraux ovariens dont 34 mutés BRCA1/2 sont analysés. Ils démontrent alors des différences d'expressions significatives au niveau de 110 gènes entre les tumeurs mutées BRCA1/2, soulignant les rôles différents que jouent ces deux protéines. Puis, en 2010, une seconde étude conduite dans les HGSOE compare également les données d'expression de tumeurs provenant de 70 patients mutés BRCA1, BRCA2 ou WT afin de définir une signature BRCAness.²⁵⁵ De manière générale, le profil BRCAness établie une meilleure survie globale avec 72 mois contre 41. Il prédit également la réponse aux sels de platine ainsi qu'aux iPARP.

Cependant, la multiplicité des gènes dont l'inhibition peut être associée au phénotype BRCAness ainsi que les difficultés supplémentaires rencontrées lors des analyses ont plutôt favorisé l'élaboration des signatures mutationnelles et non transcriptomiques.

e) HRD et signature mutationnelle : une évolution rapide

Les progrès technologiques notamment concernant les analyses génomiques ou transcriptomiques globales ont permis de passer d'une classification des tumeurs par localisation vers une classification selon un type de mutation ou de cicatrice mutationnelle. Cette dernière retrace alors l'histoire du développement tumoral puisque sont pris en compte les drivers et les passagers.²⁵⁶ Cela se traduit, dans les tumeurs déficientes en RH, par une signature mutationnelle caractéristique de l'utilisation d'un mécanisme de réparation des CDB non conservateur, la NHEJ. A nouveau, ces signatures permettent de définir les tumeurs BRCAness ayant une sensibilité aux sels de platine ainsi qu'aux iPARP.

En 2013, Birkbak et son équipe reprennent les données du TCGA concernant les 316 patientes présentant des HGSOE.²⁵⁷ Ils déterminent alors le total des mutations à la fois synonymes et non synonymes en

fonction de la présence ou non d'altérations pathogènes de BRCA1/2 définissant la charge mutationnelle des tumeurs. Cette charge mutationnelle plus élevée dans les tumeurs mutées prédit une réponse favorable aux agents de chimiothérapies à base de sels de platine et devient un nouveau biomarqueur candidat des tumeurs BRCAness. La propension des tumeurs RH déficientes à accumuler les anomalies génétiques n'est pas surprenante. Une autre étude a permis de confirmer cette idée, la recherche de duplications en tandems dans différents types de cancers a permis de mettre en évidence un phénotype précis corrélé à une sensibilité au cisplatine.²⁵⁸ Ce phénotype est retrouvé dans les tumeurs mutées TP53, avec perturbation de BRCA1 et une augmentation de l'expression de gènes répliatifs. La présence de ces micro-homologies dupliquées en tandem d'environ 10kb est une signature de réarrangement caractéristique des cellules BRCA1 déficientes mais pas BRCA2.²⁵⁹ A nouveau, les différences phénotypiques observées lors des pertes de BRCA1 ou BRCA2 confirment la difficulté à déterminer une signature mutationnelle unique, à la fois pour ces deux gènes mais également pour l'ensemble des tumeurs BRCAness.

En 2013, la méta-analyse des mutations de 7042 cancers, tous sous-types confondus, a permis la détermination de 20 types de signatures mutationnelles distinctes.²⁶⁰ Dans les cancers du sein, de l'ovaire et du pancréas, une signature a été associée aux mutations de BRCA1/2 : la signature 3. Celle-ci comporte des délétions relativement petites (environ 50pb) ainsi que des micro-homologies au niveau des jonctions des cassures, il s'agit là des duplications en tandem. Certaines des tumeurs présentant cette signature ne présentaient pas d'altérations de BRCA1/2 réaffirmant le concept de BRCAness. Cependant, l'utilisation de cette signature sur 100 HGSOc dans une seconde étude soulève la question de l'intérêt prédictif de cette approche, du moins seule.²⁴⁹ En effet, si les 34 tumeurs mutées BRCA1/2 présentaient bien cette signature, 12 autres avec la signature BRCAness n'avaient pas de mutations de gènes de la RH. D'autres part, 11 d'entre eux ont également présenté une résistance de novo ou acquise aux iPARP.

Plus récemment, des études génomes entiers de 560 tumeurs mammaires (556 femmes et 4 hommes) ont été réalisées, permettant de déterminer 93 drivers.²² A nouveau, les 20 signatures mutationnelles préalablement établies ont été recherchées, 12 d'entre elles ont été retrouvées dans la cohorte ainsi que 6 signatures de réarrangement. La signature mutationnelle 3 a été associée à des pertes de fonction de BRCA1/2 et dans une moindre mesure c'est également le cas de la signature 8. De plus, trois signatures de réarrangement ont été caractérisées par des duplications en tandem et des délétions donc associées à un défaut de RH. Cependant, la première signature contenait 91% des tumeurs mutées BRCA1 ou hyperméthylées, la deuxième, des mutations de BRCA1 et BRCA2 ou hyperméthylation de BRCA1 et la troisième ni l'un ni l'autre. Seule la combinaison de ces signatures mutationnelles et de réarrangement pourraient être un biomarqueur intéressant à l'administration des iPARP.

Enfin, une autre étude recherchant cette signature mutationnelle 3 dans 992 tumeurs mammaires a permis de confirmer sa validité concernant les mutations délétères de BRCA1/2 et certains autres gènes de la RH dont PALB2 ainsi que l'hyperméthylation de BRCA1 et RAD51C.²⁶¹ Cependant, cette signature

n'était pas retrouvée en présence de variant d'ATM, NBN ou encore CHEK2 donc ces altérations favoriseraient la tumorigénèse indépendamment de la voie de la RH.

Afin de contourner ces différentes limites, une autre étude, d'abord conduite dans 560 tumeurs mammaires puis étendue aux cancers ovariens et du pancréas, a élaboré un score appelé HRDetect.²⁶² Leur postulat de départ était que les mutations de BRCA1/2 ne donnent pas une seule signature mais 5 toutes classes confondues : 2 mutationnelles (3 et 8) et 3 de réarrangement, que nous avons toutes évoquées au préalable. Sur les 560 tumeurs, 44 présentaient effectivement des mutations de BRCA1/2 germinales ou somatiques et 47 autres n'avaient pas de mutation de BRCA1 ou BRCA2 mais un défaut de RH était détecté. La fréquence des cancers du sein mutés BRCA1/2 passe alors de 5% à 22% réellement déficients en RH, cela ne prédit cependant pas la sensibilité aux iPARP.

L'une des problématiques majeures de ces signatures est de vouloir regrouper des gènes n'ayant pas tout à fait la même fonction ni les mêmes conséquences sur l'instabilité génétique, les duplications en tandem sont par exemple le propre des mutations de BRCA1. Cela est d'autant plus le cas si l'on veut ajouter d'autres gènes qui entraînent également une sensibilité aux iPARP mais qui ne font pas uniquement partie de la recombinaison homologe comme ATM, ATR, CHK1 ou CHK2. D'autre part, le temps écoulé depuis le début de la progression tumorale va considérablement jouer sur l'hétérogénéité ainsi que les cicatrices mutationnelles observées, il devient donc difficile d'estimer avec précision les tumeurs HRD puisque certains variants peuvent être des acteurs majeurs du développement puis disparaître sous la pression de la sélection clonale. De plus, les mutations somatiques ou germinales de BRCA1/2 n'ont pas les mêmes conséquences et devraient également être prise en considération. L'application de la signature à différentes localisations tumorales sans tenir compte de l'impact du microenvironnement pourrait être problématique. Egalement, la cooccurrence avec certaines mutations (TP53, RB1, ER...) semble être importante dans les tumeurs mutées BRCA1/2 et n'est ici pas prise en compte. Enfin, la localisation de la mutation dans le gène peut être primordiale puisqu'elle n'aura pas les mêmes conséquences biologiques. Tous ces éléments ont favorisé la recherche de biomarqueurs fonctionnels de la RH pour identifier les tumeurs BRCAness.

f) Autres biomarqueurs fonctionnels de la recombinaison homologue

Diverses approches fonctionnelles ont été développées afin de caractériser les tumeurs de phénotype BRCAness. Celles-ci s'attardent sur des marqueurs clés de l'inactivation de BRCA1/2 tels que l'aneuploïdie²⁶³, les réarrangements chromosomiques ou encore, le plus souvent, la localisation et l'activité d'une protéine clé de la RH : RAD51. En effet, une déficience en RH se traduit par un arrêt de la relocalisation de RAD51 sur les sites de dommages et donc la disparition des foci nucléaires. Ces marqueurs ont été utilisés pour déterminer les tumeurs BRCA1/2 déficientes dans 65 cancers mammaires avec une spécificité de 100%.²⁶⁴ Cependant, la recherche de la localisation de RAD51 est difficilement applicable en clinique. De plus, elle n'a été possible dans les cellules qu'après exposition à des radiations ionisantes ou aux iPARP. Afin de contourner cela, une seconde étude a été conduite *in vivo*, dans une

cohorte de 68 patients atteints de cancers du sein. La localisation et l'étude de la formation des foci de RAD51 ont été évalués 24h après le premier cycle de chimiothérapie du patient, un score de fonctionnalité de la RH a alors été établi.²⁶⁵ Une concordance entre la sensibilité à la chimiothérapie et un faible score RAD51 a été observée suggérant une RH déficiente et une potentielle sensibilité aux iPARP.

Cependant, malgré une multitude d'études cherchant à mieux définir les tumeurs RH déficientes ou BRCAness, cette évaluation n'est pas signe d'une prédiction de réponse aux iPARP. De même, malgré les réponses exceptionnellement longues observées avec ces types de thérapies, des phénomènes de résistance acquise peuvent apparaître.

3.3.2. Mécanismes de résistance aux iPARP

Comme dans toutes thérapies ciblées, une résistance acquise au traitement peut apparaître chez certains patients. Dans le cas des iPARP, les mécanismes impliqués sont multiples et ont principalement été observés *in vitro*, en partie de par les réponses particulièrement longues après administration du traitement. Avec le développement des iPARP, le nombre d'études de cette résistance a considérablement augmenté, la scindant en quatre types de mécanismes.^{212,266,267} (Figure 13)

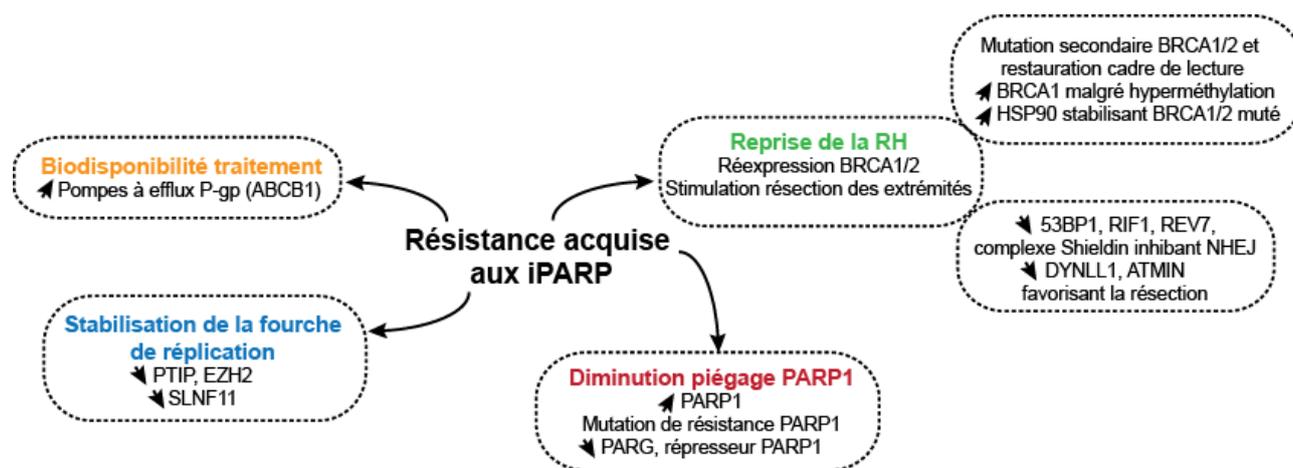


Figure 13 : Représentation schématique des différents mécanismes impliqués dans la résistance acquise aux inhibiteurs de PARP.

a) Modification de la disponibilité du traitement

Comme dans de nombreuses thérapies, la disponibilité du traitement dans la cellule peut être modifiée conduisant à une résistance acquise au traitement. Dans une étude de la sensibilité à un iPARP de tumeurs mammaires murines déficientes en BRCA1, une augmentation de l'expression des pompes à efflux P-gp, codées par les gènes *Abcb1a/b*, a pu être démontrée.²⁶⁸ Chez l'homme, une augmentation de l'expression ainsi que des fusions de transcrits du gène *ABCB1* sont également récurrentes dans les cancers ovariens et mammaires suite à des traitements de chimiothérapies.²⁶⁹

b) Reprise de l'activité de la recombinaison homologue

La plupart des mutations de BRCA1 et BRCA2 sont des SNP ou des courtes insertions/délétions conduisant à un décalage du cadre de lecture. Des mutations secondaires de ces gènes restaurant le cadre et l'activité de la protéine ne sont donc pas étonnantes. Les cellules vont ainsi retrouver leur capacité à réparer les CDB par RH et devenir résistantes aux iPARP. C'est d'ailleurs le seul mécanisme de résistance à avoir réellement été observé en clinique, retrouvé dans 28.3% des résistances à la chimiothérapie à base de sels de platine dans 46 HGSOc.²⁷⁰ Ce type de résistance acquise est observé à la fois avec des mutations de BRCA1 et BRCA2 suite à des expositions aux iPARP et aux chimiothérapies à base de sels de platine.^{249,271,272} De manière intéressante, une étude conduite sur l'ADN tumoral circulant a permis de démontrer une polyclonalité de cette résistance avec l'observation de multiples mutations de réversion simultanément, chez un même patient.^{273,274} Ceci illustre à la fois l'instabilité génétique de ce type de tumeur ainsi que la pression de sélection conduisant à la reprise de l'activité de BRCA1/2 permettant de contourner la sensibilité aux iPARP.

Des réexpressions de BRCA1 ont également été observées malgré une hyperméthylation du promoteur dans des modèles de xenogreffes murins. En effet, une fusion de gènes, plaçant BRCA1 sous le contrôle d'un autre promoteur, favorisait à nouveau l'expression de BRCA1 et restaurait l'activité de la RH.²⁷⁵ Ceci n'a cependant pas encore été démontré chez l'homme. Autre mécanisme de résistance favorisant un rétablissement de l'activité de BRCA1, une surexpression de la protéine chaperonne HSP90 a également été observée.²⁷⁶ Elle permet alors de conférer une certaine stabilité à la protéine mutée et à nouveau le recrutement de PALB2-BRCA2-RAD51, donc l'induction d'une résistance aux iPARP.

Une résistance acquise aux iPARP via la perte simultanée de facteurs de régulation de la NHEJ résulte également en une reprise de la RH, en bouleversant à nouveau la balance entre NHEJ et RH. Ainsi, la perte de 53BP1, qui favorise la NHEJ en inhibant la résection des extrémités nécessaire à la RH, contribue à la résistance aux iPARP.^{228,277} Cependant, ce mécanisme n'est observable qu'en présence de mutations primaires de BRCA1 et non BRCA2. Par ailleurs, des diminutions de l'expression de RAD51 ont été observées dans des cancers du sein triples négatifs mutés BRCA1/2. RIF1 et REV7 qui sont des cibles de RAD51 vont donc également voir leur inhibition conduire à une résistance aux iPARP.^{278,279} De manière plus générale, le criblage via CRISPR-Cas9 des cellules PARPi résistantes a permis de démontrer que le complexe Shieldin (REV7, SHLD1, SHLD2, SHLD3) responsable de l'inhibition de la résection des CDB est un acteur de cette résistance acquise.^{280,281} Il est recruté sur les CDB de façon dépendante de 53BP1 et RIF1, sa perte va donc également entraîner une inhibition de la NHEJ, favorisant la résection. Pour aller plus loin, la RH est réactivée en absence de BRCA1 et de 53BP1 de manière RF168 dépendante : il va ainsi se lier à PALB2 et favoriser son recrutement au niveau du site endommagé puis l'activation de la voie indépendamment de BRCA1 et de l'axe Shieldin qui ne l'inhibe plus. Cependant, l'activation de cette voie va également dépendre du type de mutation de BRCA1, elle ne doit pour cela pas être localisée au niveau du domaine d'interaction avec PALB2.²⁸²

Suivant le même type de mécanisme, les pertes de DYNLL1 et ATMIN sont également promotrices d'une résistance acquise aux iPARP. ATMIN et son activateur transcriptionnel, DYNLL1, s'associent avec MRE11 (complexe MRN de la RH), empêchant la résection des extrémités de la coupure. Leur perte favorise donc la résection, inhibant la NHEJ et activant la RH, conduisant à une résistance aux iPARP.²⁸³

c) Diminution du piégeage de PARP1

Les iPARP ciblant spécifiquement la protéine PARP1, une augmentation de son expression rend la dose administrée insuffisante, les cellules deviennent alors résistantes. Ceci a déjà été observé dans des lignées cellulaires mammaires²⁸⁴ avant d'être confirmé dans une étude comprenant 186 patientes atteintes de cancers de l'ovaire. Une expression élevée de PARP1 semble alors augmenter le risque de rechute sous iPARP ou sels de platine.²⁸⁵ Cependant, cette corrélation reste controversée car une autre étude de 170 patientes présentant des cancers du sein réfute cette observation.²⁸⁶ Cette étude utilisait le Veliparib, or il possède des capacités de piégeage de PARP1 limitées confirmant l'effet cytotoxique majoritairement dépendant de ce mécanisme. Cette résistance acquise liée à PARP1 a également été confirmée lors d'un screening à l'aide de CRISPR-Cas9 révélant des mutations de résistance de PARP1.²⁸⁷ Ces mutations étaient principalement localisées au niveau du domaine de liaison à l'ADN de la protéine, empêchant sa fixation à l'ADN.

Enfin, la comparaison de cellules murines BRCA2 déficientes sensibles ou résistantes aux iPARP a permis de constater que la perte d'expression de PARG est un autre mécanisme de résistance au traitement.²⁸⁸ Egalement retrouvée dans des tumeurs humaines ovariennes ou mammaires, cette déplétion restaure la PARylation diminuant le piégeage de PARP1. La signalisation des dommages de l'ADN ainsi que la vitesse de la fourche de réplication reviennent donc à la normale.

d) Stabilisation de la fourche de réplication

Outre la vitesse de la fourche de réplication, sa stabilisation peut également induire une résistance au traitement. C'est le cas des pertes de PTIP ou EZH2 qui diminuent le recrutement du complexe MRN, et par conséquent des nucléases MRE11 et MUS81, limitant les dégradations de l'ADN et stabilisant la fourche.^{289,290} Egalement, l'activité ATPase de SLNF11 est impliquée dans l'ouverture de la chromatine conduisant à un blocage de la fourche de réplication et donc un arrêt du cycle en phase S suite à un stress répliatif.²⁹¹ Sa perte va donc conduire à une résistance acquise aux iPARP. Tandis que les pertes de PTIP et SLNF11 vont conduire à une résistance dans les tumeurs déficientes BRCA1 et BRCA2, la perte d'EZH2 favorise une résistance uniquement dans les tumeurs BRCA2-/- . Tous ces mécanismes ne contribuent pas à un rétablissement de la RH mais bien à une stabilisation de la fourche de réplication rappelant le double effet cytotoxique et l'importance du piégeage des iPARP.

L'ensemble des mécanismes de résistance acquise décrits ici n'ont pas été observés *in vivo*. Dans le même esprit que les signatures BRCAness, une signature de résistance ou de rechute a été réalisée par analyse génome entier de 133 tumeurs ovariennes.⁶² Indépendamment de la stratification des tumeurs

ovariennes, cette étude s'engageait vers une meilleure compréhension des mécanismes de résistance, notamment par l'analyse des longs répondeurs, toujours dans un but de mise en place de signature prédictive. Les difficultés rencontrées avec les inhibiteurs de PARP tant sur le plan de la définition des tumeurs BRCAness que sur la grande variété des mécanismes de résistance démontrent la nécessité de poursuivre les recherches concernant ce type de traitement. En 2017, trois possibilités d'amélioration sont déterminées avec les iPARP¹⁹⁵ :

- Identifier qui traiter : mieux comprendre les mécanismes d'action des iPARP pour affiner et identifier des biomarqueurs permettant la stratification des patients. De même, la localisation de la mutation dans le gène ainsi que le domaine affecté devraient être pris en considération, ayant des conséquences sur la sensibilité au traitement ainsi que sur le mécanisme de résistance pouvant apparaître.
- Combattre les résistances au traitement : identifier les mécanismes ainsi que les biomarqueurs de cette résistance, l'hétérogénéité et la plasticité des cellules semblent d'ailleurs être des éléments clés.
- Optimiser les combinaisons thérapeutiques : mieux comprendre les effets synergiques et contourner l'émergence de certains mécanismes de résistance. De plus, les cellules devenues résistantes ont de nouvelles vulnérabilités telles que l'axe PALB2-BRCA2 lors de la reprise de la RH ou encore la stabilisation de la fourche de réplication devenant dépendante de RAD51. La combinaison avec des inhibiteurs d'ATR pourrait alors permettre de contourner cela.²⁹²

Cependant, des limites existent au sein même de la caractérisation des variants de BRCA1 et BRCA2 pour lesquels nous connaissons pourtant l'intérêt des iPARP : c'est toute la problématique des variants de signification inconnues ou VSI.

3.3.3. VSI de BRCA1/2 : CRISPR-Cas9 pour la mise en place d'un test fonctionnel

a) VSI de BRCA1 et BRCA2

Les progrès technologiques majeurs et l'apparition du séquençage haut débit (panels étendus, exome et génome entiers) dévoilent un nouveau niveau de complexité dans la prise en charge du patient, la décision thérapeutique la plus adaptée ainsi que la gestion du risque pour les apparentés.²⁹³ En effet, certaines études estiment que, dans les années à venir, un tiers des mutations détectées tous gènes confondus seront des VSI. D'autre part, 80% des mutations seront détectées au niveau des suppresseurs de tumeur, qui ont été moins étudiés en raison de la difficulté à déterminer des traitements les ciblant.²⁹⁴ L'ensemble des variants sont classés selon les normes en cinq catégories : pathogénique, probablement pathogénique, de signification inconnue ou interprétation conflictuelle, probablement bénin, bénin.²⁹⁵ Actuellement, la base de données Clinvar répertorie 237 934 VSI tous gènes confondus.

Concernant BRCA1 et BRCA2, cette base comprend 7858 variants de BRCA1 dont 2664 VSI soit 35.7% et 10623 variants de BRCA2 soit 4840 VSI donc 45.7%. Ces chiffres intègrent à la fois les variants

somatiques et constitutionnels des deux gènes. Il faut cependant nuancer ces pourcentages qui ne reflètent pas la fréquence d'apparition de ces mutations, à savoir 20% de VSI dans les cancers ovariens et 26.2% dans les cancers mammaires. En France, les données INCA de 2017 évaluent la proportion de VSI en constitutionnel à 11000 familles et 1356 VSI pour BRCA1 ainsi que 13450 familles et 2181 VSI pour BRCA2. Ce nombre de VSI est d'ailleurs appelé à augmenter avec l'étude des variants somatiques et l'extension de la recherche aux cancers du sein, de la prostate et du pancréas. D'autre part, il s'agit ici des chiffres concernant les variants de signification inconnue répertoriés, auxquels il faut ajouter les variants non annotés également retrouvés en pratique. L'influence du microenvironnement tumoral, du traitement, de la taille des gènes et des nombreux domaines impliqués dans leurs fonctions suggèrent la rareté de certaines mutations qui vont être observées. Certaines pourraient ainsi être considérées comme des variants orphelins, la recherche quant à leur impact fonctionnel devient donc importante et doit être suffisamment rapide pour que le patient puisse bénéficier de cette information avant administration du traitement.

b) Méthodes actuelles de caractérisation fonctionnelle des VSI

La caractérisation fonctionnelle des mutations est un enjeu thérapeutique majeur. Nous avons déjà évoqué l'utilisation de marqueurs d'une RH déficiente tels que l'aneuploïdie, les réarrangements chromosomiques ou encore la localisation de RAD51. Les signatures mutationnelles semblent également être une option, comme démontrée dans une cohorte de 992 cancers mammaires où 26.3% des patients arboraient au moins un variant considéré comme rare ($<0.1\%$)²⁶¹. Dans cette étude, la combinaison LOH et signature HRD semble pouvoir permettre la classification de VSI somatiques et constitutionnels. Cette méthode est cependant longue, couteuse et adaptée au cancer du sein. Bien qu'efficaces, ces méthodes vont donner une réponse pour la tumeur globale avec son hétérogénéité mutationnelle et non pas les conséquences de telle ou telle mutation. Cette information est pourtant nécessaire outre la décision thérapeutique, elle va également influencer une éventuelle consultation d'oncogénétique ainsi que la prise en charge des apparentés.

En ce qui concerne, les variants localisés au niveau des régions nécessaires à l'épissage, différentes méthodes coexistent. Des sites de prédiction sont disponibles mais nécessitent une validation expérimentale. Cette investigation reste primordiale car seulement 15% des variants affectant l'épissage sont connus, la plupart des séquençages s'intéressant aux séquences codantes et non aux séquences introniques. L'étude des transcrits via extraction de l'ARN tumoral²⁹⁶ ou les minigènes²⁹⁷ peuvent permettre d'apporter certaines informations. Les sauts d'exons ou les rétentions d'introns sont ainsi visualisables mais l'étude des sites cryptiques reste complexe.²⁹⁸ Lors de l'apparition d'un codon stop, sa localisation peut parfois informer des potentielles conséquences biologiques. Des tests quant à l'impact fonctionnel de certaines de ces mutations ont d'abord été effectués.²⁹⁹ Aujourd'hui, nous savons qu'au-delà de l'acide aminé 1853 pour BRCA1 et 3308 pour BRCA2, l'apparition d'un codon stop n'a pas de conséquence sur la fonctionnalité de la protéine. Les principales difficultés sont rencontrées lors de la

présence d'un SNP de signification inconnue conduisant à un changement d'acide aminé. Actuellement, ces variants sont comparés aux bases de données, l'historique familial est pris en considération (en cas de mutation germinale) et des arbres phylogénétiques reprenant la conservation des acides aminés entre les espèces sont consultés. Face à la persistance de ces difficultés d'interprétation, la nécessité de la mise en place d'un test fonctionnel s'impose. Avec l'explosion des connaissances en édition génomique ces 10 dernières années, le choix de la technologie CRISPR-Cas9 semble particulièrement intéressant.

c) Edition génomique via la technologie CRISPR-Cas9

La technologie CRISPR-Cas9 (Clustered Regulatory Interspaced Palindromic Repeats) utilise l'endonucléase Cas9 qui réalise une coupure double brin de l'ADN au niveau d'une séquence précise, reconnue par l'intermédiaire d'un ARN guide (ARNg). Cet outil d'origine procaryote leur permet une défense contre les infections virales, appelées aussi bactériophages, en clivant l'ADN viral.³⁰⁰ (Figure 14) Cette réaction immunitaire peut être divisée en trois phases. La première est l'acquisition lors de laquelle un fragment d'ADN viral est capturé et intégré comme « spacer » entre des locus palindromiques : il servira alors de mémoire génétique en cas de nouvelle infection par ce même virus. Puis, vient l'étape d'expression de ce pre-crRNA puis crRNA, homologue au génome du bactériophage, lors de la nouvelle infection. Enfin, l'étape d'interférence correspond à la coupure endonucléasique de la cible par le complexe ribonucléoprotéique crRNA-Cas9 détruisant le virus. La librairie de fragments viraux ainsi constituée joue alors le rôle de mémoire immunitaire pouvant être transmise à la descendance, CRISPR-Cas9 fait donc partie de l'immunité innée bactérienne.

Après sa découverte, ce mécanisme a été adapté afin de servir d'outil d'édition génomique dans divers types cellulaires. Pour cela, deux éléments sont indispensables : l'endonucléase Cas9 et l'ARNg. Cet ARNg est constitué de deux parties, le crRNA (CRISPR RNA) complémentaire à la cible et le tracrRNA (transactivating CRISPR RNA) qui associe l'ARNg à la Cas9. Autre élément important, le motif PAM (protospacer adjacent motif) est situé directement en aval de la séquence ciblée par l'ARNg, la coupure double brin est d'ailleurs réalisée 3nt en amont de ce PAM. Le motif NGG de ce PAM est le plus répandu mais peut varier en fonction des espèces procaryotes dont proviennent les Cas. A l'origine, ce motif indispensable pour le clivage de l'ADN viral permet d'éviter que la bactérie ne cible son propre spacer. La coupure double brin générée dans les cellules humaines est prise en charge par la RH ou, majoritairement, la NHEJ. Cependant, certaines études estiment que lors d'une édition, plus de 50% sont hors cibles ou « off-targets » (en comptant les indels au niveau de la zone ciblée), ce sont des mutations qui ne sont pas celles attendues.³⁰¹ Il existe plusieurs façons de contourner cela, en synthétisant des ARNg plus spécifiques, en utilisant une Cas protéique donc en contrôlant sa concentration³⁰² ou en utilisant d'autres formes de Cas modifiées tels que les Cas9 nickase qui réalisent des coupures simples brins³⁰³. D'autre part, des protéines inhibitrices de l'activité de la Cas9 ont récemment été découvertes et permettraient également de limiter les effets off-target après transfection.³⁰⁴

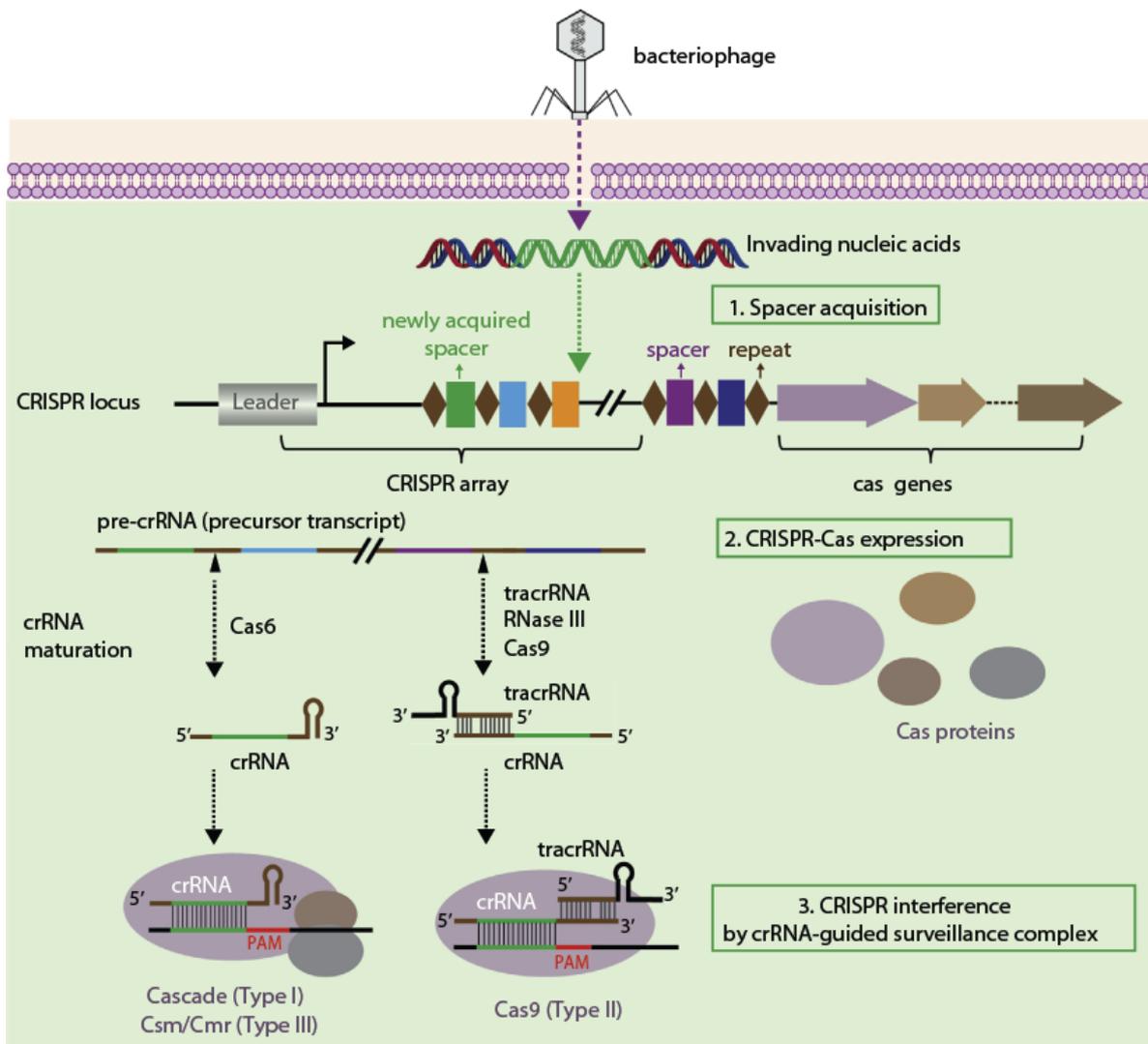


Figure 14 : Représentation schématique de la fonctionnalité de l’outil CRISPR-Cas pour la défense immunitaire bactérienne contre les infections virales.

Les Cas existantes sont nombreuses, elles sont liées à l’évolution des virus et dépendent également des espèces bactériennes dont elles proviennent. Ainsi, elles peuvent être classées en deux classes, 6 types et plus de 16 sous-types différents.³⁰⁵⁻³⁰⁷ C’est le type II de la classe 2 qui répertorie la Cas9, la plus utilisée actuellement. Mais une autre Cas classée comme type V de la classe 2 émerge, il s’agit de Cpf1 (ou Cas12a). Cette endonucléase présente plusieurs particularités : PAM en aval de l’ARNg et de motif TTTV, utilisation d’un ARNg plus petit sans partie constante, coupure double brin de l’ADN avec extrémités cohésives.³⁰⁸ Plus récemment, la Cas12b, un autre type V, a émergé et serait d’une efficacité supérieure.³⁰⁹

L’apparition de cette technologie offre des applications multiples, autres que le knock-out de gènes. Il devient possible de réaliser des knock-in (KI) avec insertion de mutation précise, du CRISPRi inhibant l’expression d’un gène sans coupure via une dCas9 ayant perdu son activité catalytique, du CRISPRa grâce à la fusion d’un activateur transcriptionnel avec la Cas9 ainsi que du criblage, de l’analyse de la méthylation/déméthylation ou encore de la modification des histones.³¹⁰ Plus récemment, l’édition de base

est apparu, des Cas sans activité catalytique ont alors été fusionnées avec des déaminases permettant des conversions A-T en G-C et l'insertion de mutation sans clivage donc avec moins d'off-target.³¹¹ La même chose a été réalisée pour convertir les C-G en T-A.³¹²

Afin d'étudier les VSI de BRCA1 et BRCA2 caractérisés dans les cancers ovariens séreux de haut grade, c'est principalement l'édition de mutations ponctuelles ou KI qui va nous intéresser. Pour cela, un oligonucléotide simple brin porteur de la mutation est transfecté simultanément servant de modèle pour la réparation et promouvant la RH. Selon Paquet et son équipe, il permet l'introduction de mutations homozygotes ou hétérozygotes.³¹³ Cette zygote dépend de la distance entre le site de coupure et la mutation à insérer, à moins de 5nt ce sont les homozygotes qui prédominent, jusqu'à 17nt les hétérozygotes et au-delà sont principalement retrouvées des séquences sauvages. La mise en place de cet outil de caractérisation fonctionnelle des VSI au sein du laboratoire est un des enjeux de cette thèse et ce, avec une contrainte de temps. En effet, après identification du variant chez le patient, ce test fonctionnel doit être suffisamment rapide pour que celui-ci puisse bénéficier d'un éventuel traitement aux iPARP, toujours dans le but d'une amélioration de la prise en charge thérapeutique.

Objectifs de la thèse

La prise en considération du contexte moléculaire en oncologie a initié le développement des thérapies dites ciblées. Basés sur les concepts d'addiction oncogénique et de létalité synthétique, ces nouveaux médicaments requièrent la caractérisation au sein de la tumeur de biomarqueurs spécifiques préalablement à leur administration. Les thérapies ciblées ont ainsi considérablement optimisé la prise en charge des patients améliorant l'efficacité tout en limitant les effets secondaires observés avec les agents cytotoxiques généraux des chimiothérapeutiques classiques.

Ces bénéfices cliniques font cependant face à certaines limitations majeures. Ces dernières vont être abordées au cours de ces travaux de thèse à travers le spectre de deux localisations tumorales fondamentalement différentes, que sont les cancers bronchiques et ovariens, et plus précisément les cibles représentées par l'oncogène EGFR et les suppresseurs de tumeur BRCA1 et BRCA2 respectivement. En effet, la détection des biomarqueurs, que ce soit pour mieux définir le traitement le plus adapté ou affiner la caractérisation d'une résistance, constitue le premier enjeu. Cet aspect sera principalement abordé lors de l'évaluation de méthodes de détection des mutations de l'EGFR dans les CBNPC.

Le deuxième volet de recherche de ces travaux repose sur une meilleure caractérisation des mécanismes de résistance acquise aux thérapies, notamment dans les CBNPC devenus insensibles aux ITK-EGFR, afin de proposer et d'optimiser des combinaisons thérapeutiques. Pour cela, de manière à mimer et accélérer le processus d'évolution de la sensibilité face à un traitement ciblant l'EGFR oncogénique, une lignée issue d'un adénocarcinome pulmonaire présentant une mutation de sensibilité aux ITK-EGFR sera exposée à un agent mutagène aléatoire avant application d'une sélection clonale sous pression de l'inhibiteur. Le mécanisme de résistance acquise de ces cellules sera ensuite caractérisé.

Enfin, le dernier enjeu abordé dans les travaux présentés a pour objectif l'identification de nouveaux biomarqueurs et l'extension des sensibilités aux thérapies actuelles. La mise en place d'une méthode de caractérisation fonctionnelle des variants de significations inconnues de BRCA1 et BRCA2 identifiés dans des cancers ovariens fait donc l'objet de la seconde partie de ces travaux. L'évaluation de l'impact biologique de ces mutations favorise à la fois l'accès aux inhibiteurs de PARP, en cas de preuve de la pathogénie d'un variant somatique ou constitutionnel, et la prise en charge des apparentés si ce dernier est constitutionnel. Deux méthodologies seront alors abordées : l'analyse transcriptionnelle des ARNm directement extraits des prélèvements FFPE et la mise en place de la caractérisation fonctionnelle *in vitro* de l'impact des variants en utilisant l'outil d'édition génomique CRISPR-Cas9.

L'ensemble des éléments qui sont évoqués au cours de ces travaux ont donc un objectif commun qui est la caractérisation de biomarqueurs et de leurs impacts fonctionnels avec des délais de rendu de résultats compatibles avec une prise en charge optimale du patient par les oncologues. Nos travaux s'inscrivent donc vers la prescription de traitement individualisé pour chaque patient dans le cadre d'une médecine plus précise grâce aux analyses moléculaires et fonctionnelles de la tumeur de plus en plus performantes.

Résultats

1. Amélioration de la détection des mutations de l'EGFR dans les CBNPC et nouveaux mécanismes de résistance acquise, étude des enjeux actuels des ITK-EGFR

Article 1: Caractérisation moléculaire de l'EGFR dans les cancers bronchiques non à petites cellules : étude prospective comparative des technologies NGS et automate Idylla.

Louise-Marie Chevalier, Amandine Billaud, Christophe Passot, Adélaïde Renoult, Frédéric Bigot, Véronique Verrièle, Alain Morel

Soumission à Annales de Pathologie le 27/06/19

Numéro du manuscrit : ANNPAT-D-19-00071R1

Révisé et renvoyé à l'éditeur le 12/11/19

RESUME

Introduction – La détection des altérations génétiques du domaine tyrosine kinase de l'EGFR est un enjeu majeur dans la prise en charge des cancers bronchiques non à petites cellules, car elle conditionne l'accès aux inhibiteurs de tyrosine kinase. En pratique, il est possible de faire une caractérisation restreinte aux mutations bien documentées ou de séquencer tous les exons concernés de l'EGFR et aussi d'autres cibles d'intérêt théranostique. Cette étude prospective compare la caractérisation ciblée de l'EGFR sur automate Idylla (Biocartis) ou plus étendue par séquençage nouvelle génération par la technologie Ion Torrent.

Matériel et méthodes – Cent échantillons tumoraux fixés au formol et inclus en paraffine ont été testés simultanément par les deux techniques dans les conditions recommandées par les fournisseurs. La comparaison a porté sur l'ensemble des aspects techniques et pratiques au laboratoire.

Résultats – Au moins une mutation EGFR d'intérêt pour les inhibiteurs de tyrosine kinase a été détectée par séquençage pour 9 échantillons et 7 par le système Idylla. Pour trois échantillons, des mutations EGFR de sensibilité aux inhibiteurs de tyrosines kinases ont été détectées uniquement par séquençage nouvelle génération. De plus, pour 37 échantillons, des mutations d'intérêt hors de l'EGFR ont été rendues par séquençage au prescripteur.

Conclusion – La technologie Idylla permet la caractérisation rapide d'une majorité de variants de l'EGFR et peut être optimisée en exploitant les courbes d'amplification avec l'outil Idylla Explore ou en augmentant la quantité de matériel initial. Une analyse complémentaire par séquençage nouvelle génération pour les résultats non-contributifs par Idylla doit être préconisée.

MOTS CLES

EGFR, cancer bronchique non à petites cellules, séquençage de nouvelle génération, PCR temps réel, comparaison technique.

SUMMARY

Introduction - Detection of genetic alterations in the EGFR tyrosine kinase domain is a major concern in the management of non-small cell lung cancer because it conditions access to tyrosine kinase inhibitors. In practice, it is possible to characterize only well-documented mutations or to sequence all relevant *EGFR* exons and also other targets of theranostic interest. This prospective study compares the targeted *EGFR* characterization on Idylla platform (Biocartis) and a more extensive one by next generation sequencing using Ion Torrent technology.

Material and methods - 100 formalin-fixed paraffin-embedded tumour samples were tested simultaneously by both techniques under the conditions recommended by the suppliers. The comparison covered all technical and practical aspects of the laboratory.

Results - At least one *EGFR* mutation of interest for tyrosine kinase inhibitors for 9 and 7 samples was detected respectively by sequencing and by the Idylla system. For three samples, *EGFR* sensitive mutations to tyrosine kinase inhibitors were detected only by next-generation sequencing. In addition, for 37 samples, mutations of clinical interest outside *EGFR* were characterized by sequencing and communicated to the prescriber.

Conclusion - Idylla technology allows the rapid characterization of a majority of *EGFR* variants. The result can be optimized by careful analysis of the amplification curves with the Idylla Explore tool or by increasing the amount of initial material. A complementary next generation sequencing analysis for non-contributory results by Idylla should also be recommended.

KEYWORDS

EGFR, non-small cell lung cancer, next-generation sequencing, real-time PCR, technical comparison

Introduction

Avec 49 109 nouveaux cas estimés en France en 2017, le cancer du poumon se situe au 4^e rang des cancers incidents, tous sexes confondus, et au premier rang des décès par cancer [1].

Depuis les années 2000, la prise en charge du cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) a connu d'importantes avancées thérapeutiques. La prise en charge des stades localisés (< IIIb) repose sur la chirurgie complétée par une chimiothérapie adjuvante en fonction des critères pronostiques. Pour les stades localement avancés non résécables, le traitement de référence est la radiochimiothérapie qui peut être suivie par un entretien par immunothérapie pendant un an (Durvalumab) pour les carcinomes avec expression de PD-L1 ≥ 1 %. Pour les stades métastatiques (IV), la prise en charge repose sur les traitements systémiques seul ou en association (thérapies ciblées, immunothérapie, chimiothérapie). Le développement de nouveaux traitements ciblés sur les voies oncogéniques activées a permis l'accès à un nouvel arsenal thérapeutique efficace, globalement mieux tolérés et offrant aux patients une meilleure qualité de vie. Mieux définir l'hétérogénéité génétique intratumorale et préciser la diversité des oncogènes activés dans les CBNPC est, depuis, un préalable incontournable au succès des thérapies ciblées. Le principal oncogène ciblable à ce jour dans les CBNPC est le récepteur au facteur de croissance épidermique (*EGFR*), muté sur son domaine tyrosine kinase, qui est à l'origine de l'usage des inhibiteurs de tyrosine kinase de l'*EGFR* (ITK-*EGFR*).

L'*EGFR* qui appartient à la famille des récepteurs tyrosine kinase est codé par le gène *EGFR*, situé au niveau du chromosome 7. L'*EGFR* joue un rôle important dans la physiologie normale, mais aussi en carcinogénèse en favorisant la prolifération, la survie et l'invasion [2]. Dans la population caucasienne, la fréquence des mutations ciblables par les ITK-*EGFR* est rapportée entre 10 et 15 % des CBNPC. Dans la littérature, il est bien connu que cette proportion varie en fonction du sous-type de CBNPC, du genre, du statut fumeur ou non-fumeur des patients ainsi que de l'origine ethnique de la population [3,4]. L'utilisation des ITK-*EGFR* en tant que traitement de première ligne dans les CBNPC présentant des altérations génétiques oncogéniques de l'*EGFR* a permis une augmentation significative du taux de survie sans progression, par comparaison avec les traitements de chimiothérapies conventionnelles [5].

La détection spécifique, sensible et rapide des mutations de sensibilité ou de résistance de l'*EGFR* aux ITK-*EGFR* est un défi quotidien des laboratoires de génétique moléculaire des cancers. Pour répondre au mieux aux prescriptions, deux approches techniques existent : les techniques dites « ciblées » qui caractérisent généralement les mutations bien documentées de l'*EGFR* et le séquençage haut débit ou séquençage de nouvelle génération (NGS) qui peut explorer l'ensemble des exons d'intérêt (18 à 21) de l'*EGFR*. De plus, le séquençage par NGS permet de caractériser d'autres oncogènes ou gènes d'intérêt tels que *KRAS*, *HER2*, *BRAF*, *MET* par le séquençage d'un panel d'exons de gènes recommandé par l'INCa pour les CBNPC.

Le but de l'étude a été d'évaluer, de manière prospective, la caractérisation des variants de l'*EGFR* réalisée par deux technologies : la PCR en temps réel sur une plateforme Idylla (Biocartis) et le séquençage par NGS par la technologie Ion Torrent sur un séquenceur Ion S5 (Thermo Fisher Scientific). La comparaison a porté aussi bien sur des aspects proprement techniques que sur des aspects pratiques au laboratoire (délais de rendu, mise en œuvre).

Matériels et méthodes

Type d'étude

L'étude est une évaluation prospective, diagnostique et monocentrique comparant deux technologies dans le cadre de prescriptions de statut mutationnel de l'*EGFR* faites au laboratoire de génétique moléculaire de l'Institut de Cancérologie de l'Ouest (Tableau 1).

Echantillons

De manière systématique et prospective, d'octobre 2018 à février 2019, 100 échantillons tumoraux de CBNPC fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE pour Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) validés par un pathologiste ont été transmis au laboratoire de biologie moléculaire sous forme de sections de 10 µm (lames ou copeaux) dont une section était utilisée pour la technique Biocartis. La quantité de matériel devait permettre simultanément le séquençage par NGS (technique de référence au laboratoire) et une analyse sur automate Idylla selon les spécifications du fournisseur (Tableau 1).

Tout type histologique de CBNPC était éligible à l'étude. Les tumeurs avec une cellularité tumorale < 10 % et/ou fixées au Bouin et/ou dont la quantité de matériel était insuffisante pour réaliser les deux techniques ont été exclues (Tableau 1). Les cas exclus ne font pas partie des 100 échantillons étudiés.

Technologie NGS

L'ADN génomique (ADNg) somatique a été extrait avec le kit NucleoSpin DNA FFPE XS (Macherey Nagel) puis repris dans 100 µl de tampon d'éluion. La quantité d'ADNg somatique recommandée pour chaque échantillon était de 20 ng ou un volume maximum de 7,5 µL. La recherche de mutations des gènes par NGS a été réalisée avec un panel de 21 gènes comprenant les exons séquencés suivants: *AKT1* (NM_005163) exon 3, *ALK* (NM_004304) exons 23 à 25, *BRAF* (NM_004333) exons 11 et 15, *CTNNB1* (NM_001904) exon 3, *EGFR* (NM_005228) exons 18 à 21, *ERBB2* (NM_004448) exons 19 et 20, *ERBB4* (NM_005235) exons 10 et 12, *ESR1* (NM_000125) exon 8, *FGFR2* (NM_000141) exons 7, 12 et 14, *FGFR3* (NM_000142) exons 7, 9 et 14, *HRAS* (NM_005343) exons 2 à 4, *KIT* (NM_000222) exons 8, 9, 11, 13, 17 et 18, *KRAS* (NM_033360) exons 2 à 4, *MAP2K1* (NM_002755) exon 2, *MET* (NM_001127500) exons 2, 14 et 16 à 20, *NRAS* (NM_002524) exons 2 à 4, *PDGFRA* (NM_006206) exons 12, 14 et 18, *PIK3CA* (NM_006218) exons 10 et 21, *POLE* (NM_006231) exons 9 à 14, *STK11* (NM_000455) exons 1 à 9, *TP53* (NM_000546) exons 2 à 11. Les librairies ont été préparées par PCR multiplex (Kit Ion AmpliSeq Library 2.0 - Custom Panel, ThermoFisher Scientific), amplifiées par PCR en émulsion sur IonChef System et séquencées par NGS sur Ion S5 System avec le kit Ion 510 & Ion 520 & Ion 530 Kit Chef (ThermoFisher Scientific). Les données ont été analysées par Torrent Suite 5.4 et pipeline bioinformatique développé et utilisé au laboratoire (PICO-NGS v1.0). Les attentes analytiques du séquençage par NGS étaient les suivantes : profondeur de séquençage minimum 300X, couverture 100 %, sensibilité analytique 2,5 %, génome de référence hg19.

Technologie Idylla (Biocartis)

Le système Idylla est une solution de diagnostic moléculaire basée sur une PCR temps réel spécifique d'allèles entièrement automatisée. Elle associe dans une cartouche à usage unique l'extraction des échantillons et la PCR afin de détecter les cibles moléculaires à partir d'une variété d'échantillons solides ou liquides et notamment des sections FFPE. Dans cette étude, pour chaque échantillon, une section FFPE de 10 µm (lame ou copeau) a été placée directement dans la cartouche Biocartis du système Idylla, sans prétraitement, selon les recommandations du fournisseur. La cartouche a ensuite été insérée dans le système Idylla, où la technologie des ultrasons focalisés de haute intensité, les tampons, les réactifs et la chaleur induisent un déparaffinage, une rupture des tissus, une lyse cellulaire et une libération ultérieure d'ADN. Des amorces spécifiques d'allèles permettent une amplification et une détection en temps réel des mutations par des sondes d'hybridations fluorescentes selon la technologie PlexZyme et PlexPrime [6]. La cartouche testée était l'Idylla *EGFR* Mutation Test, contenant tous les consommables nécessaires. La console Idylla et les cartouches portent le marquage CE-IVD. Le test de mutation Idylla *EGFR* permet d'amplifier et de détecter 51 mutations dans les exons 18 à 21 de l'*EGFR* (Tableau 2). Un ensemble de paramètres en rapport avec les courbes d'amplification générées est déterminé par le logiciel Idylla, notamment la valeur ΔCq (différence entre la valeur de cycle de quantification (Cq) du signal de contrôle interne du gène *EGFR* (Cq contrôle *EGFR*) et le Cq du signal du variant). Un échantillon est classé comme muté si les paramètres de la courbe d'amplification générée se situent dans la plage validée soit avec un

Cq contrôle *EGFR* < 26. Le fournisseur indique des limites de sensibilité par mutation ou groupe de mutations en fonction du Cq contrôle *EGFR*. En cas de Cq contrôle *EGFR* > 26, le fournisseur recommande d'estimer l'échantillon comme non interprétable. Certains échantillons sont rendus « invalides » par le logiciel Idylla, le statut *EGFR* de ces échantillons est alors non déterminé. Les résultats obtenus lors du test Idylla *EGFR* Mutation Test au cours de cette étude n'ont pas été utilisés à des fins cliniques ou diagnostiques et n'ont pas été mis à la disposition des patients ou de leurs cliniciens. Le fournisseur Biocartis donne accès pour tous les échantillons aux courbes d'amplification générées dans chaque chambre de PCR avec l'outil informatique Idylla Explore (non marqué CE-IVD). Dans chaque chambre est amplifié un groupe de mutations *EGFR* spécifiques et un contrôle de traitement d'échantillon correspondant à la quantification de l'*EGFR* total. Les courbes générées correspondent à la quantité d'ADN amplifié en unité de fluorescence arbitraire en fonction du nombre de cycles d'amplification.

Etude des mutations *EGFR* discordantes

Pour les échantillons présentant une ou plusieurs mutations de l'*EGFR* par NGS et non retrouvées par le système Idylla dans les conditions recommandées par le fournisseur, une deuxième cartouche était réalisée. Afin d'augmenter la quantité d'ADN, cette deuxième analyse a été réalisée en augmentant le matériel FFPE ou à partir d'ADNg somatique initialement extrait pour l'analyse NGS.

Résultats

Données anatomopathologiques

Parmi les 100 échantillons de CBNPC étudiés, les types histologiques précisés par le laboratoire d'anatomopathologie étaient les suivants : 78 adénocarcinomes, 7 carcinomes/adénocarcinomes non classés, 7 carcinomes épidermoïdes, 7 carcinomes indifférenciés, et un carcinome neuro-endocrine à grandes cellules.

Concernant la nature des prélèvements, 87 échantillons étaient des biopsies, 4 étaient des pièces de résection et 9 étaient des cyto blocs. Les cellularités tumorales variaient entre 10 % et 80 % avec une moyenne de 38.95 %, un écart-type de 22.21 % et une médiane à 40 %. Quarante-six échantillons présentaient une cellularité tumorale inférieure ou égale à 30 % (Figure 1). Six échantillons FFPE ont été obtenus sous la forme de sections de 10 µm étalées sur lame et 94 sous forme de copeaux de même épaisseur.

Résultats des caractérisations moléculaires de l'*EGFR*

Les résultats de l'analyse moléculaire des échantillons FFPE par les deux techniques sont synthétisés dans le tableau 3. Neuf échantillons ont été détectés avec au moins une mutation de l'*EGFR* par NGS et 7 par le système Idylla. L'ensemble des variants *EGFR* retrouvés avec les deux techniques sont rapportés dans le tableau 4. Un variant de signification inconnue p.(Gly729Glu) dans l'exon 18 du gène *EGFR* a été détecté par NGS. Ce variant d'intérêt thérapeutique non établi ne fait pas partie des mutations de l'*EGFR* recherchées par le système Idylla. Quarante-deux échantillons ont été rendus « non mutés *EGFR* » par l'analyse NGS. L'automate Idylla indique 83 échantillons avec aucune mutation détectée sur l'ensemble des cibles recherchées de l'*EGFR*. Sept échantillons sont non interprétables ou non contributifs par NGS soit en raison de la dégradation importante de l'ADN, soit liés à la faible quantité d'ADN initiale. Dix échantillons sont non contributifs avec le système Idylla : 7 résultats sont « invalides » et 3 échantillons présentent une valeur de Cq contrôle *EGFR* supérieure à 26 considérée par le fournisseur comme la limite de sensibilité. Trois échantillons sont non contributifs avec l'une et l'autre des techniques (Figure 2).

Analyse des résultats discordants entre les deux techniques d'analyse de l'*EGFR*

Trois échantillons se sont révélés discordants (Tableau 4), pour chaque cas les conditions matérielles requises par le fournisseur pour la bonne exécution du test ont été respectées.

Patient 1

Le prélèvement était une biopsie d'adénocarcinome pulmonaire TTF1+ d'une femme de 66 ans, avec une cellularité tumorale évaluée à 20 % (plus de 100 cellules analysables). L'analyse par NGS met en évidence deux mutations *EGFR* : un variant c.2154_2155GG>TT, p.(Gly719Cys) dans l'exon 18 et un variant c.2303G>T, p.(Ser768Ile) dans l'exon 20, avec des fréquences alléliques respectives de 18.4 % et 14.7 %. L'analyse sur Idylla ne détecte aucune mutation (Cq contrôle *EGFR* = 24). Cependant l'outil Idylla Explore montre des courbes d'amplification avec un nombre de cycles supérieur au seuil de 26 pour les cibles G719C et S768I (Figure 3 E). Une deuxième analyse Idylla réalisée avec 65 ng d'ADNg utilisé pour l'analyse par NGS permet au système Idylla de détecter ces deux mutations.

Patient 2

Les copeaux d'échantillon FFPE reçus au laboratoire étaient issus d'une biopsie d'adénocarcinome pulmonaire TTF1+ chez une femme de 51 ans. La cellularité tumorale était de 10 % (avec moins de 100 cellules analysables). L'analyse par NGS a détecté une délétion complexe c.2237_2255delinsT, p.(Glu646_Ser752delinsVal) en phase dans l'exon 19 du gène *EGFR* avec une fréquence allélique de 1.6 %. La présence de cette délétion a été ensuite confirmée par analyse de fragment.

L'analyse sur Idylla avec un copeau puis, dans un second temps, avec 115 ng dans 50 µL d'ADNg somatique extrait pour l'analyse NGS ne détecte aucune mutation. Dans cette seconde analyse, les valeurs de Cq contrôles *EGFR* sont respectivement de 24.6 et 23.6, respectant la limite de 26 du fabricant. L'apparition de produits d'amplification mutation spécifique avant le contrôle *EGFR* total semble indiquer

une amplification non spécifique importante dans certaines chambres (Figure 4 A, B, D, E). Ce bruit de fond important ne permet pas à l'algorithme du logiciel Idylla d'interpréter les résultats.

Patient 3

Le prélèvement concerne une biopsie d'adénocarcinome pulmonaire chez un homme de 85 ans. La cellularité tumorale des copeaux était estimée à 20 % (avec plus de 100 cellules analysables). L'analyse par NGS a mis en évidence deux mutations *EGFR* : un variant c.2573T>G, p.(Leu858Arg) dans l'exon 21 à une fréquence allélique de 34.8 % et un variant c.2369C>T, p.(Thr790Met) dans l'exon 20 à une fréquence allélique 9.9 %, proche d'un polymorphisme c.2361G>A, p.(Gln787Gln) (Figure 5). L'analyse sur l'automate Idylla à partir d'une section de 10 µm ou à partir de 50 ng dans 50 µL d'ADNg somatique extrait pour l'analyse NGS détecte uniquement la mutation *EGFR* p.(Leu858Arg) (Cq contrôles *EGFR* respectivement à 22.7 et 22.6). Les courbes de PCR dans Idylla Explore ne montrent pas de bruit de fond dans la chambre de détection de la mutation p.(Thr790Met) (Figure 6 C), le système Idylla valide donc l'absence de cette mutation.

Autres cibles moléculaires mises en évidence par l'analyse NGS

Pour 37 échantillons sur les 100 analysés, les mutations non *EGFR* d'intérêt pour la prise en charge des patients (Tableau 5) ont été rendues au prescripteur après analyse NGS avec le panel de 21 gènes, et quarante-huit échantillons ont été rendus non mutés.

Aspects pratiques : délais, ressources humaines, procédure qualité

- Séquençage par NGS

En terme de délai, l'analyse par séquençage NGS d'une série d'échantillons de tumeurs thoraciques au laboratoire de biologie moléculaire de l'Institut de Cancérologie de l'Ouest nécessite : la partie technique semi-automatisée de 3 jours réalisée par des techniciens qualifiés et habilités, le séquençage effectué en une journée et l'analyse bioinformatique d'une journée. L'interprétation et la validation biologique par des biologistes moléculaires ajoutent 2 jours selon le nombre de variants identifiés et le nombre d'échantillons de la série. Le délai de rendu des résultats annoncé au prescripteur de 10 jours ouvrés est en général respecté. L'analyse par NGS requiert une infrastructure adaptée (locaux pré-PCR et post-PCR, thermocycleur, séquenceur et consommables et un personnel qualifié). La démarche qualité comprenant l'habilitation-qualification du personnel, les procédures et l'analyse bioinformatique selon la norme ISO 15189 est complexe.

- Plateforme Idylla

Pour l'analyse d'un échantillon sur le système Idylla : la partie technique consiste à déposer le matériel FFPE dans la cartouche à usage unique et à charger celle-ci dans le module Idylla (temps inférieur à 2 minutes). L'analyse par l'automate dure 150 minutes pour un échantillon, temps auquel il faut rajouter l'interprétation biologique qui est très variable en fonction de la complexité du cas. Cette interprétation biologique est réalisée avec la valeur de Cq contrôle *EGFR* grâce au rapport Idylla automatiquement généré. Pour plusieurs échantillons, le délai de rendu des résultats dépend du nombre de modules disponibles au laboratoire. Aucune infrastructure ou matériel particulier n'est nécessaire pour la réalisation de la technique Idylla. La démarche qualité selon la norme ISO 15189 est simple (marquage CE-IVD) et ne requiert pas de compétence particulière.

Discussion - Conclusion

La preuve de l'intérêt de la caractérisation des mutations de l'*EGFR* dans les CBNPC n'est plus à faire compte tenu de l'efficacité des ITK-EGFR dans cette pathologie. L'enjeu pour les laboratoires réalisant cette analyse est aujourd'hui de répondre aux prescriptions de manière sensible et spécifique dans des délais compatibles avec la prise en charge des patients. Cette étude prospective inédite avait pour objectif de comparer deux technologies : le système de PCR temps réel entièrement automatisé Idylla ciblant 51 mutations de l'*EGFR* et le séquençage par NGS d'un panel de 21 gènes comprenant les exons 18 à 21 de l'*EGFR*. Les études publiées évaluant l'Idylla *EGFR* Mutation Test sont des études rétrospectives comme celle d'Ilie et *al.* comparant système Idylla et pyroséquençage [7]. Les spécifications des fournisseurs ont été respectées pour les 100 échantillons testés avec les deux techniques. L'intérêt particulier de ce travail était d'avoir une évaluation concrète à la fois scientifique et pratique des techniques, dans les conditions réelles de l'activité d'un laboratoire de biologie moléculaire des cancers. L'étude a ainsi été effectuée sans biais de choix d'échantillons et avec les contraintes quotidiennes rencontrées dans cette localisation tumorale [8]. Dans quasiment la moitié des cas, les prélèvements avaient une cellularité inférieure ou égale à 30 % dont 19 avaient une cellularité tumorale estimée à 10 % par le pathologiste.

Le taux de mutés *EGFR* retrouvé dans cette étude (9%) est en deçà du taux attendu dans la littérature [3,4]. Deux arguments expliquent ce résultat. D'une part, la fréquence des mutations de l'*EGFR* est 4,4 fois plus élevée pour les types adénocarcinomes que pour les types non-adénocarcinomes [9], or parmi les 100 échantillons de cette étude, 15 échantillons étaient de type histologique non-adénocarcinome dont 7 carcinomes épidermoïdes. D'autre part, le taux de mutation est dépendant de la cellularité tumorale, or 46 % des échantillons présentaient une cellularité tumorale < 30% et donc un risque accru de résultats faussement négatifs.

Les résultats montrent une concordance partielle entre les deux techniques concernant les résultats non contributifs. De même, parmi les mutations *EGFR* retrouvées, 7 échantillons étaient concordants et 3 échantillons étaient discordants avec une mutation *EGFR* caractérisée par NGS et non retrouvées sur Idylla.

La première discordance concernait une co-mutation *EGFR* présente à des fréquences alléliques > 10 % par NGS, une seconde cartouche Idylla avec une quantité plus élevée de matériel a permis la mise en évidence des mutations, indiquant que cette discordance peut être attribuée à une quantité insuffisante de matériel insérée dans la cassette. En pratique, lorsqu'on met dans la cassette Idylla un copeau de 10 µm, selon les recommandations du fournisseur Biocartis, on ignore la surface réelle de l'échantillon. Dans ce premier cas discordant, la cellularité tumorale était de 20 %. L'augmentation de la quantité de matériel avait donc permis de passer d'un Cq contrôle *EGFR* de 24 (proche de 26, seuil à partir duquel le résultat *EGFR* ne peut être rendu) à 22.8. Dans ce cas l'analyse des courbes d'amplification par Idylla Explore a permis de suspecter la présence des deux mutations caractérisées par NGS et d'envisager une approche complémentaire (Figure 3 E).

La seconde discordance concernait un échantillon avec une cellularité tumorale estimée d'environ 10 %. L'analyse par NGS caractérisait une délétion dans l'exon 19 de l'*EGFR* avec une fréquence allélique de 1,6 %, inférieure à notre sensibilité analytique évaluée à 2,5 %. Après confirmation de sa présence par analyse de fragment, cette altération a cependant été rendue auprès du prescripteur permettant ainsi au patient d'accéder à une thérapie ciblée par un ITK-EGFR. Dans ce cas, l'augmentation de la quantité de matériel introduite dans la cassette Idylla n'a pas permis la mise en évidence de la mutation malgré des valeurs de Cq contrôle *EGFR* à 24.6 avec 1 copeau et 23.6 avec 50 µL d'ADNg extrait. L'analyse des courbes d'amplification par Idylla Explore montre dans les deux analyses un bruit de fond dans plusieurs de chambres de PCR (Figure 4), le résultat est donc éliminé par l'algorithme. Il ne semble donc pas ici que la faible quantité de matériel soit à l'origine du résultat négatif. Cette discordance souligne à la fois la grande sensibilité de l'analyse NGS et l'intérêt de tester tous les échantillons indépendamment de la cellularité pour donner le maximum d'opportunités thérapeutiques au patient.

L'échantillon impliqué dans la troisième et dernière discordance présentait une cellularité tumorale de 20 %, les deux techniques ont détecté la présence d'une mutation de sensibilité p.(Leu858Arg), mais seul le

NGS a retrouvé une mutation p.(Thr790Met) à une fréquence allélique de 9.9 %. Cette mutation présente une grande importance en pratique clinique puisqu'elle est très couramment associée à une résistance acquise aux ITK-EGFR de première et deuxième générations [10–13] et ouvre accès à un ITK-EGFR de troisième génération, l'osimertinib [14]. Le système Idylla n'a détecté la mutation ni dans les conditions CE-IVD avec un copeau ni en présence d'une quantité d'ADNg somatique plus importante bien que dans les deux cas les Cq contrôles *EGFR* étaient très satisfaisants (respectivement 22.7 et 22.6). La sensibilité analytique annoncée par le fournisseur pour la mutation p.(Thr790Met) avec un Cq contrôle *EGFR* de 22.4 est de 3.9 % donc bien inférieure à la fréquence allélique retrouvée au NGS. Cependant, la présence du polymorphisme p.(Gln787Gln) en amont de la mutation p.(Thr790Met) pourrait expliquer l'absence de détection de la mutation p.(Thr790Met). En effet, pour une valeur de Cq contrôle *EGFR* de 22.7, la sensibilité du variant p.(Thr790Met) en présence du polymorphisme p.(Gln787Gln) a été estimée par le service Recherche et Développement Biocartis à 15 % donc très supérieure à la fréquence allélique retrouvée de 9,9 % par NGS. « L'Exome Aggregation Consortium » (ExAC) indique que ce polymorphisme p.(Gln787Gln) est présent chez 52 % de la population. Donc une attention particulière sur l'analyse des résultats devra être portée en absence de caractérisation de ce polymorphisme en particulier sur la détection du variant p.(Thr790Met). En cas d'absence de variant p.(Thr790Met), du fait de l'importance de cette mutation dans la prise en charge des patients, il serait conseillé d'effectuer une analyse complémentaire par une méthode insensible à la co-mutation p.(Gln787Gln).

En outre, l'analyse par NGS d'un panel de 21 gènes comprenant ceux recommandés par l'INCa permet de détecter de manière exhaustive les mutations de l'*EGFR*, dont la mutation de résistance aux ITK-EGFR de troisième génération p.(Cys797Ser) [15] qui est absente des mutations recherchées par le système Idylla. L'analyse par NGS permet également la détection sur d'autres gènes de variants d'intérêt thérapeutique. Par exemple, parmi les mutations retrouvées (Tableau 5), les mutations activatrices des oncogènes *KRAS* ou *BRAF* dans les CBNPC sont généralement mutuellement exclusives des mutations *EGFR* [16] et donnent ainsi une information précieuse sur les traitements à mettre en place. Par ailleurs, la présence d'une co-mutation des gènes *KRAS* et *STK11* a été associée à une moindre réponse aux inhibiteurs de checkpoints immunitaires (anti-PD-1, anti-PD-L1) [17]. Ou encore, les mutations susceptibles de créer un saut d'exon 14 du gène *MET* ou les insertions dans l'exon 20 du gène *HER2* sont des mutations d'intérêt dans les CBNPC et peuvent constituer des cibles thérapeutiques [18]. Les fréquences des mutations non *EGFR* retrouvées au NGS dans les 100 échantillons testés (Tableau 5) sont en accord avec les données de la littérature concernant les fréquences des oncogènes activés dans les CBNPC [3,4].

D'un point de vue pratique, le système Idylla est d'utilisation extrêmement simple aussi bien au niveau des infrastructures, du matériel et de la technique en comparaison avec le NGS. La démarche qualité selon la norme ISO15189, les ressources humaines nécessaires et l'habilitation du personnel sont également en faveur d'Idylla. La technique Idylla permet un délai de réponse de quelques heures pour un échantillon, temps auquel il faut rajouter l'interprétation biologique du résultat et possiblement de visualisation et d'analyse des courbes d'amplification obtenues par Idylla Explore. Selon notre expertise, une analyse des courbes d'amplification devrait être systématique pour des valeurs de Cq comprises entre 23 et 26.

En conclusion, pour les 100 échantillons testés de manière prospective simultanément par séquençage NGS et par l'automate Idylla, 3 faux négatifs ont été rapportés avec le système Idylla, mais aucun faux positif sur un total de 9 patients éligibles à une thérapie ciblée par les ITK. Par ailleurs, il est à noter que sur les 12 variants de l'*EGFR* identifiés par NGS parmi les 9 patients, 4 variants n'ont pas été rendus par la procédure de compte rendu automatique de l'automate Idylla. Ces résultats sont en faveur d'une bonne valeur prédictive positive du système Idylla mais d'une valeur prédictive négative moins satisfaisante. Il faut cependant rappeler le contexte particulier des CBNPC où les échantillons sont très souvent pauvres en quantité de matériel et en cellules tumorales et approchent alors les limites de sensibilité des techniques analytiques.

Pour diminuer le nombre de faux négatifs avec le système Idylla, notre expérience nous incite à recommander : d'une part augmenter le nombre de copeaux insérés dans la cassette en cas de faible cellularité tumorale du prélèvement et d'autre part regarder systématiquement les courbes d'amplification avec Idylla Explore pour les échantillons avec une valeur de Cq contrôle *EGFR* entre 23 et 26, ce qui est le cas pour un tiers des échantillons. L'analyse des courbes d'amplification peut permettre une seconde analyse Idylla avec plus de matériel FFPE ou avec de l'ADNg somatique extrait, ce qui est actuellement

une utilisation en dehors des recommandations du fournisseur. La possibilité de récupérer le lysat dans la cassette Idylla préalablement analysée pourrait également être envisagée pour optimiser l'analyse et détecter d'autres cibles d'intérêt. Pour les valeurs de Cq contrôle *EGFR* inférieures à environ 23, l'automate Idylla semble une méthode rapide de réponse pour une caractérisation ciblée d'une majorité de variants de l'*EGFR*. Cependant une analyse par séquençage NGS est une alternative plus informative pour les échantillons faiblement cellulaires, avec un Cq contrôle *EGFR* limite et pour la recherche de la mutation de résistance p.(Thr790Met) aux ITK-*EGFR* de première et deuxième générations.

Remerciements

AstraZeneca pour leur soutien financier pour l'achat des réactifs Idylla *EGFR* Mutation Test (Biocartis).
Biocartis pour leur collaboration à l'interprétation des cas discordants.

Déclaration de liens d'intérêts

C.L-M., B.A., R.A., V.V., M.A. : frais de déplacements et d'hébergement pris en charge par AstraZeneca pour des réunions scientifiques.

P.C. et B.F. déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Le cancer du poumon - Les cancers les plus fréquents [Internet]. [cité 27 mars 2019]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Les-cancers-les-plus-frequents/Cancer-du-poumon>
- [2] Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol.* avr 2009;21(2):177-84.
- [3] Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* févr 2011;12(2):175-80.
- [4] Meador CB, Micheel CM, Levy MA, Lovly CM, Horn L, Warner JL, et al. Beyond histology: translating tumor genotypes into clinically effective targeted therapies. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 mai 2014;20(9):2264-75.
- [5] Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, Yang C-H, Chu D-T, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 3 sept 2009;361(10):947-57.
- [6] Tan LY, Walker SM, Lonergan T, Lima NE, Todd AV, Mokany E. Superior Multiplexing Capacity of PlexPrimers Enables Sensitive and Specific Detection of SNPs and Clustered Mutations in qPCR. *PLOS ONE.* 23 janv 2017;12(1):e0170087.
- [7] Ilie M, Butori C, Lassalle S, Heeke S, Piton N, Sabourin J-C, et al. Optimization of EGFR mutation detection by the fully-automated qPCR-based Idylla system on tumor tissue from patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 4 oct 2017;8(61):103055-62.
- [8] Breton Q, Valo I, Benallègue F, Morel A, Verrière V. Influence de la cellularité tumorale dans la recherche des mutations des cancers du poumon : expérience du centre Paul Papin (Angers). </data/revues/02426498/v35i5/S0242649815001510/> [Internet]. 8 oct 2015 [cité 28 mai 2019]; Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/en/article/1008091>

- [9] INCa. ©Mutations de l'EGFR dans le cancer du poumon : mise en évidence d'une cible moléculaire permettant un accès spécifique aux thérapies ciblées. INCa, Boulogne Billancourt; 2010.
- [10] Forde PM, Ettinger DS. Managing acquired resistance in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Clin Adv Hematol Oncol HO*. août 2015;13(8):528-32.
- [11] Jotte RM, Spigel DR. Advances in molecular-based personalized non-small-cell lung cancer therapy: targeting epidermal growth factor receptor and mechanisms of resistance. *Cancer Med*. nov 2015;4(11):1621-32.
- [12] Nguyen K-SH, Kobayashi S, Costa DB. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. *Clin Lung Cancer*. juill 2009;10(4):281-9.
- [13] Stewart EL, Tan SZ, Liu G, Tsao M-S. Known and putative mechanisms of resistance to EGFR targeted therapies in NSCLC patients with EGFR mutations-a review. *Transl Lung Cancer Res*. févr 2015;4(1):67-81.
- [14] Jiang T, Zhou C. Clinical activity of the mutant-selective EGFR inhibitor AZD9291 in patients with EGFR inhibitor—resistant non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. déc 2014;3(6):370-2.
- [15] Thress KS, Paweletz CP, Felip E, Cho BC, Stetson D, Dougherty B, et al. Acquired EGFR C797S mediates resistance to AZD9291 in advanced non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med*. juin 2015;21(6):560-2.
- [16] V Sequist L, S Heist R, T Shaw A, Fidias P, Rosovsky R, S Temel J, et al. Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 9 nov 2011;22:2616-24.
- [17] Skoulidis F, Goldberg ME, Greenawalt DM, Hellmann MD, Awad MM, Gainor JF, et al. STK11/LKB1 Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma. *Cancer Discov* [Internet]. 17 mai 2018 [cité 19 avr 2019]; Disponible sur: <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/early/2018/06/20/2159-8290.CD-18-0099>
- [18] Genetically Informed Cancer Medicine - My Cancer Genome [Internet]. [cité 19 avr 2019]. Disponible sur: <https://www.mycancergenome.org/>

Figure 1. Répartition des cellularités tumorales des échantillons

Figure 1. Distribution of samples tumor cellularities

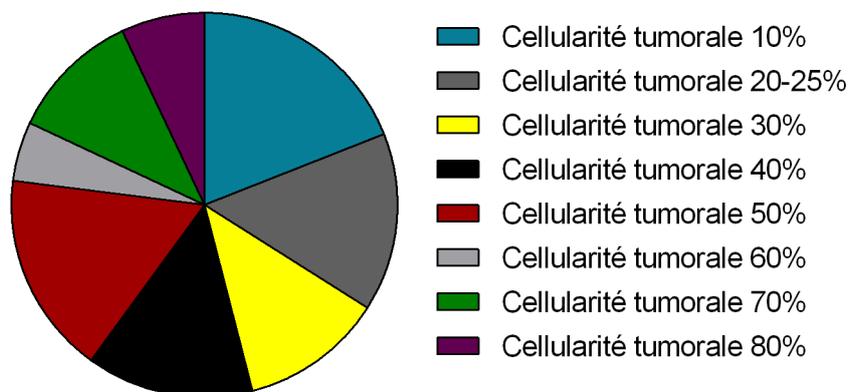


Figure 2 : Echantillons non interprétables (NI)

Figure 2: Uninterpretable (NI) samples

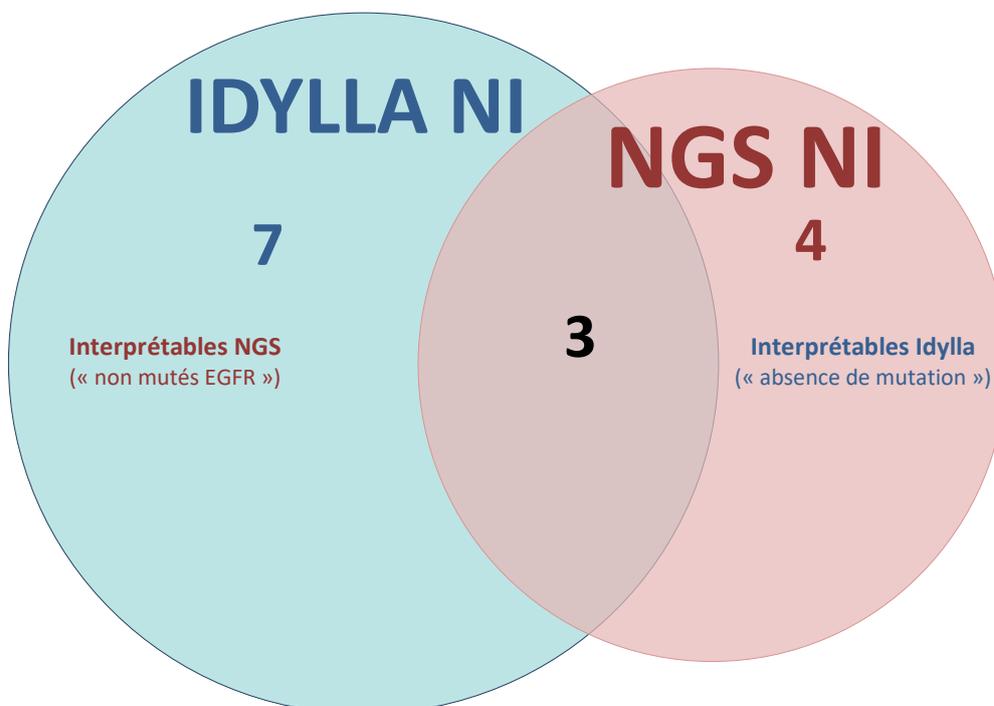
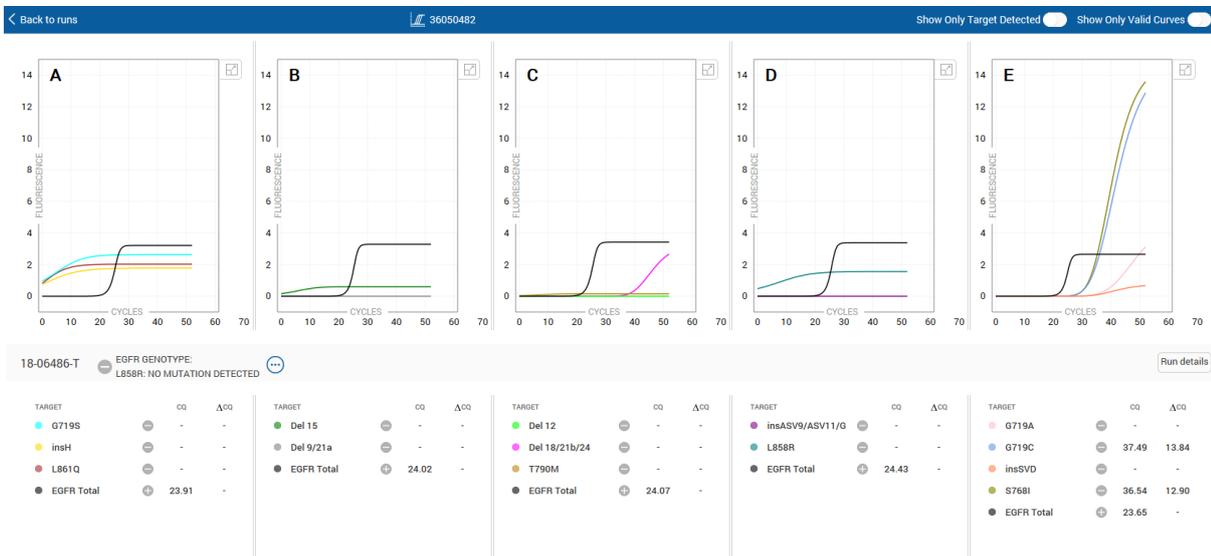


Figure 3 : Cas 1 : Courbes d'amplification générées par le système Idylla dans l'outil Idylla Explore.

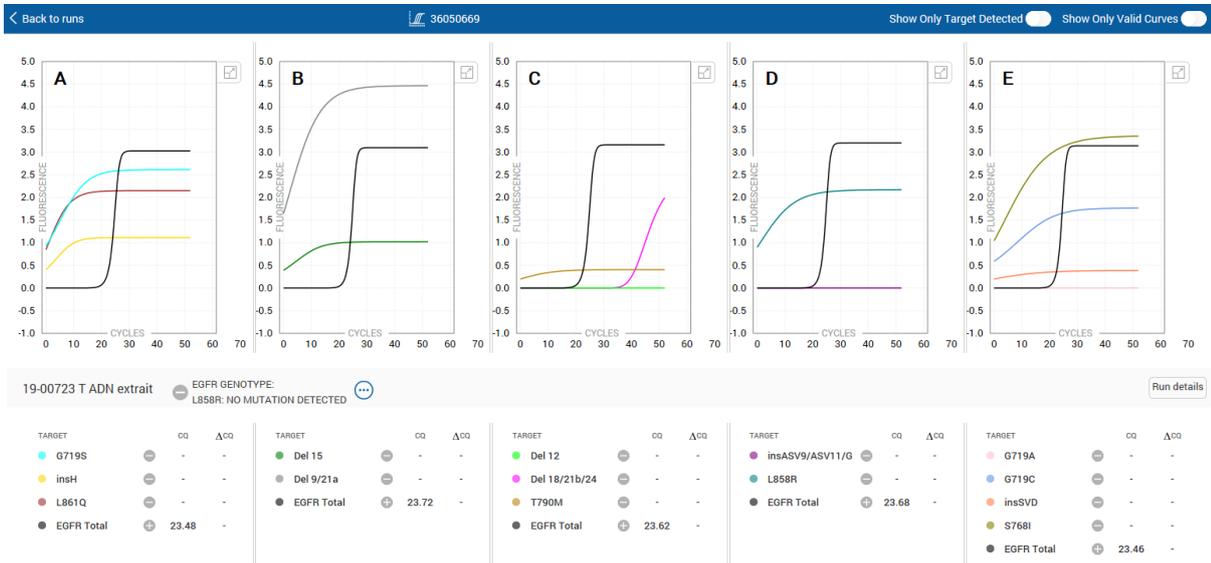
Figure 3: Case 1: Amplification curves generated by the Idylla system in the Idylla Explore tool.



Les chambres A, B, C et D ne montrent pas d'amplification spécifique. Dans la chambre E, malgré un résultat négatif rendu par l'algorithme du logiciel Idylla, les courbes d'amplification visualisées laissent suspecter la présence des cibles G719C et S768I.

Figure 4 : Cas 2 : Courbes d'amplification générées par le système Idylla dans l'outil Idylla Explore

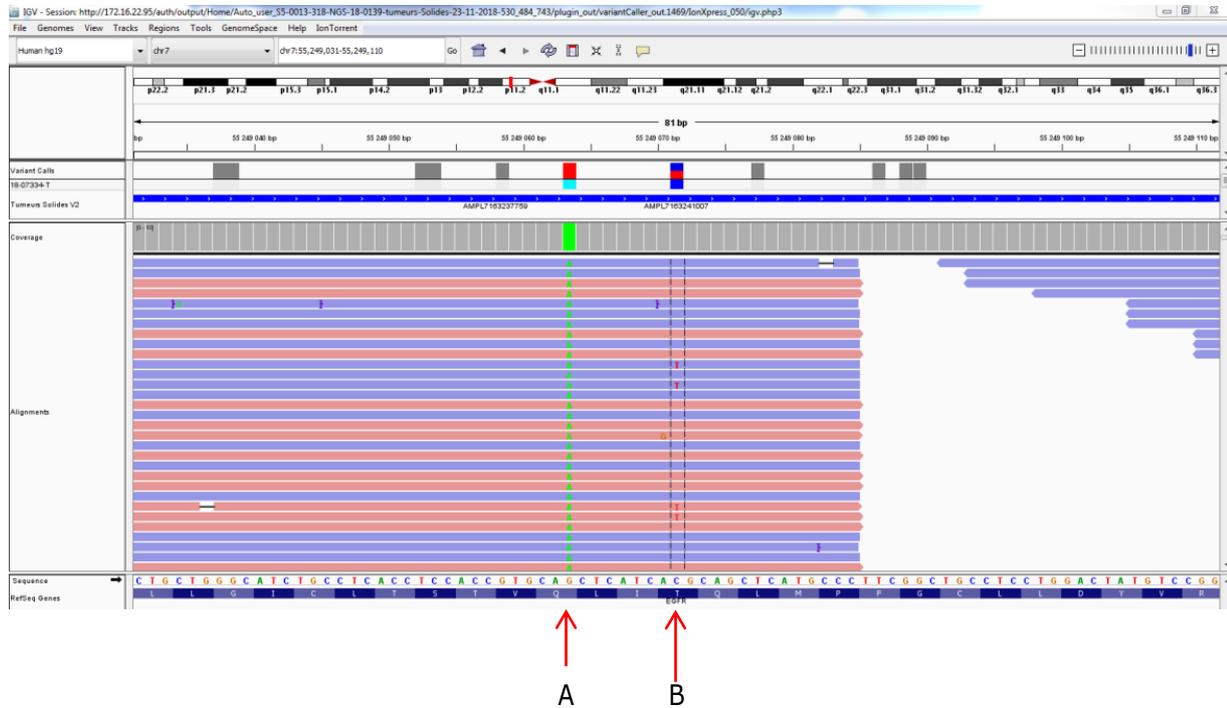
Figure 4 : Case 2 : Amplification curves generated in each room by the Idylla system in the Idylla Explore tool



La présence d'amplification non spécifique dans les chambres A, B, D et E ne permet pas à l'algorithme du logiciel Idylla d'interpréter les résultats et d'identifier la mutation mise en évidence par NGS (délétion complexe c.2237_2255delinsT, p.(Glu646_Ser752delinsVal) en phase dans l'exon 19 du gène *EGFR*). On note une absence d'amplification dans la chambre C.

Figure 5 : Visualisation avec l'outil Integrative Genomic Viewer du variant c.2369C>T, p.(Thr790Met) détecté par NGS

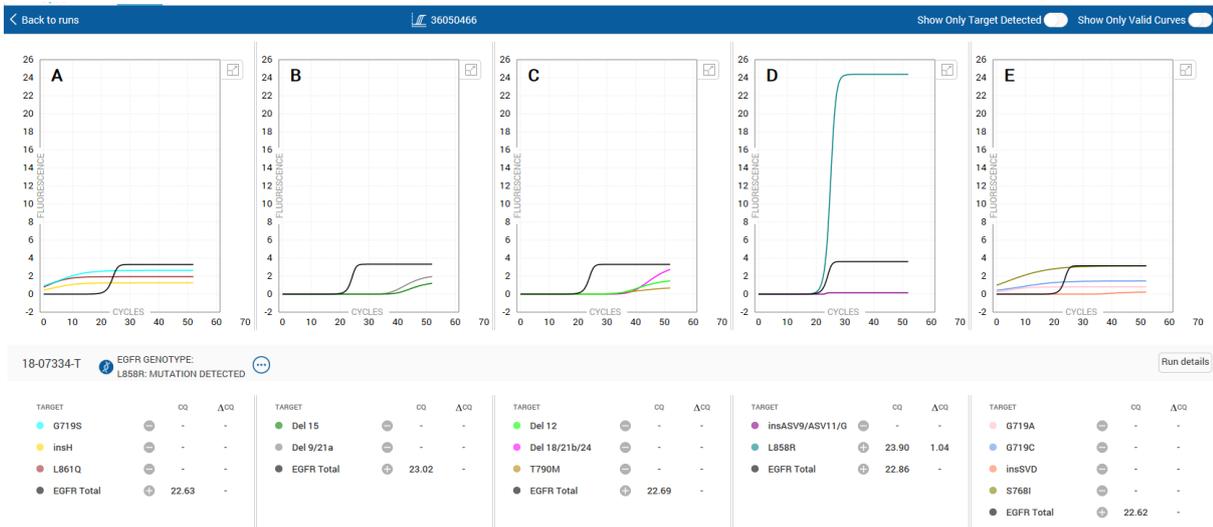
Figure 5 : Integrative Genomic Viewer visualization of c.2369C>T, p.(Thr790Met) mutation detected by NGS



- A. Polymorphisme EGFR c.2361G>A, p.(Gln787Gln)
- B. Mutation EGFR c.2369C>T, p.(Thr790Met)

Figure 6 : Cas 3 : Courbes d'amplification générées par le système Idylla dans l'outil Idylla Explore

Figure 6: Case 3 : Amplification curves generated by the Idylla system in the Idylla Explore tool



Dans la chambre D, la mutation L858R est clairement détectée. En revanche, dans la chambre C, les courbes d'amplification ne permettent pas de visualiser la mutation T790M mise en évidence par NGS. Les chambres A, B et E ne montrent pas d'amplification spécifique.

Tableau 1 : Caractéristiques de l'étude**Table 1 : Characteristics of the study**

Nom de l'étude	Recherche de mutations du gène EGFR chez les patients atteints d'un CBNPC : comparaison des technologies Idylla et NGS Ion Torrent
Type d'étude	Evaluation prospective, diagnostique, mono centrique
Population	Patients atteints d'un CBNPC pour lesquels une demande de statut mutationnel EGFR est faite à la plateforme de génétique moléculaire de l'ICO Paul Papin
Nombre de patients	100 patients
Objectifs	<ul style="list-style-type: none">- Tester la concordance des résultats de la recherche des mutations du gène EGFR entre l'automate Idylla et l'analyse par NGS d'un panel personnalisé de gènes- Comparer la sensibilité des deux techniques- Comparer le délai de réponse entre les 2 techniques
Matériel	Tissu FFPE : lames ou copeaux
Critère d'inclusion	Patient atteint d'un cancer bronchique non à petites cellules (tous types histologiques)
Critère de non-inclusion	<ul style="list-style-type: none">- Cellularité tumorale <10%- Fixation au Bouin

Tableau 2 : Mutations détectées par le test Idylla EGFR Mutation Test

Table 2 : Mutations detected by the Idylla EGFR Mutation Test

Oncogène	Exon	Résultat rendu par Idylla	Mutation
EGFR	18	G719A/C/S	c.2156G>C c.2155G>T c.2155G>A
	19	Exon 19 deletions	c.2238_2248delinsGC c.2239_2248delinsC c.2240_2248del c.2239_2247del c.2239_2251delinsC c.2240_2251del c.2235_2249del c.2236_2250del c.2239_2253del c.2240_2254del c.2238_2252del c.2237_2251del c.2235_2252delinsAAT c.2237_2252delinsT c.2234_2248del c.2236_2253delinsCTA c.2237_2253delinsTA c.2235_2251delinsAG c.2236_2253delinsCAA c.2230_2249delinsGTCAA c.2240_2257del c.2237_2255delinsT c.2239_2256del c.2236_2253del c.2239_2258delinsCA c.2237_2254del c.2238_2255del c.2237_2257delinsTCT c.2236_2255delinsAT c.2236_2256delinsATC c.2237_2256delinsTT c.2237_2256delinsTC c.2235_2255delinsGGT c.2238_2258del c.2236_2256del c.2253_2276del
	20	T790M	c.2369C>T
		S768I	c.2303G>T
		Exon 20 insertions	c.2310_2311insGGT c.2307_2308insGCCAGCGTG c.2309_2310delinsCCAGCGTGGAT c.2311_2312insGCGTGGACA c.2319_2320insCAC
	21	L858R	c.2573T>G c.2573_2574delinsGT c.2573_2574delinsGA
		L861Q	c.2582T>A

Tableau 3 : Résultats de la recherche de mutation du gène EGFR par chaque technique

Table 3: Results of the EGFR gene mutation testing by each technique

Résultats	NGS Ion Torrent	Idylla
Mutés EGFR	9	7
Non mutés EGFR	83	83
Variant de signification inconnue EGFR	1	0
Non interprétables / non contributifs	7	10 dont : - 7 échantillons Cq contrôle EGFR >26 - 3 « invalides »

Tableau 4 : Mutations EGFR caractérisées par chaque technique (discordances en gris)

Table 4 : EGFR mutations characterized by each technique (discordances in grey)

Patient	% Cellules tumorales	NGS			Idylla	
		Mutation EGFR (nomenclature HGVS)	Exon	Fréquence allélique	Mutation EGFR présente sur le compte-rendu Idylla	Contrôle EGFR total
1	20 %	c.2154_2155GG>TT, p.(Gly719Cys) c.2303G>T, p.(Ser768Ile)	18 20	18.4 % 14.7 %	Aucune mutation détectée Aucune mutation détectée	CQ 24
2	10 %	Délétion c.2237_2255delinsT, p.(Glu746_Ser752delinsVal)	19	1.6 %	Aucune mutation détectée	CQ 24.6
3	20 %	c.2573T>G, p.(Leu858Arg) c.2369C>T, p.(Thr790Met)	21 20	34.8 % 9.9 %	p.(Leu858Arg) Aucune mutation détectée	CQ 22.7
4	70 %	Insertion c.2317_2319dup, (p.His773dup)	20	39.3 %	Insertion exon 20	CQ 22.8
5	50 %	c.2573T>G, p.(Leu858Arg)	21	6.8 %	p.(Leu858Arg)	CQ 20.2
6	70 %	c.2125G>A, p.(Glu709Lys) c.2155G>A, p.(Gly719Ser)	18 18	12.7 % 10.5 %	Mutation non recherchée p.(Gly719Ala/Cys/Ser)	CQ 16.5
7	70 %	c.2573T>G, p.(Leu858Arg)	21	16.8 %	p.(Leu858Arg)	CQ 23.3
8	40 %	c.2573T>G, p.(Leu858Arg)	21	59.9 %	p.(Leu858Arg)	CQ 22.4
9	40 %	Délétion c.2239_2253delinsCCT, p.(Leu747_Thr751delinsPro)	19	6.1 %	Délétion exon 19	CQ 20.1
10	80 %	c.2186G>A, p.(Gly729Glu)	19	14.2 %	Aucune mutation détectée Mutation non recherchée	CQ 21.2

Tableau 5 : Mutations signalées sur le compte rendu de biologie moléculaire après analyse NGS

Table 5 : Mutations reported on molecular biology report after NGS analysis

Gène(s) concerné(s)	Nombre d'échantillons concernés
KRAS	22
KRAS et STK11	9
MET	2
BRAF V600E	1
BRAF non V600E	1
NRAS	1
HER2	2

1.1.1. Résultats de l'article 1

La détection des mutations de sensibilité aux ITK-EGFR est un préalable à leur administration, les contraintes de fiabilités, de temps et de budget sont des préoccupations permanentes de ces recherches diagnostiques en pratique courante. Ce sont ces derniers paramètres que visait notre étude prospective comparant la recherche du statut mutationnel de l'EGFR par NGS au niveau des exons 18 à 21, méthode de référence, et l'analyse par Idylla. Cette dernière correspond à une PCR en temps réel entièrement automatisée recherchant 51 mutations bien documentées de l'EGFR.

Cette étude a comparé 100 échantillons FFPE originaires de CBNPC tous sous-types histologiques confondus avec une cellularité tumorale d'au moins 10%. Par NGS, 12 échantillons ont ainsi été caractérisés avec au moins une mutation de l'EGFR contre seulement 9 avec la technologie Idylla. A ces trois cas discordants, dont un qui n'était pas compris dans les mutations recherchées par l'automate, il faut ajouter un patient dont la mutation de sensibilité p.Leu858Arg a été détectée mais pas la mutation de résistance aux ITK-EGFR de première génération p.Thr790Met. D'autre part, l'analyse par NGS comprenant également la recherche de mutations dans 21 autres gènes, des variants hors EGFR ont été détectés dans 37 échantillons impliquant une prise de décision thérapeutique.

1.1.2. Discussion de l'article 1

La rapidité de l'analyse à l'aide de la technologie Idylla (150min) constitue son avantage principal. Cependant, la discordance des résultats indique qu'elle doit être optimisée en exploitant les courbes d'amplification ou en augmentant les quantités initiales de matériel. La prescription d'une analyse NGS complémentaire en cas de non contributif semble indispensable. Le manque de sensibilité de la technique, responsable de deux cas discordants, semblent être un problème majeur surtout lors de l'analyse de prélèvement issus de CBNPC qui présentent régulièrement de faibles cellularités. La recherche de seulement 51 variants de l'EGFR semble également être restrictive, responsable de la non détection d'un variant dans un des prélèvements. D'autre part, l'Osimertinib étant aujourd'hui administré en première ligne de traitement, la mutation de résistance p.Cys797Ser de l'EGFR devrait être ajoutée à ce panel, tout comme les variants p.Gly724Ser et p.Leu718Gln. En effet, le panel de variants recherché ne semble pas être adapté à l'administration de cet ITK-EGFR de troisième génération. Malgré ces ajouts, l'analyse NGS a permis simultanément de caractériser des variants présents dans 21 autres gènes chez 37 échantillons leurs donnant accès à d'autres opportunités thérapeutiques et constituant l'un des avantages majeurs de l'analyse à l'aide de panels étendus.

Enfin, dans l'un des cas discordants, la mutation de sensibilité p.Leu858Arg de l'EGFR a bien été détectée à l'aide de la technologie Idylla mais ce n'est pas le cas du variant p.Thr790Met qui était pourtant également présent à une fréquence de 9.9%. L'une des explications possibles à cette discordance est la présence à proximité de la mutation recherchée du polymorphisme p.Gln787Gln interférant avec

l'hybridation des amorces. Ceci constitue un problème majeur puisque ce polymorphisme est présent chez 52% de la population. Nous reviendrons sur l'intérêt de ce polymorphisme plus tard.

En conclusion, la technologie Idylla permet certes une caractérisation rapide d'un nombre défini de variants de l'EGFR. Cependant, cette méthode semble manquer de sensibilité dans le contexte des CBNPC et des améliorations du panel d'amorces utilisé semblent nécessaires avant son utilisation générale en diagnostic.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons également conduit une seconde étude dans le but d'une amélioration de la sensibilité de détection des variants de l'EGFR. Celle-ci impliquait alors l'utilisation d'acides nucléiques peptidiques (PNA) pour la détection de la mutation de résistance p.Thr790Met sans interférence du polymorphisme p.Gln787Gln.

Article 2: A pre-amplification step enhances detection sensitivity of EGFR T790M mutation by PNA-clamping PCR and pyrosequencing.

Billaud Amandine, Ramirez Camille, Verrielle Véronique, Dauvé Jonathan, Chevalier Louise-Marie, Morel Alain

Manuscrit en cours de préparation

Abstract

Background: Targeted therapies and more precisely EGFR tyrosin kinase inhibitors (TKI) have been a major progress in the therapeutic management of EGFR mutated non-small cell lung cancers (NSCLC). The detection of the EGFR T790M mutation is a requirement to the administration of third generation TKI Osimertinib.

Objective: To administrate the TKI earlier in the tumoral progression and consequently improve the outcomes, studies have focused on the amelioration of detection methods. Hence, ctDNA offers a great opportunity but detection sensitivity has to be improved.

Methods: Here, we developed a peptid nucleic acid (PNA) PCR followed by pyrosequencing, in favour of an enrichment of the mutated fraction. A pre-amplification step was added first to enhance DNA quality and therefore T790M mutation detection. Throughout the application of our method on DNA extracted from FFPE samples from 46 patients with NSCLC who had relapsed following first generation EGFR TKI administration, we evaluated sensitivity and specificity of our method and compared the results to those obtain with the method of reference, NGS.

Results: Following the analysis, a sensibility of 93.3% and a specificity of 100% were evaluated with an analytical sensitivity of 0.5%. All patients who had the T790M mutation detected with NGS were also positive with our protocol. The only discordant case was a sample with no mutation detected on NGS but which was found positive with PNA.

Conclusion: Pre-amplification followed by PNA clamping PCR and pyrosequencing allows the detection of T790M mutation with a sensitivity of 0.5% which will permit an earlier detection and an improvement of therapeutic management.

Keywords: pre-amplification, peptid nucleic acid, T790M EGFR, non-small cell lung cancer, detection sensitivity

Introduction

Leading cause of cancer-related death worldwide (18.6%)², lung cancers are divided into two classes: small cell lung cancers (SCLC) and Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC), NSCLC being the most common (about 85%)⁶⁶. Direct exposure to airway carcinogens and important renewal of the pulmonary epithelium are making NSCLC the second most heterogeneous cancers with a major diversity of oncogenic drivers³⁷. Despite KRAS mutations predominance (32%), EGFR mutations represent 12% of those cases^{79,314} affecting mainly the tyrosine kinase domain¹¹² in favour of a constitutively active receptor^{102,114}. Most of these mutations are the L858R substitution (40%) or a deletion of the exon 19 (45%)¹¹². The first generation of EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs), Gefitinib and Erlotinib, improving the 12-months rates of progression-free survival of these EGFR mutated NSCLC from 6.7% with chemotherapy to 24.9% with Gefitinib and from 10% to 40% with Erlotinib^{86,88,124}. However, after 9 to 12 months of continuous treatment, an acquired resistance appears mainly due to the apparition of a second mutation of resistance on the EGFR gene or a change of oncogenic addiction^{142,143}. The diversity of these mechanisms of resistance are linked to the major tumour heterogeneity of lung cancers⁹. However, more than 50% are due to the EGFR T790M substitution which increases the receptor affinity for ATP, inhibiting competitively the TKIs¹⁴¹. Targeting specifically and covalently this mutation, a third generation TKI appeared in 2014³¹⁵. Osimertinib, compared to platinum therapy plus pemetrexed in patients with T790M mutation, improved progression-free survival from 4.4 months to 10.1 months³¹⁶. Its administration depends on the presence of that mutation whose detection is becoming crucial.

A second biopsy is not always possible following a relapse with EGFR first generation TKIs. This technique is also invasive and represents just a picture of the disease, without notions of tumour heterogeneity and evolution in space and time^{9,36}. Moreover, a constant follow-up is a necessity to detect disease progression earlier and adapt treatment. Consequently, circulating tumor DNA (ctDNA) and liquid biopsies are interesting, allowing visions of tumour heterogeneity, progression and eventually residual disease³¹⁷⁻³¹⁹. Concordance between ctDNA and tumor genotype have already been demonstrated promoting ctDNA as an effective biomarker^{320,321}. The quantity of ctDNA detected in blood is function of tumour stages, localizations, drivers...but is also associated with patients prognostics³²². An active ctDNA release by the tumour is also a possibility³²³. For a 100g tumour (3.10⁶ cells), at least 3.3% of blood circulating DNA is ctDNA (180ng/ μ L)³²⁴. However, ctDNA can also be detected in non-blood body fluid like urine and pleural liquid³²⁵. Increasing the sensitivity of the mutation detection is a major challenge to face that small ctDNA concentrations and dilution in WT DNA. Several methods were used in the last years including droplet digital PCR, PNA-LNA PCR clamping and next generation sequencing (NGS)^{326,327}.

Peptide Nucleic Acid (PNA) is an artificial DNA whose sugar phosphate backbone is replaced by a pseudopeptide (N-(2-aminoethyl)glycine units) allowing it to bind DNA with higher affinity³²⁸. PNA hybridizes the WT sequence blocking the action of the polymerase and amplification. Mutated DNA is then amplified causing an enrichment of mutated fraction increasing detection sensitivity.³²⁹ Here, we started with a pre-amplification improving ctDNA quality before the PNA-mediated PCR clamping and pyrosequencing. Because of samples scarcity, we proved the efficiency and high sensitivity of our protocol analysing DNA from somatic tissue instead of ctDNA.

Materials and methods

Patients and DNA extraction

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples from 46 patients diagnosed with a NSCLC between 2015 and 2018 were obtained from the Institut de Cancérologie de l'Ouest (ICO) Paul Papin, France. For all of them, EGFR T790M mutation was assessed by Next Generation Sequencing (S5), 19 were positive. Patients included were 23 men and 23 women from ages 50.8 to 87.8. Genomic DNA was extracted with the Maxwell¹⁶ IVD (Promega) before to be conserved at -20°C.

Range of EGFR T790M mutation percentages

To assess the specificity and sensitivity of our technique, a highly EGFR T790M mutated sample (50%) was used as a reference standard (Horizon Discovery) and different dilutions were made to establish three ranges. WT DNA was extracted from lymphocytes of three healthy donors also with Maxwell kit. Dilutions were made to obtain the following percentages of T790M mutation: 50, 10, 5, 1, 0.5 and 0.1%. The protocol used on patients DNA was also used on these three ranges and they were pyrosequenced with or without PNA. Moreover, to assess the detection limit of our technique, WT EGFR DNA from the three healthy donors were also analyzed six times each.

EGFR T790M PNA-mediated PCR clamping

EGFR T790M mutation PNA sequence (**Table 1**) was resuspended in DNase RNase free water (Gibco) at 100mM and conserved at -20°C. This concentration was diluted at 10mM before utilization. A first step of 12 cycles pre-amplification of the DNA was done to improve its quality. 5ng of genomic DNA, measured by Nanodrop, were enough to mix with the Ampli Taq Gold DNA polymerase (5U/μL), dNTP (10mM), primers (4μM) and an MgCl₂ concentration of 1.5μM (**Table 1**). Then, a second amplification was done using the same primers and mix. To that, were added 10μl of the pre-amplification products and 0.2μM of the PNA targeting the WT DNA located around the tyrosin in position 790 of EGFR. In parallel, the same reactions were done with DNase RNase free water instead of PNA as control. PCR cycling conditions included a 10 minutes hold at 94°C followed by 35 cycles of three temperatures steps (30s at 94°C, 30s at 57°C and 1min at 72°C) and a 5min final extension at 72°C. Correct amplifications were checked with the Qiaxcel (Qiagen) before to proceed to pyrosequencing.

Names	Sequences
PCR Forward primer	5'-GCA TCT GCC TCA CCT CCA A-3'
PCR Reverse primer	5'-biotin-CGA TCT GCA CAC ACC AGT TG-3'
PNA sequence	NH ₂ -CTCATCACGCAGCTCA-COOH (³²⁹)
Sequencing primer (pyrosequencing)	CCG TGC AGC TCA TCA
Dispensation order (pyrosequencing)	ACTAGCAGC

Table 1: Primers and sequences used during this experiment.

Pyrosequencing

EGFR T790M mutation was identified by pyrosequencing PSQ-96MA (Qiagen). Briefly, 40μL of the second PCR amplification with or without PNA were bound to streptavidin beads. Then, the beads were washed before to be added to the sequencing primer (0.2μM) (**Table 1**). The mixes were heated at 80°C for 2 minutes. dNTP were added following the dispensation order (**Table 1**) and the pyrophosphates (PPi) resulting from the incorporation of dNTP were measured. Pyrogram outputs were analyzed on the software Pyromark Q24 (Qiagen) to determine the percentage of EGFR mutant T790M mutation vs WT.

Statistics

A linear regression of the ratio of mutations obtain following pyrosequencing of the EGFR T790M mutation ranges without PNA was done to evaluate the precision of the dilutions before to compare to the results obtained with PNA. The detection limit was calculated with the following formula: Detection limit = mean + 3*Sd. K analysis was used to compare our results to those obtained with the technique of reference, NGS. Statistical analyses were performed with GraphPad Prim Software.

Results

Detection limit of the PNA-mediated PCR clamping followed by pyrosequencing

First, we assessed the sensitivity and the detection limits of our PNA-mediated PCR clamping method, using several percentages of EGFR T790M mutation from 50 to 0.1%. Three ranges were realized by dilution of EGFR T790M Reference Standard in WT DNA from lymphocytes of healthy donors to avoid cancer cells aneuploidy which would perturb the precision of our dilutions. The linearity of our ranges was first verified without PNA. A first step of 12-cycles pre-amplification was followed by a PCR and pyrosequencing analysis. A R^2 of 0.9965 was obtained. (**Fig. 1A**) The addition of PNA in the PCR mix was done in parallel and the EGFR T790M mutation of our ranges was searched with the same protocol. With PNA, the percent of T790M mutation detected tend to saturate when there is more than 50% of EGFR T790M (detection of 90% of T790M mutation). The comparisons of the concentration ranges with or without PNA validate the T790M mutation enrichment with PNA. (**Fig. 1B**) To determine the detection limit of our method, WT DNA of the three healthy donors was also tested several times with or without PNA. (**Fig. 1C and 1D**) Consequently to pre-amplification, a background noise is present when PNAs are added so a limit of detection of 13.11% was calculated (Limit=mean+3*Standard deviation). This reference allowed us to determine the analytical sensitivity of PNA clamping sequencing. Contrary to classical pyrosequencing whose detection limit is 5% of mutation, the addition of PNA in the PCR mix enables to detect smaller percentages until 0.5%.

Detection of the EGFR T790M mutation in patients somatic DNA

Because of ctDNA samples scarcity and poor content in DNA, we decided to apply our technology to patients DNA from solid tumour. Somatic DNAs from 46 patients with NSCLC tested by NGS analysis for the presence of EGFR T790M mutation were collected. That mutation was detected in 19 of them with NGS. Pre-amplification and pyrosequencing were done with or without PNA for all of them. (**Fig. 2A**) An enrichment of T790M mutation percentage was also noticed for all mutated DNA, rising from 2 to 26% mutation detected with NGS to more than 28% with PNA. All the results were compared to those obtained with NGS. (**Fig. 2B**) Only one patient who was determined WT for the T790M mutation by NGS was found positive by our PNA-mediated PCR clamping method. The comparative analysis of all that results determined a sensitivity of 96.3% and a specificity of 100% of our method with a κ value of 95.6% (**Fig. 2C**). The positive predictive value (PPV) is 100% and the negative predictive (NPV) value is 95%.

Patient with discordant results

Somatic DNA from the discordant patient presented a tumour cellularity of 80% and a concentration of 44.2ng/ μ L. No mutation was detected without PNA but its addition allowed the appearance of an 18% peak at the T790M mutation localization, so above the limit of detection calculated earlier. (**Fig. 3A**) This patient was a 51 years old woman who had had a breast cancer in 2015 treated by surgery and hormonotherapy and was diagnosed with an advanced pulmonary adenocarcinoma in 2017. NGS sequencing was done and a BRAF mutation was detected with a frequency of 40.4%. (**Fig. 3B**) Following our analysis with PNA and pyrosequencing, we looked if EGFR T790M mutation was detected with the NGS. Indeed, two reads were detected giving a frequency of 0.06% so under the threshold of the NGS.

Discussion

EGFR T790M mutation represents around 50% of first generation TKIs mechanism of acquired resistance. Today, a third generation inhibitor, called Osimertinib, targets specifically and covalently that alteration. Consequently, its earlier detection is becoming crucial. We here propose an improvement of the PNA-mediated PCR clamping method followed by pyrosequencing. Thanks to a first step of pre-amplification, we were able to prove an analytical sensitivity of 0.5% with a detection limit of 13.11% due to background noise (Fig. 1C and 1D). PNA clamping amplification allows enrichment in mutation percentages and tends to saturate when superior to 50% (Fig. 1B). Hence our technique is qualitative and not quantitative.

We studied solid tumour DNAs samples from 46 patients who relapsed after first generation TKIs treatment. 19 of them were positive for EGFR T790M mutation when they were analyzed with NGS. All of them were also found positive with PNA (Fig. 2B). Only one sample was found positive for the T790M mutation with PNA but not with NGS. These results gave a κ -value of 0.956 with a sensitivity of 96.3% and a specificity of 100% so the strength of agreement is very good.³³⁰ This method is a real improvement of the analytical sensitivity (0.5%) to the detriment of the statistical sensitivity. But that is only true if we consider NGS as the method of reference and we know that this technique has a sensitivity of 2%. Moreover, the only discordant sample was detected positive but low for the EGFR T790M mutation with PNA (28%). (Fig. 3A) This is not necessary a false positive because two reads of that mutation were also found with NGS giving a frequency of 0.06% so above the threshold. (Fig. 3B)

Such sensitivity would be useful for the analysis on ctDNA which is low concentrated, fragmented and drowning in constitutive DNA and the pre-amplification step allows an improvement of DNA quality. Moreover, using pyrosequencing instead of NGS is faster and less expensive. The PNA-mediated PCR clamping would be applicable to the research of other somatic point mutation in ctDNA. Concerning EGFR, we already know that Osimertinib also induce acquired resistance with notably the appearance of the C797S mutation which could be studied with the method we presented.¹⁷⁰ Finally, Osimertinib treatment will soon be accessible in first line treatment instead of first-line TKIs because a longer progression-free survival was proven.⁹¹ This progress will lead to the same problematic discussed earlier and our PNA-mediated PCR clamping could help to detect an acquired resistance earlier with the analysis of other mutations (as C797S), to follow the impact of treatment with the diminution of T790M mutation and eventually to detect residual disease. All of these possibilities for the same aim: personalized medicine.

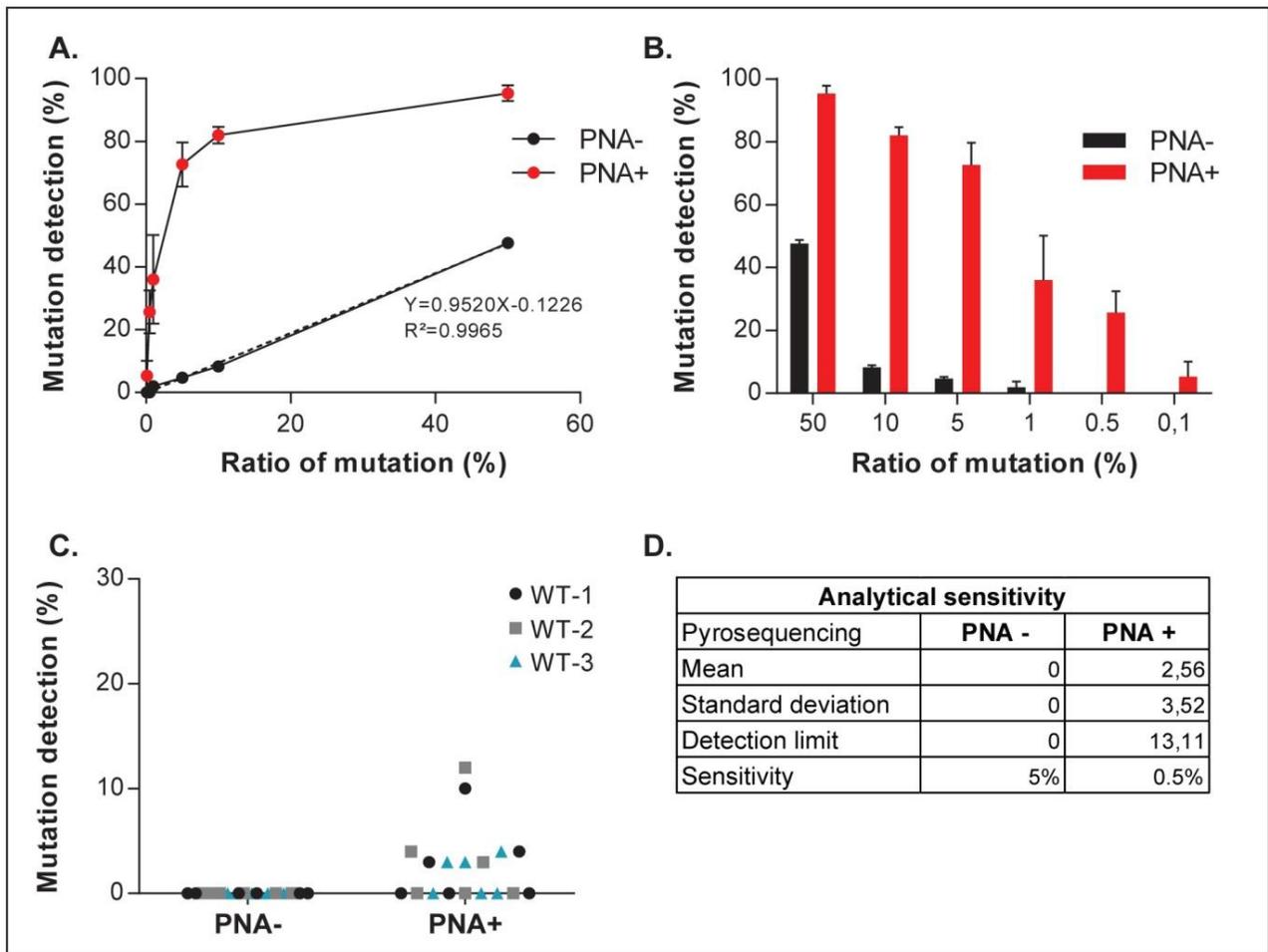


Figure 1: Pre-amplification followed by PNA-mediated PCR clamping allowed a sensitivity of 0.5% EGFR T790M mutation detected. **A-B.** Pyrosequencing results of the three ranges of different EGFR T790M mutation percentages with or without PNA, after a pre-amplification. **C-D.** DNA analysis from three healthy donors (6 times each) evaluates the analytical sensitivity and detection limit.

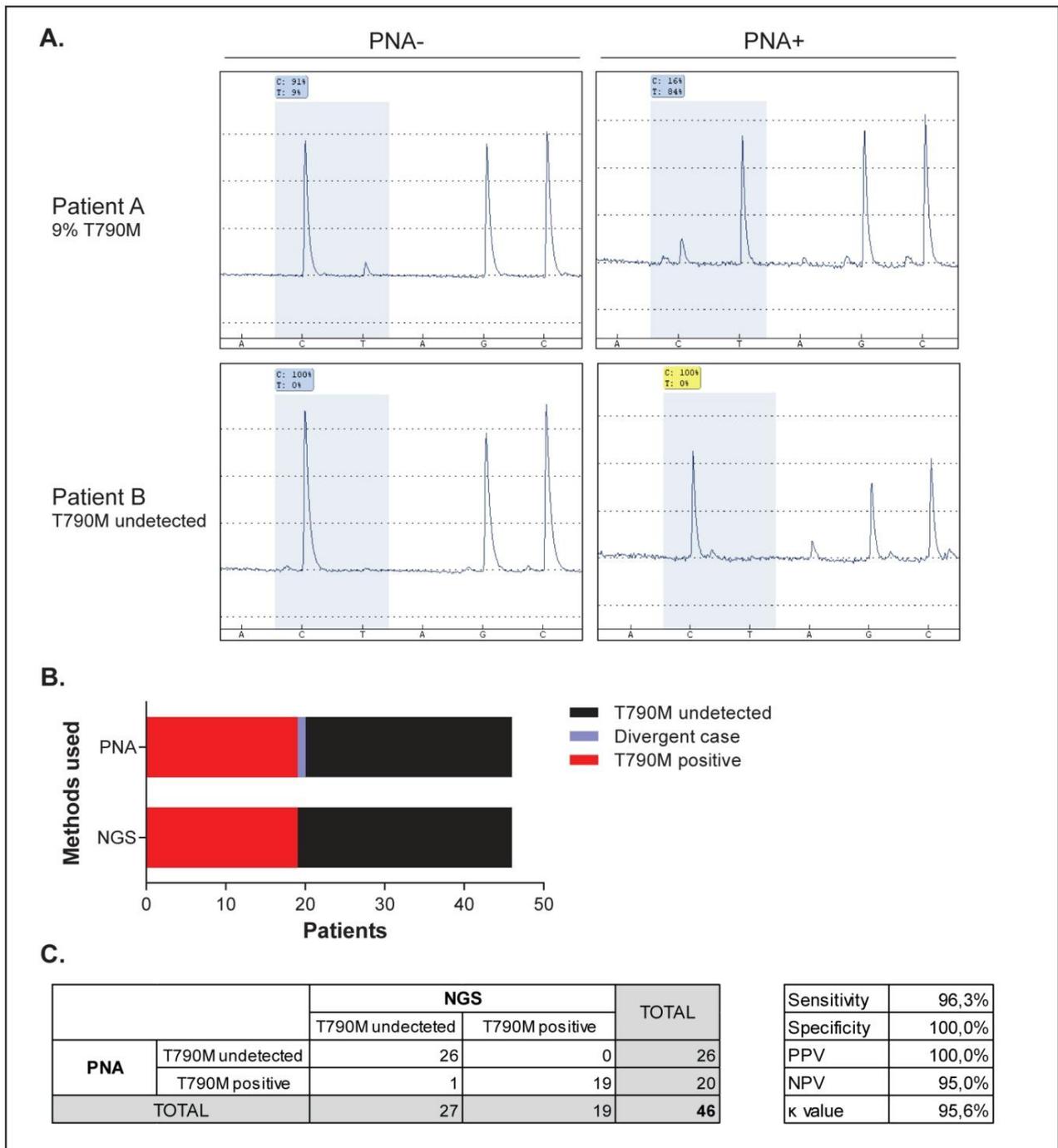


Figure 2: Comparison of EGFR T790M mutation detected with NGS and our PNA method in patients DNA. A. Pyrograms of two patients, one had a EGFR T790M mutation, with or without PNA. **B.** Representation of the results obtained after pyrosequencing analysis with PNA compared to those obtained with NGS for the 46 patients. **C.** Analysis of the results to assess the sensitivity and specificity of our method compared to the method of reference, NGS.

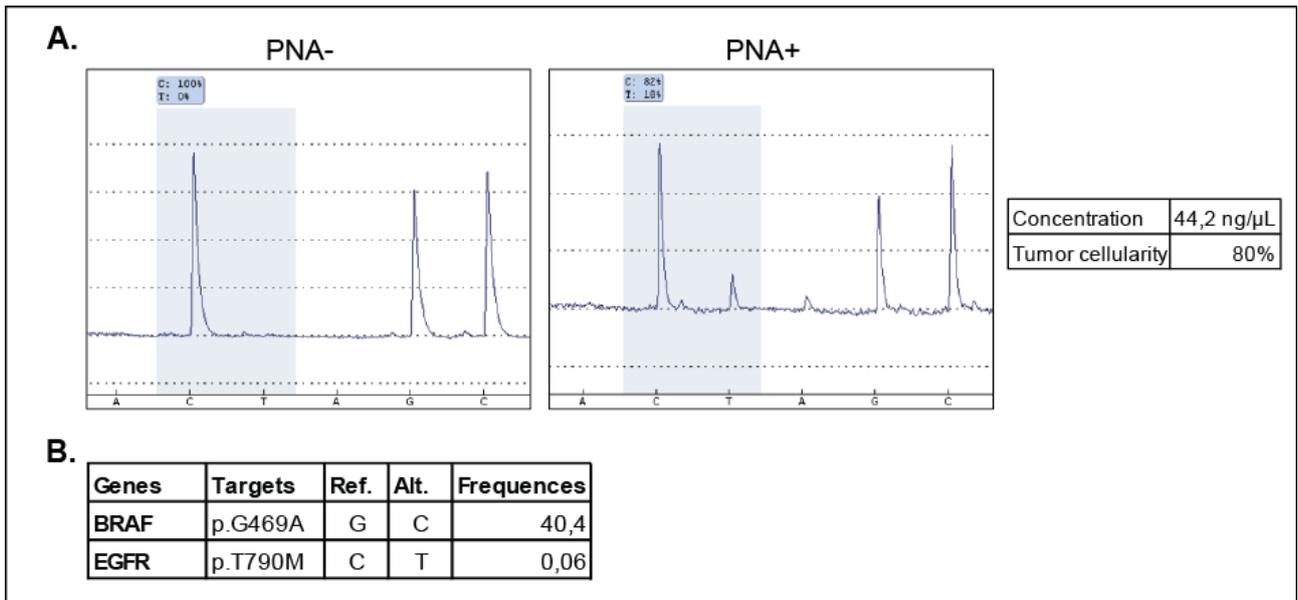


Figure 3: Results of the discordant case which was found EGFR T790M mutated with the PNA method. A. Pyrograms obtained with and without PNA (n=2). **B.** Results obtained for that same patient with NGS.

1.1.3. Résultats de l'article 2

La détection des drivers oncogéniques et l'étude de la progression tumorale sous pression thérapeutique peuvent être conduites sur l'ADN circulant tumoral (ADNct) permettant un suivi continu, moins invasif et donnant un aperçu de l'hétérogénéité tumorale. La résistance acquise aux ITK de première génération ciblant l'EGFR dans les CBNPC est, dans la moitié des cas, due à l'apparition de la mutation p.Thr790Met de ce même gène. Cette mutation de résistance fut dans un premier temps un pré-requis à l'administration de l'Osimertinib, ITK-EGFR de troisième génération. La recherche de ce biomarqueur dans l'ADNct pour une détection plus précoce nécessite la mise en place de méthodologies plus sensibles malgré la mauvaise qualité des prélèvements. La réalisation d'une pré-amplification améliore la qualité et la quantité de cet ADN dégradé. Lorsqu'elle est suivie d'une amplification par PCR en présence de PNA bloquant la fraction non mutée suivie d'un pyroséquençage, une sensibilité analytique de 0.5% a alors été démontrée (Figure 1). La présence d'un bruit de fond suite à cette pré-amplification a conduit à la mise en place d'un seuil de détection de 13.11%.

Cette méthodologie a ensuite été appliquée à la recherche de ce biomarqueur dans 46 prélèvements d'origine FFPE provenant de patients atteints de CBNPC et ayant rechutés sous TKI de première génération. Dans cette cohorte, tous les patients positifs pour la mutation de résistance par analyse NGS ont également été positifs lors de l'étude en présence de PNA. (Figure 2) Seule une patiente chez laquelle le variant de résistance n'avait pas été caractérisé à l'aide du NGS a été retrouvé mutée à l'aide de notre méthodologie. (Figure 3) L'analyse approfondie de ses résultats a permis de constater la présence de 2 séquences mutées soit une fréquence de 0.06% au NGS, bien en dessous de sa limite de détection.

1.1.4. Discussion de l'article 2

La méthodologie présentée ici démontre une amélioration de la sensibilité de détection du variant de résistance p.Thr790Met par rapport à la méthode de référence, le NGS. La caractérisation de ce biomarqueur était initialement nécessaire à l'administration de l'ITK de troisième génération, l'Osimertinib. Ce dernier est cependant aujourd'hui accessible en première ligne rendant la recherche de ce variant dispensable puisque qu'une analyse NGS va alors être réalisée, recherchant les différents variants de l'EGFR ainsi que les hotspots mutationnelles d'autres gènes (cf Discussion de l'article précédent). Cette étude présente un intérêt pour les patients sous ITK de première génération chez lesquels le suivi continu d'une éventuelle progression peut être envisagé. Elle permet également une recherche de la maladie résiduelle chez les patients sous Osimertinib. Enfin, notre méthodologie peut plus largement être appliquée à l'étude d'autres variants tel que p.Cys797Ser de l'EGFR, mutation de résistance à l'Osimertinib^{170,172}.

L'augmentation de la sensibilité de détection des variants pourrait de même permettre d'identifier de très faibles fréquences clonales et de suivre l'apparition de la résistance acquise et l'émergence de ces clones. Ceci rejoint différentes études, mentionnées en introduction, ayant observé la présence de la mutation

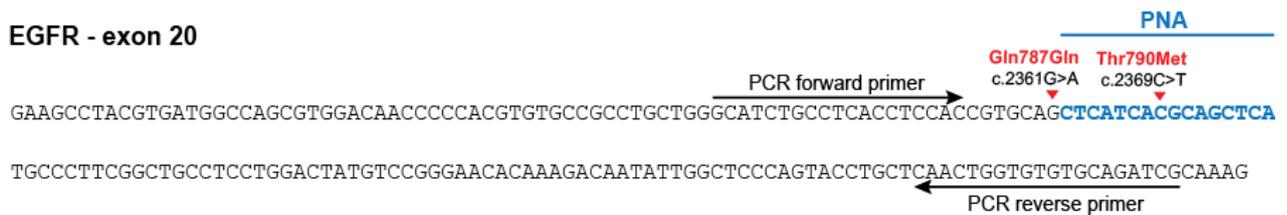
p.Thr790Met avant exposition aux ITK-EGFR traduisant plutôt une sélection clonale que l'apparition de nouvelles mutations de résistance^{130,137}.

Suite aux problèmes de détection de la mutation p.Thr790Met rencontrés en présence du polymorphisme p.Gln787Gln lors de l'étude comparant la technologie Idylla et le NGS, nous avons vérifié que la présence de ce polymorphisme n'impactait pas la fixation du PNA sur la fraction sauvage. La séquence ciblée par le PNA est ainsi en aval du polymorphisme (Figure complémentaire 1A) et n'influence pas l'association de l'acide nucléique peptidique puis l'amplification par PCR. Par ailleurs, nous avons constaté une fréquence d'apparition de ce polymorphisme (c.2361G>A) de 88.57% en comptabilisant les hétérozygotes (40%) et les homozygotes (48.57%) (Figure complémentaire 1B). Cette fréquence est largement supérieure à son incidence dans la population Européenne (59.18%) bien qu'elle varie quelque peu puisqu'il n'apparaît que dans 16.4% de la population Asiatique (Données Exac). Cette différence importante avec notre cohorte de patients présentant des CBNPC mutés EGFR et ayant rechuté sous ITK-EGFR interroge sur une potentielle valeur prédictive du polymorphisme p.Gln787Gln.

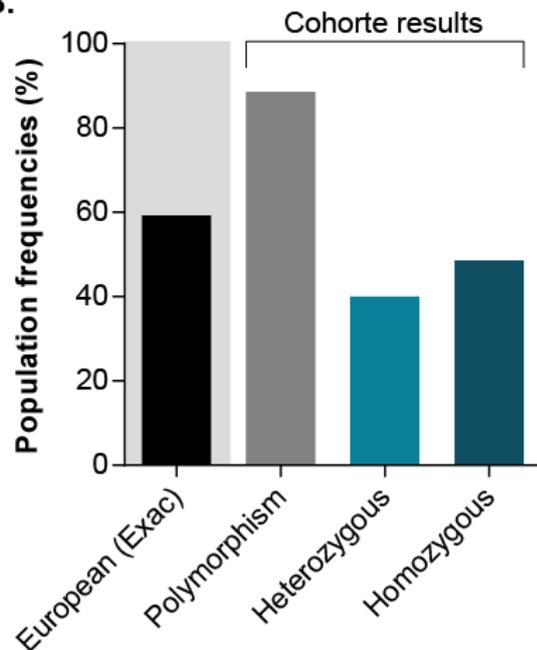
Plusieurs hypothèses sont alors soulevées quant à son origine : une particularité de la population locale, des cancers bronchiques, un lien avec des mutations de l'EGFR ou encore à la rechute sous ITK ? Les données bibliographiques actuelles ont démontré un lien entre la présence de ce polymorphisme et les cancers bronchiques³³¹ et plus particulièrement avec un sous-type, le carcinome cellulaire squameux.³³² Une augmentation de la fréquence de p.Gln787Gln a également été observée dans les cancers colorectaux métastatiques³³³, il est aussi plus fréquemment retrouvé chez l'homme que chez la femme³³². Cependant, aucune association n'a pu être démontrée avec des mutations de l'EGFR ou de KRAS^{331,333}. D'autre part, la présence de ce polymorphisme a également été associée à un moins bon pronostic sous chimiothérapies³³², ITK-EGFR³³⁴ ou encore anticorps monoclonaux ciblant l'EGFR³³³. Cependant, une autre étude n'a pas pu faire de lien entre ce polymorphisme et une valeur prédictive ou pronostique³³⁵. La recherche du polymorphisme n'avait alors été faite que chez les patients présentant des mutations de l'EGFR et l'étude de la survie globale mélangeait patients traités par chimiothérapies et ITK-EGFR. La fréquence de p.Gln787Gln dans leur cohorte Italienne (71%) demeurait cependant supérieure à celle attendue. Une autre étude conduite sur six organoïdes provenant de tumeurs de la tête et du cou a démontré les conséquences de la présence du polymorphisme sur le niveau d'expression d'EGFR-AS1, un long ARN non codant³³⁶. En effet, les patients homozygotes pour ce polymorphisme présentaient une altération de la stabilité d'EGFR-AS1 donc une diminution de son expression. En conséquence, l'isoforme D de l'EGFR, ne présentant pas de domaine tyrosine kinase, devenait prédominant entraînant l'activation de la voie non canonique avec une activation plutôt ligand dépendante. EGFR-AS1 modulant l'addiction oncogénique, son lien avec le polymorphisme en question prend un intérêt particulier. La présence de p.Gln787Gln était cependant préférentiellement associée à une sensibilité aux ITK-EGFR de première génération.

A.

EGFR - exon 20



B.



Q787Q polymorphism frequencies

Figure 15 - Résultats complémentaires 1 : Etude du polymorphisme Q787Q dans la cohorte de patients présentant des CBNPC ayant rechutés sous ITK-EGFR de première génération.

A. Représentation schématique de la localisation de ce polymorphisme Q787Q ainsi que du PNA utilisé. **B.** Comparaison des fréquences du polymorphisme Q787Q dans la population européenne (données Exac) et dans la cohorte de patients, les fréquences des patients homozygotes et hétérozygotes ont également été ajoutées.

Ces différents arguments soulèvent plusieurs hypothèses. Tout d'abord, il faut rappeler que la présence d'une altération silencieuse, tel que le polymorphisme p.Gln787Gln, n'est pas toujours sans conséquence puisqu'interviennent des potentielles altérations des ARN non codants, des phénomènes d'épissages alternatifs ou des conséquences sur la stabilité des ARNm. La préférence de codons doit également être mentionnée. En effet, certains codons, pourtant associés aux mêmes acides aminés, sont plus ou moins fréquemment présents dans le génome et différemment exprimés ce qui se répercute sur la quantité d'ARNt disponible et peut altérer la traduction protéique. C'est ici le cas pour le polymorphisme puisque l'on passe de CAG, présent à 73%, à CAA présent à 27%. D'autre part, le mauvais pronostic associé à ce polymorphisme en présence d'ITK-EGFR ou d'anticorps monoclonaux ciblant cette même protéine traduirait plutôt un lien avec le niveau d'expression de la protéine. En conclusion, l'hypothèse serait donc la suivante : la présence du polymorphisme p.Gln787Gln diminue l'expression d'EGFR-AS1 ce qui se traduit par une augmentation de l'isoforme D de l'EGFR par rapport à l'isoforme A de l'EGFR total. En

conséquence, lors de l'administration de l'ITK, la proportion de domaine tyrosine kinase ciblable serait diminuée, le nombre de molécules actives disponibles devenant proportionnellement supérieur, favoriserait initialement une sensibilité au traitement. Cependant, à long terme, la modulation de l'addiction oncogénique et l'activation de la voie non-canonique de l'EGFR induite par p.Gln787Gln faciliterait l'acquisition d'une résistance au traitement expliquant le mauvais pronostic associé. Cette théorie demeurant hypothétique, des études complémentaires de ce polymorphisme seraient intéressantes, sa valeur prédictive étant probable.

Traitant des enjeux actuels des thérapies ciblées et dans ce cas des ITK-EGFR, nous avons dans un premier temps présenté les travaux réalisés sur une amélioration de la détection des biomarqueurs. L'autre versant de cette première partie était l'étude du phénomène de résistance acquise aux ITK-EGFR faisant l'objet d'un troisième article en cours de rédaction.

Article 3 : TBK1, voie de résistance aux ITK-EGFR : vers une nouvelle combinaison thérapeutique dans les CBNPC

Billaud Amandine, Dauvé Jonathan, Morel Alain

Manuscrit en cours de rédaction

Abstract

Parmi les différentes localisations tumorales, les plus meurtriers demeurent les cancers bronchiques dont 85% sont des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC). Malgré la prédominance des mutations de KRAS (25%), les mutations de l'EGFR représentent 17% de leur spectre mutationnel. Principalement localisées au niveau du domaine tyrosine kinase, elles entraînent son activation constitutive. Les premières thérapies ciblant ce domaine, le Gefitinib et l'Erlotinib, ont favorisé un bénéfice significatif pour le patient. Cependant, généralement après 9 à 12 mois de traitement continu, apparaît une résistance acquise, causée par une seconde mutation du récepteur dans la moitié des cas, ou un changement d'addiction oncogénique. La diversité de ces mécanismes de résistance et l'importante hétérogénéité tumorale des cancers bronchiques expliquent que 15% de ces résistances acquises soient toujours d'origine inconnue.

Afin de reproduire cette résistance acquise et d'étudier les mécanismes impliqués, une mutagenèse aléatoire à l'aide d'ENU a été réalisée dans des cellules pulmonaires mutées EGFR. L'exposition au Gefitinib pendant plusieurs semaines a par la suite sélectionné des cellules résistantes, les PC9-GR1. L'absence de mutations secondaires de l'EGFR et l'inhibition de sa phosphorylation en présence de Gefitinib malgré le maintien de la prolifération a permis de conclure sur un changement d'addiction oncogénique dans les cellules PC9-GR1. Afin de mettre en évidence la voie de signalisation activée, une étude transcriptomique par séquence d'ARN (RNAseq) a été réalisée révélant une signature TBK1 dans les PC9-GR traitées. IKB non conventionnel, TBK1 n'avait encore pas été lié à une résistance acquise aux ITK-EGFR. Nous avons ainsi pu démontrer l'intérêt d'une co-inhibition EGFR/TBK1 à la fois dans nos cellules sensibles et résistantes mettant en lumière une possible nouvelle combinaison thérapeutique dans les CBNPC mutés EGFR.

Mots clés : résistance acquise, EGFR, ITK-EGFR, TBK1, ENU, CBNPC, combinaison thérapeutique, UACA, MIER3

Introduction

Bien qu'ils ne soient pas les plus répandus avec deux millions de nouveaux cas/an, les cancers bronchiques demeurent aujourd'hui les plus meurtriers, provoquant 18.4% des décès liés au cancer². Ils peuvent être subdivisés en deux catégories : les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC) et les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC). Ces derniers en constituent la grande majorité (85%) et présentent un taux de survie à 5 ans légèrement supérieur à 15%⁷⁶ de par leur diagnostic plutôt tardif. En raison de l'hétérogénéité tumorale considérable des CBNPC et des cancers bronchiques de manière générale³⁷, de nombreux drivers oncogéniques sont caractérisés. Les altérations de KRAS restent les plus fréquentes (25%) et sont toujours orphelines de thérapies ciblées. Les mutations du récepteur au facteur de croissance épithélial (EGFR) sont, elles, caractérisées chez 17% des patients^{78,79}. Ces mutations sont principalement localisées au niveau du domaine tyrosine kinase de la protéine, favorisant son activation constitutive par augmentation de son affinité pour l'ATP, et ainsi la survie et la prolifération des cellules tumorales¹¹⁰. Ces mutations activatrices regroupent principalement l'altération p.Leu858Arg de l'exon 21 (40%) ou la délétion de l'exon 19 (45%)¹¹².

Lorsque ces mutations de l'EGFR sont caractérisées, des inhibiteurs ciblant le domaine tyrosine kinase de la protéine (ITK-EGFR) ont été mis au point. Les ITK-EGFR de première génération, Gefitinib et Erlotinib, ont favorisé un bénéfice clinique important chez 70% des patients présentant des mutations activatrices du récepteur^{86,88}. Cependant, après plusieurs mois d'administration continue, une résistance acquise apparaît dans la grande majorité des cas. De nombreuses études ont caractérisé ces mécanismes hétérogènes qui peuvent être divisés en trois catégories : mutations secondaires de l'EGFR, changements phénotypiques ou changements d'addiction oncogénique¹⁴⁰. Dans 50% des cas, cette résistance est d'ailleurs causée par la mutation de résistance p.Thr790Met de l'EGFR face à laquelle l'Osimertinib, ITK-EGFR de troisième génération est aujourd'hui une solution thérapeutique⁹⁰. Cependant, 15 à 20% de ces résistances acquises demeurent d'origines non identifiées. Ce sont ces dernières qui vont faire l'objet de notre étude dont le but est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Afin de stimuler la génération de cellules présentant une résistance acquise au traitement, le N-éthyl-N-nitrosurée (ENU) a été utilisé. Cet agent alkylant induit une mutagénèse aléatoire ponctuelle avec un taux de mutations spontanées 100 fois supérieur à la normale ($1/10^3$ pb)³³⁷. Utilisé dans la caractérisation de mécanismes de résistance dans différentes études^{337,338}, il a d'ailleurs permis la caractérisation de 3 nouvelles mutations de résistance de l'EGFR à l'Osimertinib retrouvées en clinique¹⁷¹. La lignée issue d'un adénocarcinome pulmonaire et présentant une délétion de l'exon 19 de l'EGFR, PC9, a donc été exposée à l'agent mutagène avant réalisation d'une sélection des cellules résistantes à l'aide de Gefitinib. La caractérisation de la résistance acquise des cellules PC9-GR a démontré la présence d'une signature TBK1, IKB non conventionnelle participant à la voie de signalisation dépendant de NFkB, associée à une surexpression de l'EGFR. Aucune mutation de résistance sur l'EGFR n'a cependant été détectée. Cette étude a permis la caractérisation d'une potentielle nouvelle combinaison thérapeutique dans les CBNPC mutés au niveau de l'EGFR par inhibition conjointe de TBK1 et de l'EGFR. Dans notre étude, cette association contourne non seulement la résistance acquise aux ITK-EGFR mais potentialise également l'effet des ITK-EGFR dans la lignée parentale illustrant l'étendue de son potentiel.

Résultats

La lignée d'adénocarcinome pulmonaire PC9 est sensible aux ITK-EGFR.

La recherche de nouveaux mécanismes pouvant expliquer les résistances acquises aux ITK-EGFR nécessite dans un premier temps la détermination du modèle cellulaire le plus adapté. Pour cela, nous disposons de trois lignées provenant d'adénocarcinomes pulmonaires dont nous avons évalué la sensibilité à deux ITK-EGFR : un inhibiteur réversible, le Gefitinib, et un irréversible, l'Osimertinib. Tous deux ciblent le domaine tyrosine kinase de la protéine et sont actuellement utilisés en clinique^{87,90}. La lignée A549 n'est pas mutée EGFR ; servant de contrôle, elle est résistante aux deux inhibiteurs. (Figure 1A) Les lignées PC9 et H1975 ont toutes deux une forte diminution de leur viabilité cellulaire en présence d'Osimeertinib tandis que seule la lignée PC9 est affectée par l'administration du Gefitinib. En effet, toutes deux présentent des mutations de sensibilité de l'EGFR, p.Leu858Arg pour H1975 et délétion de l'exon 19 pour PC9. Cependant, la lignée H1975 comprend également la mutation de résistance p.Thr790Met. Toutes ces altérations sont localisées au niveau du domaine tyrosine kinase du récepteur. (Figure 1B) La sensibilité de la lignée PC9 au Gefitinib est confirmée par réalisation d'un test de clonogénicité. (Figure 1C) Cette sensibilité aux ITK-EGFR peut être visualisée par l'étude de l'activation du récepteur en western blot. (Figure 1D) Un maintien de la phosphorylation malgré la présence du Gefitinib est visible dans la lignée H1975, expliqué par la présence de la mutation de résistance, tandis que cette phosphorylation est inhibée dans la lignée PC9. L'ensemble de ces résultats démontrent la sensibilité aux ITK-EGFR de la lignée PC9, qui nous servira de modèle dans la suite de nos expérimentations.

Génération de cellules présentant une résistance acquise aux ITK-EGFR, les PC9-GR.

Afin de générer les cellules résistantes, la lignée PC9 a dans un premier temps été exposée pendant 24h à 50µg/mL d'ENU, un agent alkylant permettant l'insertion de mutations ponctuelles de façon aléatoire. (Figure 2A) Cette concentration correspondant à la CI50 a été déterminée après recherches bibliographiques^{171,337,338} et confirmation par test de viabilité des cellules. (Figure 2B) A l'issue de la mutagénèse, les cellules ont été transférées en plaque 96 puits à raison de 1000 cellules par puits, puis une sélection clonale par doses croissantes de Gefitinib a été réalisée permettant la génération de 9 clones PC9-GR. (Figure 2A) Ces clones ont une résistance acquise aux ITK-EGFR de première mais aussi de deuxième génération. (Figure 2C)

Dans la suite de nos expérimentations, nous nous sommes concentrés sur l'étude d'un seul de ces clones, le clone PC9-GR1. Ce clone présente une résistance au traitement, par comparaison à la lignée parentale PC9, visible lors de test de clonogénicité (Figure 2D) mais également lors de l'observation du cycle cellulaire par cytométrie en flux (Figure 2D). En effet, l'administration du Gefitinib n'a aucun effet sur le cycle cellulaire de cette nouvelle lignée tandis qu'un arrêt en G1 et de nombreuses cellules en sub-G1, en faveur d'une mort cellulaire, sont observées dans la lignée parentale. Ceci est également visible au niveau de la différence d'expression protéique de la Cycline A dans les deux lignées (Figure 2F), nécessaire au passage de la phase G1 à la phase S. Enfin, afin de vérifier que cette résistance n'est pas un phénomène transitoire¹⁶⁴ avec une éventuelle diminution de la résistance dans le temps, une étude de la viabilité des cellules PC9-GR1 avec plus ou moins 20 passages a été réalisée en présence de différentes concentrations de Gefitinib et aucune différence n'a été constatée. En conclusion, les cellules PC9-GR1 et de manière plus générale les clones PC9-GR présentent une résistance acquise aux ITK-EGFR.

La résistance acquise des cellules PC9-GR1 est issue d'un changement d'addiction oncogénique.

En clinique, la moitié des résistances acquises au Gefitinib (et à l'Erlotinib) sont liées à l'apparition de la mutation de résistance p.Thr790Met au niveau de l'exon 20 de l'EGFR. Cette mutation empêche l'association de l'inhibiteur au domaine tyrosine kinase favorisant un maintien de l'activation constitutive malgré l'administration de la molécule thérapeutique. (Figure 1B) La première étape dans l'identification de la résistance des clones PC9-GR a donc été le séquençage de l'ensemble des exons du récepteur. Aucune mutation de résistance n'a cependant été détectée, la délétion présente dans la lignée parentale a été caractérisée dans les clones PC9-GR dans les mêmes proportions. (Figure 3A)

L'analyse de l'expression du récepteur dans la lignée PC9-GR1, transcriptionnelle par RT-qPCR (Figure 3B) et de la protéine (Figures 3C et 3D) démontrent une augmentation dans la lignée PC9-GR1. L'étude par

cytométrie en flux permet également d'écarter une éventuelle relocalisation cytoplasmique de l'EGFR. L'augmentation de son expression est alors démontrée à la fois par la fréquence de cellules positives et l'intensité de fluorescence moyenne des cellules. (Figure 3C) Cependant, malgré l'augmentation de l'EGFR total, sa phosphorylation est toujours inhibée en présence de l'ITK-EGFR. (Figure 3D) Cette observation est en faveur d'un changement d'addiction oncogénique, ce qui est confirmé en western blot par le maintien dans la lignée PC9-GR1 de l'activation de la voie des MAPK, par l'intermédiaire de pERK1/2, et de la voie PI3K/Akt/mTOR par l'intermédiaire de p-Akt et de la pS6 ribosomale. Ainsi, la résistance acquise des cellules PC9-GR1 n'est donc pas liée à une mutation de résistance au niveau du récepteur mais à un changement d'addiction oncogénique.

Les cellules PC9-GR1 présentent une signature d'activation de TBK1 sous pression du Gefitinib.

Afin de déterminer l'origine du changement d'addiction oncogénique démontré dans les cellules PC9-GR1, nous avons réalisé une étude transcriptomique. Pour cela, la lignée résistante ainsi que la lignée parentale ont été exposées ou non au Gefitinib pendant 48h. Chaque condition a été réalisée en triplicat. L'analyse statistique des données générées a vérifié que ces conditions présentaient suffisamment de différences significatives pour que les résultats soient étudiés. (Figure 4A) Sans traitement, 1322 cibles sont significativement différentielles entre les lignées PC9 et PC9-GR1. Sous pression du Gefitinib, ce sont 2037 cibles qui ont été caractérisées. Ce sont ces-dernières, permettant l'adaptation des cellules résistantes au traitement, qui vont nous intéresser.

L'analyse par Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) des différences significatives entre les deux types cellulaires traités 48h au Gefitinib a été réalisée suivant deux types de caractérisations, les hallmarks puis les addictions oncogéniques. Concernant les hallmarks dans la lignée PC9-GR1, nous avons pu observer des signatures témoignant de la prolifération de la lignée malgré la pression thérapeutique rejoignant certains résultats précédents : G2M checkpoints, E2F targets ou encore Mitotic spindle. (Figure 4B) Lors de la recherche des signatures oncogéniques, celle de l'EGFR a été caractérisée concordants avec les résultats précédents quant à sa surexpression. Les signatures VEGF et TBK1 ont également été déterminées. TBK1 est une IKB non conventionnelle dont l'activité est fortement liée à celle de NFkB. La signature TBK1 comprend les gènes dont l'expression a été diminuée lors de la réalisation d'un siTBK1 sous addiction oncogénique de KRAS, ce sont donc les gènes cibles activés par TBK1. Dans nos conditions, 34 de ces gènes ont été identifiés. (Figure 4C et 4D) Afin de confirmer la présence de cette signature, l'expression transcriptionnelle de certains de ces gènes a été évaluée par RTqPCR. (Figure 4E) L'expression de TGM2, une des protéines les plus significativement différentes dans nos conditions, a également été vérifiée. Cette dernière favorise également une régulation positive de la voie IKB/NFkB. Les cellules PC9-GR1 dispose donc d'un mécanisme d'adaptation au Gefitinib grâce à l'activation d'une voie de signalisation passant par TBK1.

La co-inhibition EGFR-TBK1 permet de limiter la résistance acquise des cellules PC9-GR1

Bcl-XL et c-Rel étant des gènes cibles de TBK1, nous avons interrogé leur niveau d'expression dans nos deux lignées. Un maintien de l'expression protéique de ces deux protéines est constaté dans la lignée résistante PC9-GR1 confirmant la signature TBK1 déterminée par RNAseq. (Figure 5A) L'ajout simultanément d'EGF dans le milieu de culture n'entraînant pas de différences au niveau des résultats a permis d'écarter la piste d'une activation ligand dépendante de l'EGFR.

Une inhibition simultanée de l'EGFR (Gefitinib et Osimertinib) et de TBK1, à l'aide du BX795, a ensuite été réalisée. (Figure 5B) Dans la lignée parentale, très peu de cellules survivent à cette co-inhibition (<2%). Cette combinaison thérapeutique est également efficace sur la lignée résistante PC9-GR1, un effet synergique est alors observé. Ces résultats ont été confirmés par la réalisation d'un test de clonogénicité (Figure 5D). La visualisation des cellules PC9-GR1 dans les conditions non traitées et en présence de BX795 est plus difficilement visible en raison du caractère diffus de leur prolifération, un tapis cellulaire confirme pourtant la survie dans ces conditions. Tandis que de nombreux clones étaient visibles en présence de Gefitinib dans cette lignée, ils sont beaucoup moins nombreux lors de la co-inhibition. La visualisation du cycle cellulaire a été réalisée par cytométrie en flux et coloration au Vindelow83. (Figure 5C) Lors de l'ajout de l'inhibiteur de TBK1 seul, la lignée PC9-GR1 semble plus impactée avec un nombre très important de cellules bloquées en phase G2. A nouveau, la combinaison thérapeutique favorise la mort cellulaire, visible par l'intermédiaire du sub-G1, mais dans des proportions encore faibles, le temps de traitement est probablement quelque peu insuffisant. L'impact de cette co-inhibition sur l'activation de

l'EGFR a été examiné, et une perte de la phosphorylation est alors constatée. (Figure 5E) De manière plus surprenante, l'inhibition de TBK1 seule impacte également la phosphorylation du récepteur mais probablement plutôt par ses conséquences sur le niveau protéique de l'EGFR total. Enfin, la combinaison permet d'inhiber les expressions protéiques de c-Rel et c-Myc dans la lignée résistante PC9-GR1, toutes deux maintenues en présence de Gefitinib. (Figure 5F) L'expression de Bcl-XL est elle maintenue malgré la co-inhibition. Le temps de traitement peut dans ce cas à nouveau être interrogé.

La comparaison des exomes de PC9 et PC9-GR1 valide l'efficacité de la mutagenèse aléatoire via l'ENU

La comparaison des exomes réalisés dans la lignée parentale et la lignée PC9-GR1 a permis la mise en évidence de 28 altérations ponctuelles entraînant des changements d'acides aminés, très peu d'insertions et de délétions ont été caractérisées. Ces mutations impliquent des changements de nucléotides avec une majorité de transitions (63%) ou des modifications A-T (21.05%). (Figure 6A) Ces résultats confirment l'efficacité de l'ENU et de la mutagenèse aléatoire réalisée dans cette lignée. La liste de ces altérations (Figure 6B) comprend principalement des variants non répertoriés donc de signification biologique inconnue ainsi que deux mutations induisant l'apparition de codons stop au niveau des gènes MIER3 et UACA.

Discussion

Avec des taux de réponse de 70%, les ITK-EGFR de première génération ont permis d'importants progrès thérapeutiques dans les CBNPC mutés au niveau de l'EGFR^{86,88}. Les mécanismes de résistance acquise suivant une administration continue ont été particulièrement étudiés avec la caractérisation de la mutation de résistance p.Thr790Met de l'EGFR (50%, présente dans la lignée H1975, Figures 1A, 1B et 1D), les variants rares de l'EGFR (5%), les changements phénotypiques (EMT et transformation en CBPC) ou encore les changements d'addiction oncogéniques¹⁴⁰⁻¹⁴². Afin de les étudier, la lignée PC9, mutée EGFR et sensibles aux ITK-EGFR, a été utilisée. (Figure 1) Afin de mimer l'évolution de la dérive génétique sous pression thérapeutique, cette lignée parentale a été exposée pendant 24h à l'ENU, agent alkylant permettant l'insertion de mutations ponctuelles aléatoires, puis les cellules ont été dissociées et soumises à une pression croissante de Gefitinib. (Figure 2A) Cette expérience a favorisé la génération de cellules présentant une résistance acquise aux ITK-EGFR de première et troisième génération. (Figure 2C) Cette tolérance au traitement se traduit par un maintien du cycle cellulaire sous pression du médicament. (Figure 2E et 2F) D'autre part, et contrairement à d'autres études réalisées sur cette même lignée cellulaire¹⁶⁴, cette résistance n'est pas liée à une régulation épigénétique et n'est donc pas réversible. (Figure 2G) Cette divergence est probablement liée à l'utilisation de l'agent mutagène. En effet, 28 nouvelles altérations ponctuelles ont été caractérisées dans la lignée résistante PC9-GR1 (Figure 6B). Ces mutations sont, de plus, principalement des transitions ou des mutations A-T ou T-A (Figure 6A) ce qui correspond aux types de mutations retrouvées dans d'autres publications³³⁹⁻³⁴¹. La réalisation de cette mutagénèse aléatoire et le manque de spécificité de l'ITK-EGFR de première génération, contrairement à celle de l'Osimertinib¹⁷¹ ou du Cetuximab³⁴², expliquent l'absence de clones résistants présentant une mutation secondaire de l'EGFR (Figure 3A). Bien que ces résultats diffèrent de ceux attendus, ils favorisent la caractérisation de nouveaux mécanismes de résistance aux traitements, plutôt liés à un changement d'addiction oncogénique. (Figure 3E) Une surexpression du récepteur lui-même a cependant été observée dans la lignée PC9-GR1. (Figure 3B, 3C, 3D et 4B)

L'étude du transcriptome des lignées PC9 et PC9-GR1 avec et sans Gefitinib a d'une part confirmé la prolifération des cellules résistantes sous pression thérapeutique (Figure 4B), mais a également permis la mise en évidence de la signature TBK1. (Figures 4B, 4C et 4D) L'activation des gènes cibles de cette protéine a été confirmée par RTqPCR. (Figure 4E) TBK1 est une sérine/thréonine kinase, IKB non conventionnelle, elle active IRF3, c-Rel, Bcl-XL ainsi que la voie de signalisation dépendante de NFkB^{61,343}. (Figure 5A) Cette protéine favorise la carcinogénèse, l'inflammation, la transformation mésoenchymateuse³⁴⁴ ainsi que la survie dépendante de Myc³⁴⁵. Les signatures VEGF, EMT, APICAL JUNCTION et MYC TARGETS ont par ailleurs été retrouvées dans la lignée PC9-GR1 lors de l'analyse GSEA. (Figure 4B) D'autre part, les différences morphologiques observées entre les lignées PC9 et PC9-GR1 vont elles aussi dans ce sens. TBK1 peut être inhibé par l'agent pharmacologique BX795³⁴⁶. Une combinaison thérapeutique des ITK-EGFR et du BX795 a donc été testée sur la lignée résistante ainsi que la lignée parentale. L'effet synergique de cette inhibition conjointe est efficace sur les deux types cellulaires potentialisant la mort cellulaire. (Figure 5B, 5C, 5D et 5F) Cette nouvelle combinaison thérapeutique rejoint celle testée dans des cellules HER2+ humaines et murines³⁴⁷. Dans cet article, un effet synergique entre un shTBK1 et le Lapatinib, inhibiteur de HER2, avait démontré des résultats intéressants, y compris *in vivo*.

L'exome des lignées PC9 et PC9-GR1 a favorisé la caractérisation de 28 altérations génétiques apparues suite à la mutagénèse aléatoire. Ces mutations sont principalement des variants de significations biologiques inconnues, non répertoriés. Deux codons non-sens sont cependant apparus au niveau des gènes MIER3 et UACA. (Figure 6B) Peu d'informations sont connues sur MIER3, une étude le définit pourtant comme gène suppresseur de tumeur, inhibant la progression tumorale des cancers colorectaux ainsi que la transformation mésoenchymateuse³⁴⁸. Les conséquences de sa perte pourraient donc être corrélées aux observations réalisées dans notre lignée résistante. UACA est, lui, un régulateur négatif de NFkB, jouant un rôle dans la régulation pro-apoptotique³⁴⁹. Sa perte favorise donc la survie, l'activation de NFkB et par extension probablement celle de TBK1.

D'autre part, une étude récente a démontré que la surexpression de l'EGFR implique l'activation de deux voies de signalisation mutuellement exclusives : une voie constitutive et non-canonique impliquant IRF3 et

TBK1, ainsi qu'une deuxième voie d'activation canonique ligand dépendante associée aux voies des MAPK et PI3K/Akt³⁵⁰. L'augmentation de l'expression du récepteur induit son association à IRF3 et TBK1, activant la voie de signalisation correspondante. Lors de la fixation d'un ligand, ce complexe est dissocié et ce sont les voies canoniques qui sont activées. L'utilisation de cette voie non canonique en cancérologie a été démontrée dans les glioblastomes³⁵⁰. Concernant notre lignée PC9-GR1, la résistance acquise aux ITK-EGFR observée pourrait donc être issue à la fois de la surexpression du récepteur observée et l'activation de cette voie non-canonique ainsi que de l'induction de la voie NFkB par l'intermédiaire des mutations non-sens d'UACA. La perte du suppresseur de tumeur MIER3 ne doit également pas être écartée. Un lien entre niveau d'expression de l'EGFR et activation de TBK1 a, par ailleurs, été réalisé dans notre modèle. (Figure 5E) La coexistence de plusieurs mécanismes collaborant et favorisant cette résistance acquise n'est pas réellement surprenante. Lors de la génération des cellules résistantes, 1000 cellules/puits avaient été déposées, plusieurs clones résistants peuvent donc coopérer. Ceci corrobore les fréquences de l'exome dans la lignée PC9-GR1 traduisant une diversité clonale. (Figure 6B) Cette hétérogénéité intratumorale des mécanismes de résistances est d'ailleurs fréquemment retrouvée en clinique¹⁴⁵.

En conclusion, la résistance acquise de la lignée résistante générée, PC9-GR1, dépend de l'activation de TBK1 et de la voie NFkB. Plusieurs phénomènes peuvent favoriser simultanément son activation et certains variants de signification inconnus (Figure 6B) pourraient également intervenir. Cette étude a cependant démontré l'intérêt d'une nouvelle combinaison thérapeutique (TBK1 et EGFR) permettant de contourner la résistance acquise dans la lignée résistante et de potentialiser l'effet des ITK-EGFR dans la lignée sensible. Par ailleurs, TGM2 dont l'expression est très significativement augmentée dans la lignée résistante (Figure 4E) pourrait être un nouveau biomarqueur signalant une résistance liée à cette voie de signalisation. Une surexpression de cette protéine est déjà corrélée à un pronostic non favorable dans les cancers du pancréas, urothéliaux et du rein. Une étude quant à son expression dans les résistances acquises aux ITK-EGFR dans les CBNPC pourrait donc être envisagée.

Figures

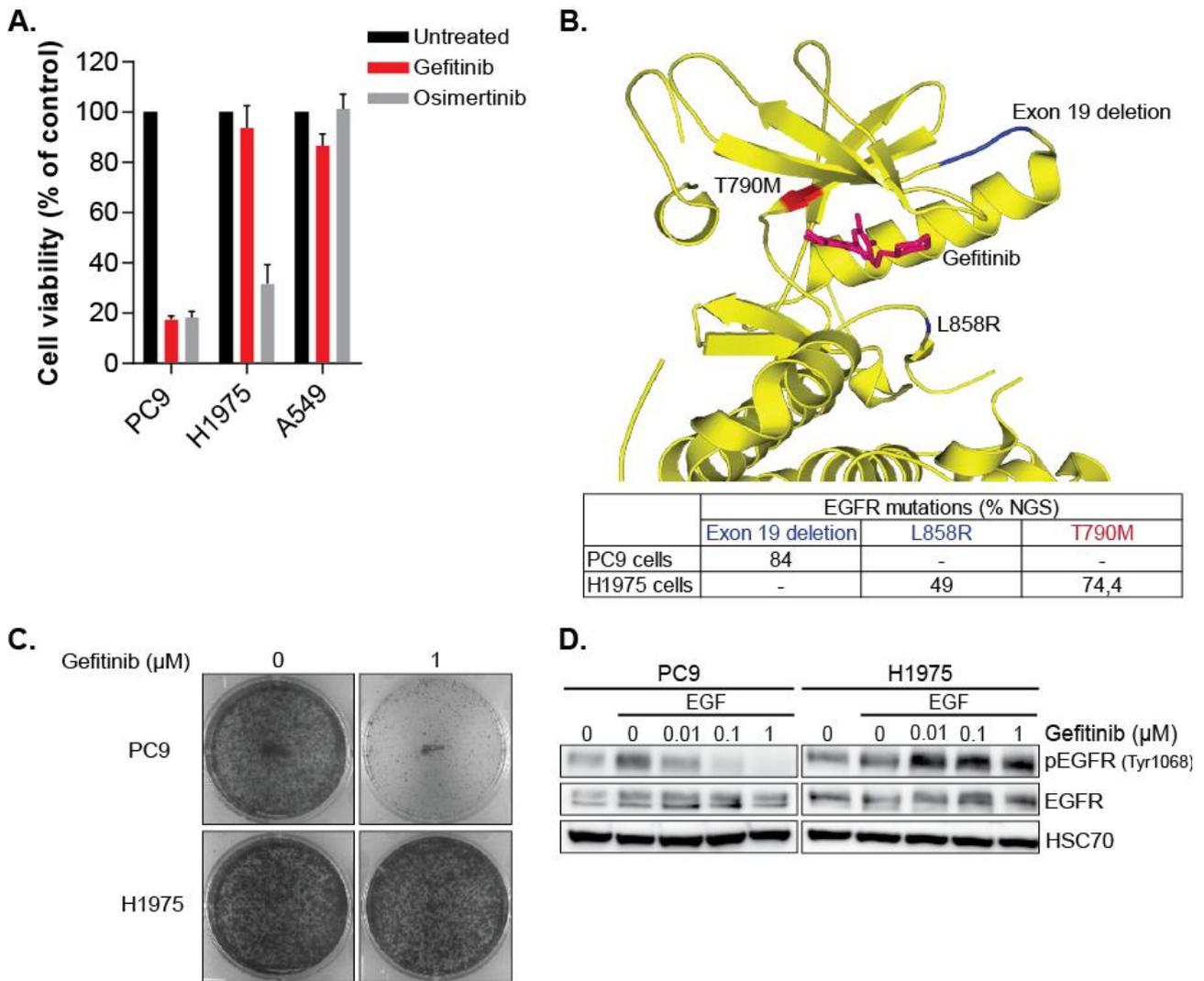


Figure 1 : Les cellules PC9 sont sensibles aux ITK-EGFR. A. Histogramme comparant la viabilité des différentes lignées cellulaires d'adénocarcinomes pulmonaires PC9, H1975 et A549 après exposition aux ITK-EGFR de première (Gefitinib 1μM) et deuxième (Osimertinib 0.1μM) générations pendant 96h à l'aide d'un test MTT (n=5, test de Kolmogorov-Smirnov). **B.** Structure cristallographique du domaine tyrosine kinase de l'EGFR associé au Gefitinib et mise en évidence de la localisation des mutations des différentes lignées utilisées. **C.** Images obtenus après tests de clonogénicité des lignées PC9 et H1975 en présence ou non de Gefitinib (n=3). **D.** Western blot montrant l'activation de l'EGFR face à des doses croissantes de Gefitinib, une stimulation à l'EGF des cellules a été réalisée 7min avant extraction des protéines (n=3).

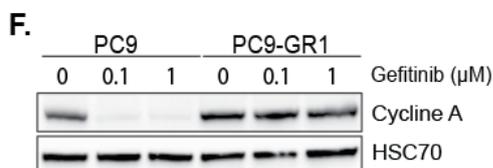
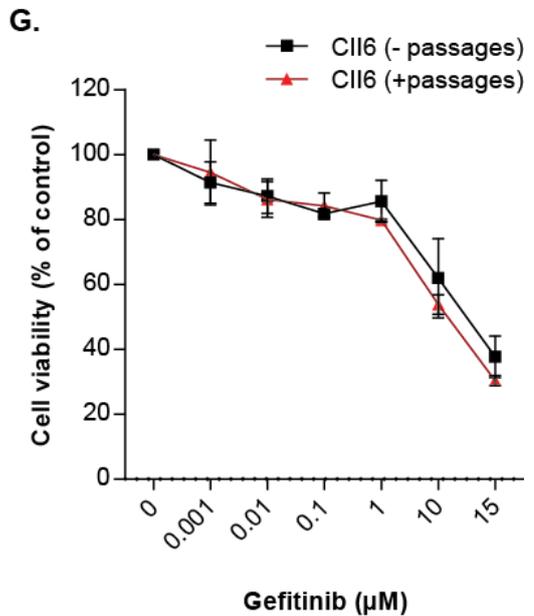
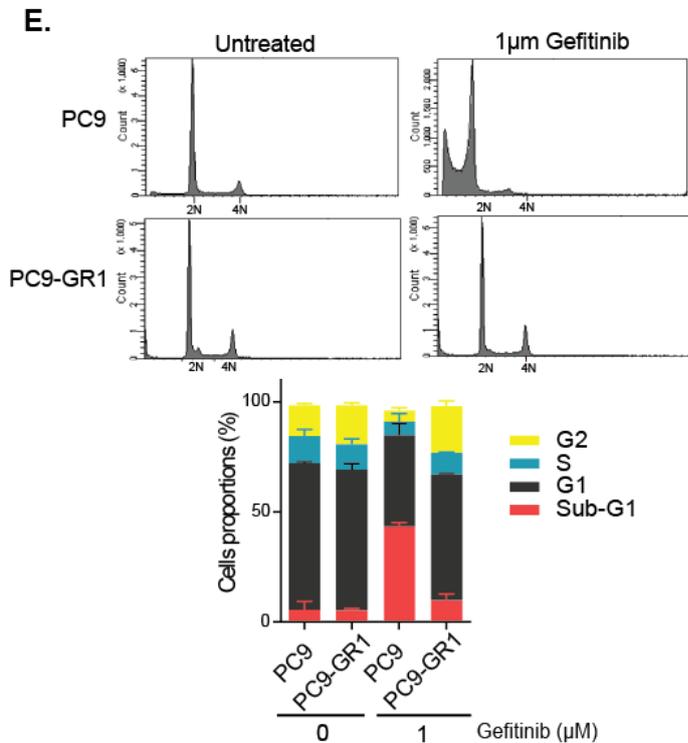
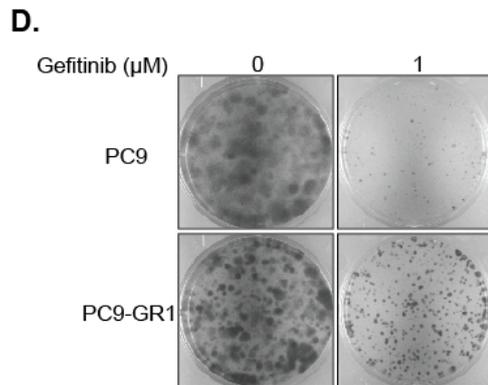
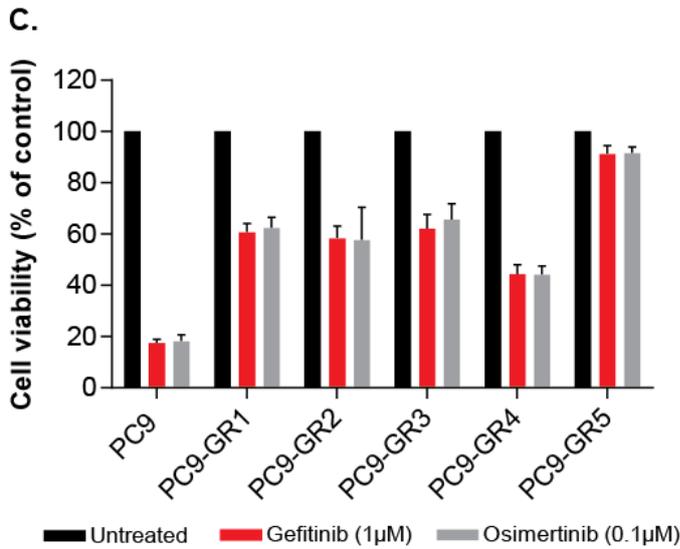
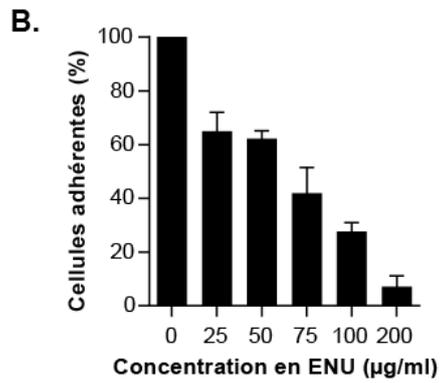
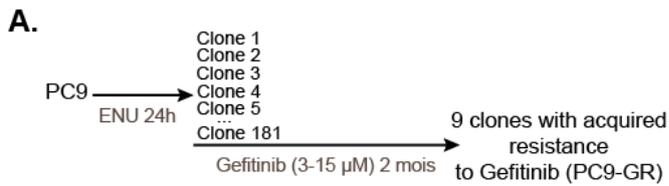


Figure 2 : Les cellules PC9-GR générées présentent une résistance acquise aux ITK-EGFR. A. Représentation schématique du protocole utilisé afin d'obtenir les cellules PC9-GR. **B.** Test de viabilité cellulaire des cellules PC9 à l'aide d'un test MTT après exposition 24h des cellules à l'ENU (n=3). **C.** Test de viabilité cellulaire des cellules PC9 et des différents clones PC9-GR générés après exposition 72h au Gefitinib (1 μ M) ou à l'Osimertinib (0.1 μ M) à l'aide d'un test MTT (n=5, Test de Kolmogorov-Smirnov). **D.** Test de clonogénicité des cellules PC9 et PC9-GR1 colorées au crystal violet 10 jours après exposition au Gefitinib (1 μ M) (n=5). **E.** Histogrammes montrant la proportion de cellules aux différentes phases du cycle cellulaire après marquage de l'ADN par la technique Vindelov 83 des cellules PC9 et PC9-GR1 traitées ou non au Gefitinib (1 μ M) pendant 96h (n=5). **F.** Western blot de la Cycline A dans les cellules PC9 et PC9-GR1 en présence de doses croissantes de Gefitinib. (n=3) **G.** Test de viabilité cellulaire des cellules PC9-GR1 ayant plus ou moins de passages en présence de différentes concentrations de Gefitinib pendant 72h (n=3).

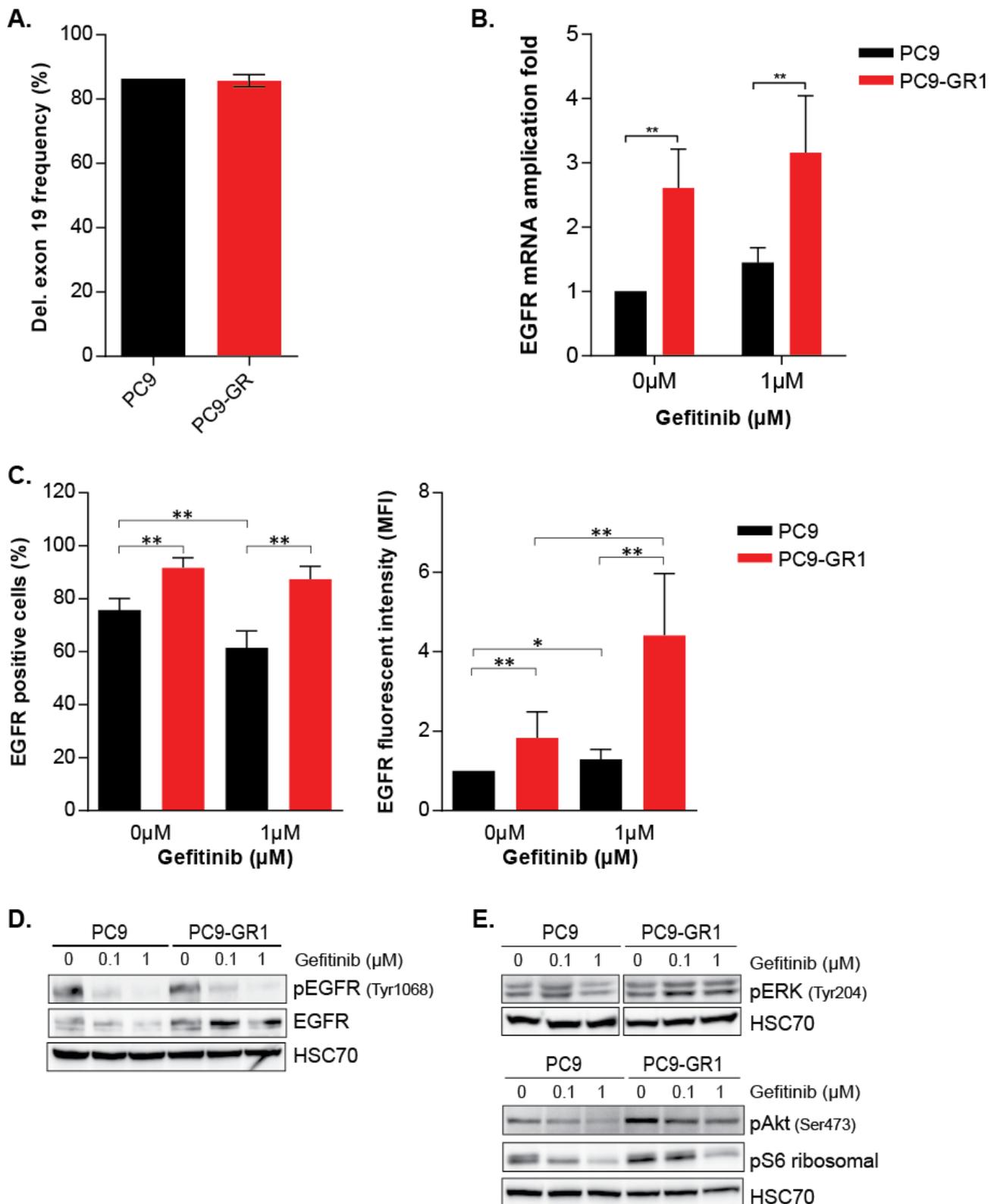


Figure 3 : La résistance des clones PC9-GR1 est liée à un changement d'addiction oncogénique.

A. Fréquences des altérations génétiques de l'EGFR déterminées par séquençage NGS des exons du récepteur des clones PC9-GR et de la lignée parentale PC9. **B.** Niveau d'expression transcriptionnelle de l'EGFR dans les cellules PC9-GR1 et PC9 traitées au Gefitinib (1 μ M) (n=4, Kolmogorov Smirnov). L'expression transcriptionnelle a été normalisée par comparaison à celle des gènes de référence β -actine et TBP. **C.** Expression protéique de l'EGFR analysée par cytométrie en flux dans les cellules PC9 et PC9-GR1 après 72h de traitement au Gefitinib (1 μ M). Sont représentées ici les fréquences de cellules positives et l'intensité de fluorescence (n=5, Kolmogorov-Smirnov). **D et E.** Western blot montrant l'activation de différentes protéines dans les cellules PC9 et PC9-GR1 (n=3).

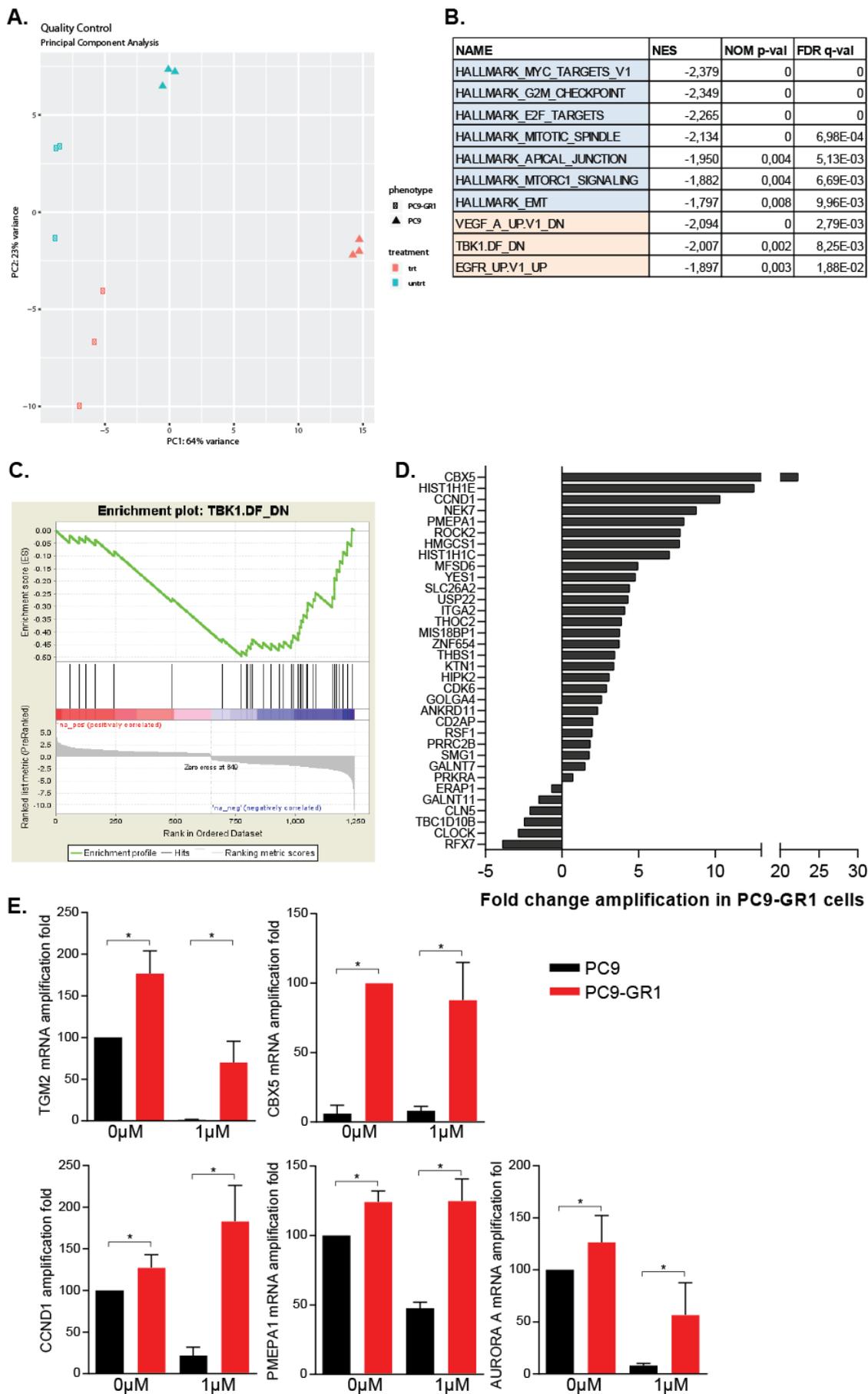


Figure 4 : Les cellules PC9-GR1 présentent une signature TBK1 sous pression du Gefitinib. A. Représentation statistique des différences d'expressions observées dans les cellules PC9 et PC9-GR1

traitées ou non 48h au Gefitinib (1 μ M) à l'aide de la réalisation d'un RNAseq. Chaque condition a été réalisée en triplicat. **B.** Résultats de l'analyse GSEA réalisée suite au RNAseq et recherchant les signatures à l'aide du set Hallmarks (Bleu) et du set Signature oncogénique (Orange). L'analyse compare les cellules parentales PC9 aux cellules PC9-GR1 sous pression du Gefitinib (1 μ M) pendant 48h. **C.** Enrichment Plot de la signature TBK1 déterminée dans les cellules PC9-GR1 sous pression du Gefitinib pendant 48h (1 μ M) caractérisée à l'aide de l'analyse GSEA. **D.** Représentation des différences d'expressions transcriptionnelles des gènes impliqués dans la signature TBK1 entre les cellules PC9-GR1 et la lignée parentale PC9. **E.** Vérification de certains gènes de la signature TBK1 par réalisation de RT-qPCR dans les cellules PC9 et PC9-GR1 traitées ou non 48h au Gefitinib (1 μ M). L'expression transcriptionnelle a été normalisée par comparaison à l'expression des gènes de référence β -actine et TBP (n=4, Kolmogorov-Smirnov).

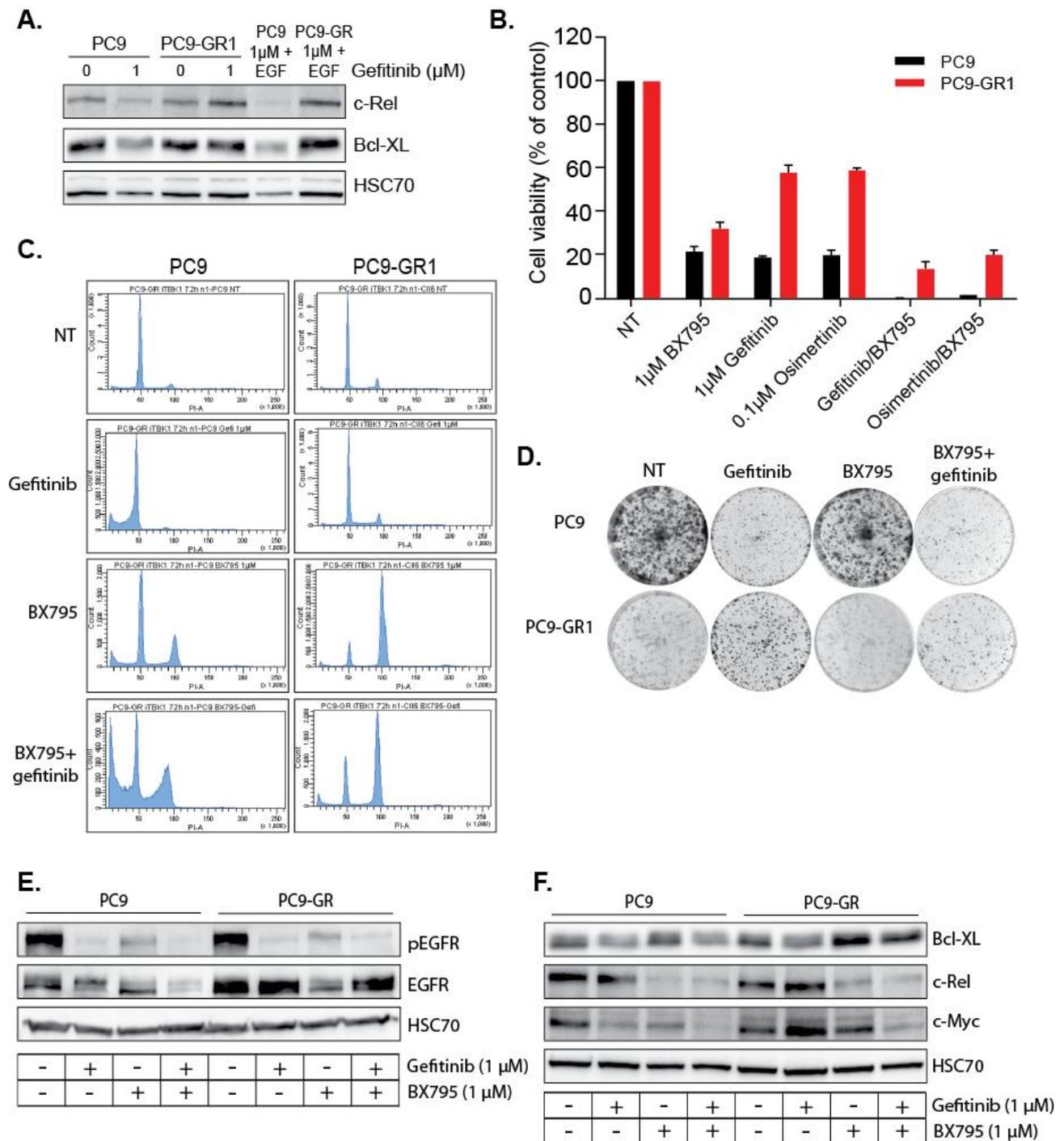
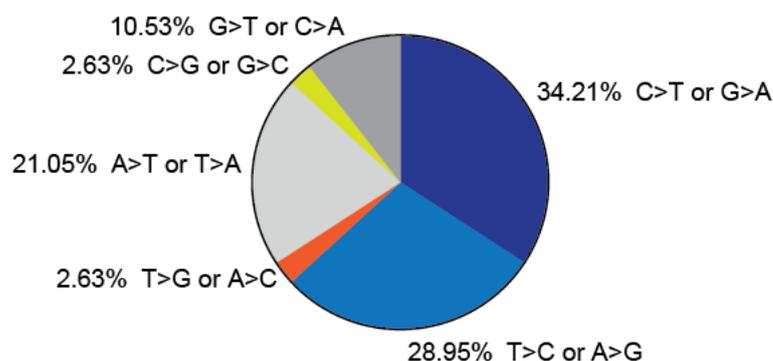


Figure 5 : La combinaison thérapeutique iEGFR et iTBK1 permet de contourner la résistance des cellules PC9-GR1. A. Western blot montrant le niveau d'expression protéique de c-Rel et Bcl-XL dans les cellules PC9 et PC9-GR1 après 72h de traitement au Gefitinib ($1\mu\text{M}$). Une stimulation de 7 min à l'EGF a également été réalisée avant l'extraction protéique (n=3). **B.** Test de la viabilité cellulaires des cellules PC9 et PC9-GR1 à l'aide d'un test combinant les ITK-EGFR (Gefitinib et Osimertinib) et le BX795 ($1\mu\text{M}$) après 72h d'exposition (n=5). **C.** Histogrammes montrant la proportion de cellules aux différentes phases du cycle cellulaire après marquage de l'ADN par la technique Vindelov 83 des cellules PC9 et PC9-GR1 traitées au Gefitinib ($1\mu\text{M}$) et/ou au BX795 ($1\mu\text{M}$) pendant 72h (n=4). **D.** Test de clonogénicité des cellules PC9 et PC9-GR1 colorées au crystal violet 10 jours après exposition au Gefitinib ($1\mu\text{M}$) et/ou au BX795 ($1\mu\text{M}$) (n=4). **E et F.** Western blot montrant le niveau d'expression protéique de différentes protéines dans les cellules PC9 et PC9-GR1 après 72h de traitement au Gefitinib ($1\mu\text{M}$) et/ou au BX795 ($1\mu\text{M}$) (n=3).

A.



B.

Gene names	NT. change	AA change	Freq. (%)	Exonic function
KIAA1324	c.T436C	p.S146P	58,33	VUS
NPR1	c.T4361C	p.L154P	39,19	VUS
UBAP2L	c.T1036A	p.F346I	33,19	VUS
ATP8B2	c.T974C	p.L325P	28,13	VUS
ADAR	c.A901G	p.T301A	42,71	VUS
LY9	c.T1156A	p.W386R	25,51	VUS
LRP2	c.A9314G	p.D3105G	46,67	VUS
ATG4B	c.G1033T	p.A345S	20,72	VUS
GADL1	c.T304C	p.C102R	25,96	VUS
LRBA	c.T7174A	p.F2392I	36,84	VUS
MIER3	c.T771A	p.Y257X	39,73	stopgain
LCP2	c.A437G	p.E146G	26,25	VUS
GPRIN1	c.G274A	p.A92T	32,39	VUS
AUTS2	c.G1874T	p.W625L	26,87	VUS
NAPEPLD	c.C919T	p.P307S	20,22	VUS
RIMS2	c.A2456G	p.E819G	29,27	VUS
GPA1	c.G449A	p.C150Y	32,11	VUS
RIC1	c.T1420G	p.L474V	44,44	VUS
WDR38	c.A356T	p.D119V	37,56	VUS
ADAMTS13	c.G4051A	p.E1351K	26,45	VUS
H2AFY2	c.T751C	p.S251P	21,29	VUS
SORCS3	c.A2939G	p.Q980R	39,62	VUS
HYOU1	c.C2506T	p.L836F	31,46	VUS
CCDC15	c.T965A	p.F322Y	33,78	VUS
TMEM233	c.T182A	p.I61N	30,77	VUS
AACS	c.C1195T	p.H399Y	29,26	VUS
EP400	c.T5669A	p.M1890K	32,04	VUS
SPRY2	c.G380T	p.S127I	33,17	VUS
POTEB3	c.A127G	p.M43V	38,00	VUS
WDR72	c.G991A	p.E331K	27,27	VUS
UACA	c.C4039T	p.Q1347X	32,22	stopgain
IFT140	c.C481T	p.P161S	26,94	VUS
IRX5	c.C128T	p.S43F	24,27	VUS
ADAMTS18	c.G2299C	p.E767Q	30,83	VUS
EPB41L3	c.G2006A	p.G669E	27,33	VUS
CYP4F3	c.G805T	p.A269S	36,63	VUS
SLC4A11	c.G1306A	p.A436T	36,13	VUS
PDGFB	c.G233A	p.R78H	28,00	VUS

Figure 6 : Résultats de la comparaison des exomes de PC9 et PC9-GR1. A. Types de mutations retrouvées par séquençage des exomes suite à l'exposition à l'ENU des cellules PC9-GR1. Les 28 altérations génétiques référencées sont celles différents de la lignée parentale PC9. B. Liste de ces altérations génétiques étant apparues dans la lignée PC9-GR1.

1.1.5. Résultats de l'article 3

Les inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant l'EGFR affichent un taux de réponse de 70% chez les patients atteints de CBNPC avec des mutations activatrices de l'EGFR. Cependant, comme mentionné précédemment, une résistance acquise apparaît régulièrement 9 à 12 mois après le début de l'administration continue. De nombreuses publications ont traité de ce phénomène mais dans 15 à 20% des cas, l'origine demeure inconnue. Afin d'aider à la caractérisation de ces mécanismes de résistance acquise et dans le but d'identifier de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques, une insertion randomisée de mutations ponctuelles dans notre modèle résumant l'évolution génétique tumorale en cours de traitement, a été suivie d'une sélection des cellules résistantes à l'aide d'un ITK-EGFR. C'est alors l'origine de leur adaptation et résistance au traitement qui a été étudié.

Les cellules PC9-GR, générées par mutagenèse aléatoire puis sélection en présence de doses croissantes de Gefitinib, présentent une résistance acquise aux ITK-EGFR de première et de troisième génération. L'absence de mutations secondaires au niveau du récepteur nous a permis de conclure sur un changement d'addiction oncogénique dans ces cellules, bien qu'une surexpression du récepteur ait été démontrée. Afin d'en déterminer l'origine et d'identifier de nouveaux mécanismes de résistance acquise à ce type de thérapie, nous nous sommes concentrés sur une des lignées générées, PC9-GR1, et un transcriptome a été réalisé. Outre la confirmation de la prolifération de ces cellules résistantes malgré la présence de Gefitinib, contrairement à la lignée parentale, la signature oncogénique TBK1 a également été mise en évidence. Cette kinase agissant sur les sérines et thréonines est une I κ B non conventionnelle appartenant à la voie de signalisation NF κ B. La confirmation de sa présence par RTqPCR a été suivie d'une évaluation de la sensibilité des PC9-GR1 et de la lignée parentale PC9 à un inhibiteur ciblant l'activité de cette protéine, le BX795. L'inhibition conjointe EGFR-TBK1 a donc été testée démontrant une efficacité sur les deux types cellulaires. Enfin, la réalisation d'exomes a confirmé l'efficacité de la mutagenèse en séquençant 28 nouvelles altérations génétiques dans la lignée résistante. Ces dernières sont majoritairement des variants de significations inconnus, 2 mutations non-sens au niveau des gènes MIER3 et UACA ont cependant été caractérisées.

1.1.6. Discussion de l'article 3

L'efficacité de la mutagenèse aléatoire effectuée sur les cellules PC9-GR1 a été validée suite à la réalisation des exomes. Le spectre mutationnel des 28 nouvelles altérations ponctuelles séquencées correspond à celui des précédentes études utilisant l'ENU³³⁹⁻³⁴¹. L'ensemble des gènes impliqués n'ont précédemment pas été associé à des phénomènes de résistance acquise aux ITK-EGFR permettant la caractérisation de potentiels nouveaux biomarqueurs de résistance.

La signature TBK1 caractérisée dans les cellules résistantes PC9-GR1 sous pression thérapeutique, implique une activation des gènes cibles de cette protéine dans notre modèle. La kinase TBK1 a déjà été associée à la carcinogénèse, notamment ces rôles dans la survie, l'inflammation et la transformation

épithélio-mésenchymateuse³⁴⁴. Bien que peu de mutations de TBK1 ne soient, à ce jour, répertoriées dans les bases de données (Clivar, c-Bioportal), la surexpression de cette protéine est associée à un mauvais pronostic notamment dans les cancers du rein, les mélanomes ou encore les cancers du foie (Human Protein Atlas). La détermination de cette signature dans notre étude a permis l'évaluation de l'efficacité d'une nouvelle combinaison thérapeutique impliquant les inhibitions de l'EGFR (avec les ITK-EGFR de première ou troisième génération) et de TBK1 (BX795). Dans nos deux lignées, cette association potentialise l'effet de l'ITK-EGFR dans les cellules sensibles et sensibilise les cellules résistantes. Cette observation rejoint celle de Bivona et son équipe qui avaient souligné la modulation de la dépendance des cellules pour l'EGFR muté par FAS (une I κ B) et NF κ B¹³². L'inhibition de FAS ou NF κ B augmentait alors l'apoptose induite par l'Erlotinib, aucune mention de TBK1 n'est faite.

La surexpression de l'EGFR, telle qu'elle est retrouvée dans nos cellules résistantes PC9-GR1, implique l'activation de deux voies de signalisation mutuellement exclusives dépendantes de l'EGFR³⁵⁰. La première est activée par l'association d'un ligand en extracellulaire, cette voie canonique passe par l'activation des voies les plus connues, MAP kinases et PI3K/Akt. La deuxième, non canonique, est activée constitutivement lors de la surexpression du récepteur. Cette dernière voie est peu étudiée et implique une association permanente de l'EGFR, d'IRF3 et de TBK1, l'activant. Ce complexe est dissocié lors de l'activation ligand dépendante. Ceci est particulièrement intéressant sachant que 62% des CBNPC ont une surexpression de l'EGFR¹¹² et pourrait expliquer en partie l'efficacité de la combinaison thérapeutique mise en place. Des analyses complémentaires de cette co-inhibition sur les autres lignées PC9-GR vont dans ce sens. (Résultats complémentaires 2A) Une synergie de la co-inhibition (avec Gefitinib ou Osimertinib) est observée dans les lignées 4 et 5 confirmant les résultats de PC9-GR1. Les effets sont moins importants dans la lignée 3 tandis que l'inhibition de TBK1 seule est létale dans la lignée PC9-GR2. La même expérience a été réalisée dans les lignées H1975 (mutée p.Thr790Met) et A549 (non mutée EGFR). Concernant H1975, l'effet synergique est uniquement retrouvé en présence de l'Osimertinib. La mutation p.Thr790Met gênant l'association et l'action du Gefitinib, ceci est cohérent. De même, l'absence de synergie dans la lignée A549 limite l'intérêt de cette association inhibitrice aux cellules présentant une addiction oncogénique à l'EGFR. La nécessité de la dépendance en cette voie de signalisation pour être efficace rejoint les résultats démontrant une létalité synthétique entre KRAS et TBK1 dans des cellules mutées KRAS⁶¹. Cette létalité synthétique entre la voie des MAPK, activée par l'EGFR, et la voie TBK1 pourrait donc s'appliquer aux CBNPC mutés EGFR.

D'autre part, la réalisation d'un exome de la lignée PC9-GR1 a démontré la présence de mutations non-sens au niveau des gènes MIER3 et UACA. Ces deux gènes sont liés dans la bibliographie à la progression tumorale, l'EMT³⁴⁸ ou encore l'activation de NF κ B³⁴⁹ et leur inhibition sont associés à des mauvais pronostic dans différentes localisations tumorales. Cet article n'étant pas terminé, d'autres expérimentations impliquant des ARN interférents ciblant ces protéines sont envisagées. Les nombreux VSI caractérisés restent cependant non étudiés, la caractérisation biologique de ce type de mutations au niveau de BRCA1/2 fera l'objet de la deuxième partie des résultats de cette thèse.

En conclusion, ces travaux sur la résistance acquise aux ITK-EGFR a permis la caractérisation d'une potentielle nouvelle combinaison thérapeutique dans les CBNPC mutés EGFR. La co-inhibition EGFR-TBK1 potentialise l'effet des ITK-EGFR dans les cellules sensibles et contourne la résistance acquise dans notre modèle, passant probablement par l'inhibition des voies canoniques et non-canoniques du récepteur qu'implique la surexpression. Dans ce contexte, l'expression de TGM2, déjà associée à un mauvais pronostic dans différentes localisations tumorales, semble être un nouveau biomarqueur d'une résistance acquise aux ITK-EGFR passant par cette voie de signalisation. La pertinence et l'importance de ce nouveau biomarqueur de résistance acquise aux ITK-EGFR de première mais aussi de troisième génération devra faire l'objet d'une étude clinique.

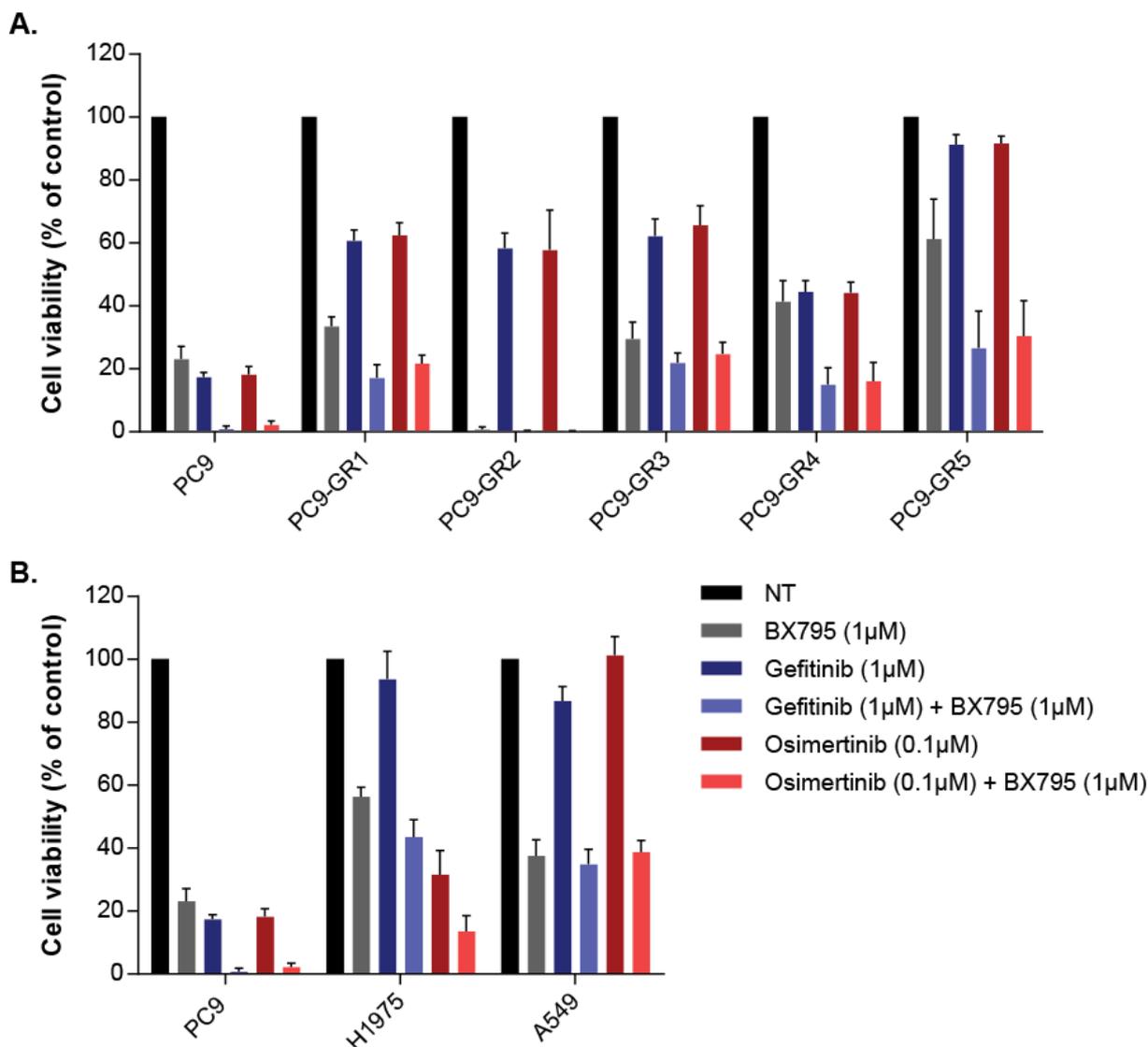


Figure 16 - Résultats complémentaires 2 : Effets de la co-inhibition EGFR-TBK1 sur d'autres lignées cellulaires.

A. Viabilité des différents lignées cellulaires présentant une résistance acquise aux ITK-EGFR générées précédemment, ainsi que la lignée parentale PC9, à l'inhibition conjointe par ITK-EGFR (Gefitinib 1µM ou Osimertinib 0.1µM) et iTBK1 (BX795 1µM) pendant 96h à l'aide d'un test MTT (n=5). **B.** Même expérience avec les lignées contrôles H1975 (mutation de résistance p.Thr790Met de l'EGFR) et A549 (non mutée EGFR), pendant 96h à l'aide d'un test MTT (n=5).

Conclusion générale de la partie 1

Dans ce chapitre, différents enjeux actuels des thérapies ciblant l'EGFR, dans les CBNPC mutés EGFR, ont été étudiés. Les études de comparaison de méthode des deux premiers articles ont pour but une amélioration de la sensibilité de détection, pour un diagnostic plus précoce et une meilleure prise en charge. L'autre axe majeur de recherche est la caractérisation des mécanismes de résistance au traitement. Dans ce troisième article, une potentielle nouvelle combinaison thérapeutique inhibant conjointement l'EGFR et TBK1 a été caractérisée. Cette association thérapeutique pourrait avoir un intérêt majeur dans les cellules présentant une addiction oncogénique à l'EGFR et être associé à la surexpression fréquente du récepteur. Ces différentes études ont également favorisé l'apparition de potentiels nouveaux biomarqueurs d'une résistance acquise au traitement : le polymorphisme p.Gln787Gln et une forte expression protéique de TGM2. Les pertes d'expression de MIER3 et UACA peuvent également être envisagés. (Figure 17) Les variants de signification inconnue caractérisés dans les cellules résistantes pourraient également être impliqués. Leur étude biologique n'étant pas réalisée, ils nous permettent cependant de faire le lien avec la partie suivante et la nécessité de la mise en place d'une méthode de caractérisation fonctionnelle des VSI.

Suite à ces différents éléments, l'importance de la voie de signalisation non-canonique de l'EGFR est à souligner. Non prise en considération lors du diagnostic et la mise en place de la thérapie, elle semble pourtant jouer un rôle déterminant de part son lien avec TBK1, la surexpression de l'EGFR et les différents polymorphismes de l'EGFR existants.

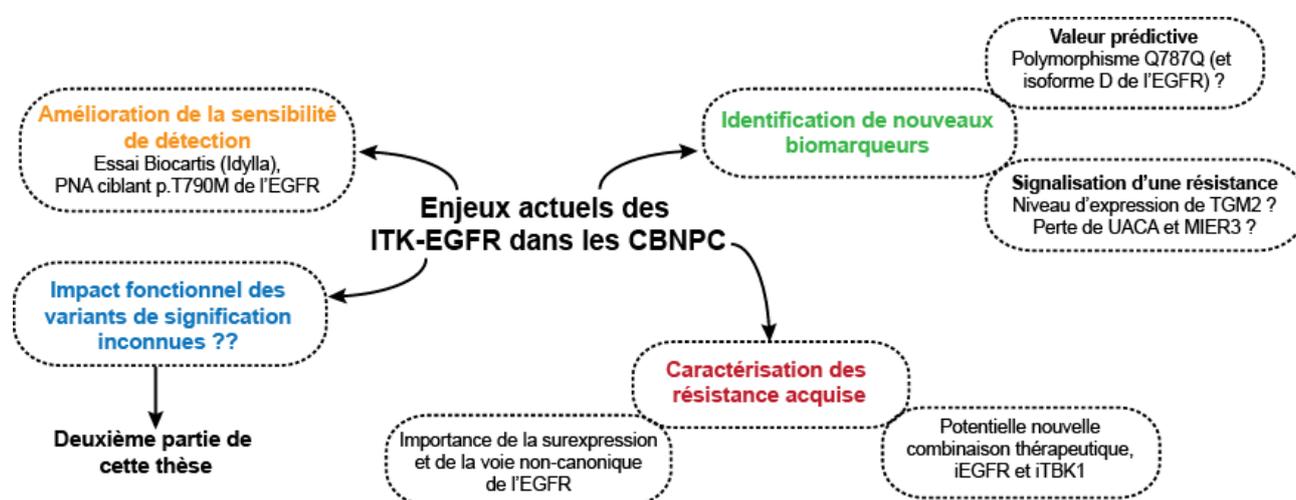


Figure 17 : Représentation graphique résumant les différents éléments abordés dans cette étude des limites des ITK-EGFR dans les CBNPC.

2. Caractérisation fonctionnelle des variants de signification inconnue de BRCA1/2 dans les cancers ovariens, vers une extension des indications thérapeutiques des iPARP.

Article 4: Somatic mRNA analysis of BRCA1 splice variants provides a direct theranostic impact on PARP inhibitors

Louise-Marie Chevalier*, Amandine Billaud*, Sabrina Fronteau, Jonathan Dauve, Anne Patsouris, Véronique Verrièle, Alain Morel

*These authors contributed equally to this work.

Soumission à Molecular Diagnosis and Therapy le 28/08/19

Numéro du manuscrit : MDTA-D-19-00247

Révisé et renvoyé à l'éditeur le 13/12/19

Louise-Marie Chevalier*^{1,2}. Amandine Billaud*^{1,2}. Sabrina Fronteau². Jonathan Dauve². Anne Patsouris².
Véronique Verrielle². Alain Morel^{1,2}

Title:

Somatic mRNA analysis of BRCA1 splice variants provides a direct theranostic impact on PARP inhibitors.

Running heading:

Pretherapeutic somatic BRCA splicing characterization from paraffin-embedded ovarian carcinomas tissues.

*Louise-Marie Chevalier and Amandine Billaud contributed equally to this work.

1 CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, Labex IGO, 49000 Angers, France

2 Institut de cancérologie de l'Ouest Paul Papin 49000 Angers

Corresponding author: Alain Morel

Alain.morel@ico.unicancer.fr

+33(0)241352717

Abstract

Background. The identification of pretherapeutic somatic BRCA variants can have considerable clinical impact given that they effect of the response to the new PARP-targeted therapy. One major issue with this type of testing is the identification of splicing variants of uncertain significance (VUS) on degraded somatic mRNA. It is therefore important to be able to quickly characterize these splice variants.

Objective. As part of PARP inhibitor targeted therapy, we have investigated a method for the direct confirmation of potential pathogenic somatic splice variants of *BRCA1* found in fixed tumor samples. Previously these VUS have commonly only been tested by *in silico* analysis.

Methods. Five BRCA1 variants affecting splicing were characterized from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) ovarian carcinoma tissues by next-generation sequencing (NGS). Three had already been functionally characterized and were used as controls. Total somatic RNA from samples was extracted, reverse-transcribed and amplified with several primer pairs encompassing the target exon. The PCR products were analyzed by capillary gel electrophoresis to assess possible changes in size due to splicing alterations. Finally, we confirmed our results by cloning, followed by Sanger sequencing, and analyzed the expression of the aberrant forms.

Results. Our molecular approach made it possible to visualize the splicing outcomes of three variants (c.5194-2A>G, c.5434C>G, c.547+1G>A) already identified and present in databases and/or identified with prediction tools (ClinVar, UMD, ARUP Utah database and HSF splices sites prediction), to confirm their exon skipping consequences, their expression in tumors and, thus, their pathogenicity. The c.4484+5G>A variant was not found in databases and was predicted to have no impact on splicing, but was found to display altered processing in tumor tissue. This variant also had a major detrimental impact on protein expression.

Conclusion. In a break from purely *in silico* approaches, we propose a simple and rapid pretherapeutic functional analysis of somatic BRCA1 variants potentially involved in splicing alterations. This approach will allow more ovarian cancer patients to benefit from new therapies targeting PARP.

Key Points

Many variants of *uncertain significance* (VUS) on BRCA1 splicing are detected by next-generation sequencing in ovarian tumors.

In silico prediction of the variant function does not always provide functional biologic proof and is a clinical issue.

Somatic mRNA analysis from FFPE sample will allow more patients to benefit from targeted therapy.

Introduction

Ovarian cancer (OC) is the seventh most common cancer and the eighth leading cause of death in women worldwide (1). Epithelial ovarian cancer (EOC) accounts for more than 90% of all OCs, and the most common histological subtype is high-grade serous (2). Patients are often diagnosed with advanced disease and are typically managed with cytoreductive surgery followed by platinum-based chemotherapy. However, most patients relapse and are further treated with additional lines of salvage chemotherapy that may increase survival but are not curative (3). Consequently, there is a rising interest in the use of targeted molecular and biologic therapies in EOC treatment, including antiangiogenic agents, signaling pathway inhibitors, immunotherapies (4,5) and poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors (PARPi). PARPi is a pharmacological inhibitor of the PARP enzymes that plays a key role in regulating several DNA repair pathways and notably single-stranded breaks (SSBs). Direct inhibition of PARP leads to accumulation of SSBs, causing the collapse of replication forks and accumulation of DNA double-strand breaks (DSB) (6). DSBs are commonly repaired by non-homologous end-joining (NHEJ) or by a homologous recombination repair system. BRCA1, BRCA2 and other homologous recombination proteins are recruited to repair DNA DSBs. Tumor cells with altered BRCA1 or BRCA2 function are markedly sensitive to PARPi due to homologous recombination deficiency (HRD). Cell death due to the simultaneous lack of function of two or more genes is the cornerstone of synthetic lethal therapies (7). Furthermore, previous treatments with platinum-based chemotherapies induce DNA damages, which are not repaired due to BRCA1/2 lack of function. Increasing genomic instability sensitizes cells to PARPi, resulting in enhanced cytotoxicity (8).

In the European Union, maintenance treatment with PARP inhibitors is approved for relapsed platinum-sensitive EOC patients presenting BRCA1/2 deficient variants. Acquired or inherited mutations in different DNA repair pathways may be found in EOC. The introduction of PARPi into clinical practice and the availability the data from trials SOLO1 (D0816C00001) and SOLO2 (D0816C00002) suggest the clinical utility of BRCA1/2 testing within a time period compatible with the beginning of targeted therapy (within a maximum of two months). Apart from BRCA1/2 inherited variants, somatic BRCA1/2 mutations occur in approximately 7% of EOC (9), and these women could also benefit from PARP inhibitors in terms of improved survival following recurrence. Therefore, genetic testing by next-generation sequencing (NGS) of somatic BRCA1/BRCA2 variants in EOC is a general practice. Unlike germline mutations, many somatic variants are reported but not annotated or not even reported in scientific publications or BRCA1/2 databases, and the assessment of their clinical impact is an important issue in theranostic expertise. Among these VUS, the functional implication of some putative BRCA1/2 splicing variants is very difficult to interpret. Whereas alteration of the canonical splice site (directed by the GU-AG rules) are well understood, in some reported cases the rules do not seem to apply, highlighting the importance of functional testing (10). Moreover, classification of exonic or intronic variants beyond these 2 bps remains difficult. These mutations could affect splicing by various means: exon skipping, intron retention, activation of cryptic splice sites or introduction of new splice sites within introns and exons. Even silent variants could have unexpectedly deleterious impacts on mRNA splicing (11). It is well known that splicing variants are largely underestimated (12), and as a consequence, many patients cannot benefit from PARPi therapy. To assess variant pathogenicity on the splicing machinery, *in silico* prediction algorithms are available, but these tools are not 100% reliable (12).

The aim of this study was to apply, within a period consistent with the implementation of PARPi, a method to determine the pathogenic potential of some BRCA1 somatic potential splicing VUS commonly tested using *in silico* prediction analysis. For this purpose, we used an experimental direct analysis of somatic messenger RNA (mRNA) extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. Reverse transcription PCR analysis revealed several aberrant transcripts resulting from splicing alterations, which were confirmed by sequencing.

Materials and Methods

2.1 Study design

Potential splice variants characterized in somatic genomic DNA (gDNA) by NGS were confirmed by Sanger sequencing and tested for pathogenicity by comparing databases and predictive bioinformatics tools. Experimental analysis of somatic mRNA was then performed to directly assess the impact of these somatic splice variants on splicing and consequently, on protein function (Figure 1A).

2.2 Tissue samples and cell lines

Tumor specimens were obtained from five patients with high-grade serous EOC assessed by an experienced histopathologist. The study was conducted on FFPE tissue samples. Hematoxylin and eosin (H&E)-stained slides were used to determine tumor cell content by area. For each sample, three 10 µm sections from FFPE blocks were used for DNA or RNA analysis. The NCI-H1975 cell line (ATCC® CRL5908™) was used for quality control at each step.

2.3 DNA and RNA extraction protocol

DNA isolation from FFPE samples was performed with the NucleoSpin® DNA FFPE XS Kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's instructions. RNA isolation from FFPE samples was performed with the RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Thermo Fisher) using the manufacturer's instructions. Both concentrations were determined using the Qubit (ThermoFisher) associated with the Quantifluor dsDNA System Kit (Promega) for DNA and the Qubit RNA HS Assay Kit (ThermoFisher) for RNA.

2.4 Next-generation sequencing (NGS) and data analysis

The first stages of NGS library preparation were carried out with the OncoPrint BRCA Assay Manual Kit (Thermo Fisher Scientific). Briefly, barcoded libraries were generated from 20 ng of DNA per sample. Two premixed pools of 265 primer pairs for entire BRCA1/2 coding regions and noncoding putative splice boundaries were used to generate the sequencing libraries. Clonal amplification of the libraries was carried out by emulsion PCR using an Ion Chef System (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. The prepared libraries were then sequenced on Ion Torrent S5 Sequencer using Ion 520&530 Kit Chef (Thermo Fisher Scientific). Variants of interest were visualized in Integrative Genomics Viewer (IGV), a high-performance visualization tool for interactive exploration of large integrated genomic datasets on standard desktop computers (13). Human Genome Variation Society (HGVS)-approved guidelines (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>) were used for BRCA1 nomenclature. The variants found by NGS were researched in the UMD-BRCA1 database (<http://www.umd.be/BRCA1/>) (14), the ClinVar database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) (15) and the BRCA Mutation Database (http://www.arup.utah.edu/database/BRCA/Home/BRCA1_landing.php).

2.5 Sanger DNA sequencing

Sanger sequencing was used to confirm the mutations characterized by NGS and to sequence complementary DNA (cDNA) cloned in pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega). Primers specific to the PCR template were designed using Primer3 and BLAST (<https://primer3plus.com/> and <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Custom DNA oligonucleotides were purchased from Eurofins Genomics (<https://www.eurofinsgenomics.eu/>). PCR using Go Taq G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega) or GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) was followed by purification with Nucleospin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey Nagel). Sequencing was performed with the dye terminator chemistry BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher) on the 3130 ABI Genetic Analyzer (ThermoFisher). The sequencing data were viewed and analyzed using Sequencing Analysis 5.3.1 software.

2.6 Reverse transcription PCR (RT-PCR) and BRCA1 cDNA characterization

Reverse transcription PCR (RT-PCR) was carried out with the SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) using 200 ng of total RNA. Specific primers were designed encompassing the exon of interest

for the evaluation of exon skipping (Figure 1B). These primers were localized on exon junctions. A subsequent PCR was performed using GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) on an Eppendorf thermocycler to obtain fragments of interest whose size were evaluated by capillary electrophoresis using the QIAxcel Advanced (Qiagen) system with the QIAxcel DNA High-Resolution Kit (1200). PCR products were separated on 3% agarose gels and visualized with a fluorescent nucleic acid dye (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium), and bands of interest were extracted by the Nucleospin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey Nagel). DNA fragments were ligated into pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega) before bacterial transformation in JM109 High-Efficiency Competent Cells (Promega). The plasmid was extracted by the NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey Nagel), and sequencing was performed with the BigDye TerminatorV1.1 Kit from ThermoFisher as described by the manufacturer.

2.7 *In silico* analysis

The Human Splice Finder (HSF) algorithm was employed for splice site prediction (16). The HSF system combines 12 different algorithms, including the Maximum Entropy Model (MaxEntScan) (17) to identify and predict the effect of variants on splicing motifs, including the acceptor and donor splice sites, the branch point and auxiliary sequences known to either enhance or repress splicing: exonic splicing enhancers (ESE) and exonic splicing silencers (ESS).

2.8 RT-qPCR analysis of BRCA1 expression

We evaluated the impact of aberrant transcripts on BRCA1 expression, by performing RT-qPCR on cDNA generated by reverse transcription, as described above. We used primers designed for specific amplification of the expected full-length transcript or the exon-skipping transcript. We thus designed two sets of primers for each mutation. Another set of primers was designed to amplify the junction between exons 2 and 3, as an internal control. The primer sequences are provided in Table 3. Analysis was performed using Sybr Green (Thermo Fisher Scientific) and the comparative Ct method ($2^{\Delta\Delta Ct}$).

Results

3.1 Patients and Tumors Characteristics

In this study, the mean age at diagnosis was 63.2 years (range 53 to 72 years). The five patients were Caucasian and had ovarian cancer. The search for somatic mutations of the BRCA1 and BRCA2 genes in our laboratory was essential for their therapeutic management, determining whether or not they were given PARP inhibitors. Tissue samples came from primary tumors or from metastatic tissue. All tumor samples received in the laboratory had sufficient tumor cellularity (> 10% tumor cells) to search for mutations. The characteristics of these tumors are summarized in Table 1. The patients selected for this study had a putative splicing VUS, and functional characterization was therefore required.

3.2 DNA analysis: BRCA1 variants, databases analysis and *in silico* prediction

A BRCA1 variant with a high allelic frequency (mean 63.3%, range 48.5 to 75.9) was demonstrated by NGS for each patient (Table 2). Mutations were visualized on IGV and confirmed by Sanger sequencing. The results presented here are those obtained from patient 4 (Figure 2A and B). The results obtained for the other patients are shown in the Supplementary figure. Primer sequences for putative pathogenic variants confirmed by Sanger sequencing are shown in Table 3. Through the collaboration with the genetics department of the *Institut de Cancérologie de l'Ouest*, we found that two out of the five mutations were germline, and two were somatic. We were unable to search for a germline mutation in one of the 5 patients (the patient died in the weeks following the search for BRCA1 and BRCA2 somatic mutations).

For interpretation of the pathogenicity of the sequenced mutations (Table 2), one variant (c.4484+5G>A, (p.?.)) was listed only in the ClinVar database with the interpretation "uncertain significance" and was absent from the other databases consulted. The other variants were classified as deleterious ("pathogenic" or "likely pathogenic") in at least one of the three databases consulted.

In silico prediction tools (HSF; Table 2) identified four of the five mutations studied as having potentially altered splicing. The c.4484+5G>A, (p.?.) variant found in sample 2 was predicted by HSF to have no likely impact on splicing.

3.3 RNA Analysis

The fragment amplified from the BRCA1 WT H1975 cell line produced the expected full-length transcript (Table 3) and was used as a positive control, together with a BRCA1 WT FFPE sample. Samples 1 (c.5194-2A>G) and 4 (c.547+1G>A) generated two fragments, corresponding to the mutated fragment and the wild-type fragment, and samples 2 (c.4484+5G>C) and 3 (c.5434C>G) yielded only the mutated amplicon. All PCR products were further characterized by Sanger sequencing to confirm the putative exon skipping (Figure 2C, D and E). The results shown are those for sample 4. The results for the other patients are presented in the Supplementary figure. Sample 5 (c.213-1G>A) did not generate any useful PCR products for further analysis. Sanger sequencing confirmed exon skipping and the presence of aberrant transcripts in the four samples analyzed (Figure 2E and Table 2).

3.4 Evaluation of splicing alteration expression by qPCR analysis

We were able to demonstrate the occurrence of alternative splicing events for these BRCA1 variants. However, we also performed RT-qPCR and compared full-length and aberrant transcripts, to assess the real impact of the variants on protein levels (Figure 3). For each patient, the results were compared to those for an FFPE sample with WT BRCA1 expression, to check the specificity of our primers. Exons 2 and 3 (RING domain) were also amplified, as an internal control. Given the large differences in BRCA1 expression between samples, results were normalized with this internal control. All primer (Table 3) efficiencies were assessed before the experiment, and ranged from 103.5 to 110.1%. As in the previous analysis, no amplicon was obtained from sample 5. For patients 1 and 4, the production of aberrant transcripts was demonstrated, but the full-length forms were more abundant (Figure 3 A and D). By contrast, patients 2 and 3 mostly produced the aberrant transcript (Figure 3B and C). These results were consistent with the results of capillary electrophoresis (Figure 2C and Supplementary figure C).

3.5 Theranostic impact and clinical utility

Following the molecular proof of BRCA1 splice alteration, patients 1 (c.5194-2A>G) and 4 (c.547+1G>A) were treated with a PARPi (olaparib) according to the recommendations (recurrent platinum-sensitive ovarian cancer with mutation). Both patients presented a relapse, after three and nine months, respectively, of maintenance treatment. Unfortunately, patient 2 (c.4484+5G>C) died a few weeks after the oncologist's request for analysis. Patient 5 (c.213-1G>A) is in remission after the first line of platinum-based chemotherapy, and is eligible for treatment should a platinum-sensitive relapse occur. Patient 3 (c.5434C>G) presented a recurrent platinum-sensitive ovarian cancer, and PARPi (olaparib) maintenance therapy was therefore initiated six months ago. The therapeutic decisions taken after screening for BRCA1 variants and patient outcomes are summarized in Table 4.

Discussion

NGS analysis of tumors currently allows the determination of somatic DNA alterations indicative of a potential response to targeted therapy and is now part of clinical treatment decisions. For high-grade serous ovarian tumors, Olaparib was the first clinically recommended PARPi used with efficacy on platinum-sensitive tumors at relapse with inactive BRCA1 or BRCA2. Germline variants of these two genes are widely documented through available databases. However, we and others observed a significant number of exclusive somatic variants frequently without annotation. In these later cases, bioinformatics analysis alone with the usual tools does not always identify a functional consequence, particularly for VUS involved in splice alteration. In the absence of molecular proof of BRCA1/2 activity loss linked to a putative somatic splice variant, the patient cannot benefit from Olaparib treatment.

To answer the functional consequence question, we used poor-quality RNA from FFPE tumors to evaluate their functional impact (Figure 1A and B). The principle is to reverse transcribe RNA from fixed tissue extract. After cDNA synthesis, BRCA1-specific PCR products were size selected to find evidence of splicing alteration. Lower fragment sizes compared to cDNA from wild-type transcripts were cloned and sequenced to provide molecular evidence of splicing aberrations. From the BRCA1 ovarian tumor somatic DNA sequences, five variants of the BRCA1 gene were identified for further study: 4 mutations located at intron-exon boundaries and one exonic mutation were experimentally characterized for their potential splicing regulatory element affectation (18). We then analyzed the expression of the forms with aberrant splicing, to determine whether they really had a detrimental effect on protein production. However, our FFPE samples also contained WT cells due to tumor heterogeneity, so the levels of aberrant transcripts may have been underestimated.

Mutation c.5194-2A>G was reported to be pathogenic in the databases used and in a previous study (19), and the *in silico* prediction tool favored a disturbance to splicing. Our experimental analysis of RNA extracted from FFPE tissue showed the skipping of exon 20 for this mutation, confirming the expected deleterious character and validated the method for poor-quality RNA (Supplementary figure). The production of the transcript displaying exon 20 skipping was confirmed (Figure 3A). Despite the high frequency of the mutation (75.4%), the abundance of this aberrant form was one third that of the full-length transcript.

Mutation c.547+1G>A was only reported in the ClinVar database as "likely pathogenic", and the *in silico* tool was in agreement for an alteration of splicing that we confirmed with exon 8 skipping (Figure 2A to D). However, this aberrant form seems to be minor in terms of protein production (Figure 3D).

Variant c.4484+5G>A was only reported in the ClinVar database as "uncertain significance" and the prediction tool that we used predicted no impact on splicing. We experimentally showed exon skipping in tumor RNA, and the bioinformatic interpretation was in conflict with our results. However, this functional characterization of splicing alteration had a major theranostic impact because we were able to give access to the targeted therapy using PARPi. Moreover, this variant had a major impact on protein expression, because it was overexpressed with respect to the full-length form (Figure 3B).

The intron-exon junction c.213-1G>A found in patient 5 was pathogenic in databases, and HSF evaluation predicted a splicing aberration already characterized in previous studies (19,20). However, this variant could not be confirmed by our functional testing as a consequence of poor RNA quality.

Concerning the exonic variant c.5434C>G from patient 3, our experimental analysis of mRNA from the FFPE sample confirmed that it induces a major splicing alteration, with exon 23 skipping, resulting in predicted protein termination within the second BRCT domain of BRCA1. The aberrant form was also a major event in this sample (Figure 3C). This result confirms published findings (18,19).

An analysis of patient outcomes (Table 4) revealed a correlation with the levels of the mutated transcripts. Patients 1 (c.5194-2A>G) and 4 (c.547+1G>A) both suffered relapses, after three and nine months, respectively, of PARPi maintenance treatment. Moreover, their aberrant forms seemed to have a minor impact on BRCA1 expression (Figure 3A and 3D). By contrast, patient 3 (c.5434C>G), who presented a variant with a major impact on protein expression (Figure 3C), is still on PARPi maintenance treatment.

Despite the small number of patients studied, this correlation is potentially interesting and merits a more extensive analysis.

First, we were able to demonstrate that mRNA from FFPE tumor samples could be used directly to produce biological evidence on the splicing alteration of BRCA1 and 2 transcripts. As a positive control, we verified the deleterious effect of well-documented splice mutations (c.5194-2A>G, c.547+1G>A and c.213-1G>A) in mRNA from ovarian tumor tissue FFPE slices. Furthermore, the clinical utility has also been shown for VUS or unreported variants (c.4484+5G>A and c.5434C>G). For this purpose, our results clearly indicate that a functional analysis of nonpathogenic predicted splice variants by *in silico* tools is essential to give access to PARPi. Finally, and perhaps the most important, our protocol is compatible with the delays in the management and implementation of the targeted therapy expected by clinicians in less than two months. However, we must emphasize some limiting biological parameters: variation in the quantity and quality of transcript material extracted from the FFPE tumor sample, low allelic frequency variants that could be more difficult to isolate by the cloning technique, long exons (mainly more than 250 bp) for which the FFPE RNA fragments will not allow visualization of the wild-type strand. In that event, if the splicing process is altered, we will only be able to see the shorter mutated strand. Consequently, in the case of normal splicing, we will not see any band for the patient after amplification. In this latter case, a positive control with genomic DNA from the cell line confirms that the absence of the amplicon is not due to PCR artifacts.

In a break with purely *in silico* prediction, we propose a rapid pretherapeutic functional analysis of BRCA1/2 splice site variants of unknown significance at diagnosis with a delay of far less than 2 months. Moreover, our reported data emphasized the possible use of degraded mRNA from FFPE in clinical practice to confirm a potential splice event. The analysis of splice variants directly from FFPE samples has already been reported for mutations of BRCA1 and other tumor suppressors, demonstrating the feasibility of extending our method (21). However, this article skips the cloning step; consequently, some somatic VUS with low frequencies may be missed due to the sensitivity of Sanger sequencing. Finally, investigation of BRCA1/2 putative splice variants in our laboratory follows the decision tree shown in Figure 4. This approach will allow more ovarian cancer patients to benefit from this new targeted therapy on PARP and, by extension, could be applicable to any theranostic interpretation of putative splice variants, such as the c-MET gene, in non small cell lung carcinoma.

Conflict of Interest: LMC, AB, SF, JD, AP and AM have no conflicts of interest to report

Funding: This work was supported in part by a grant from Cancéropôle Grand Ouest. Amandine Billaud is supported by a grant from Institut de Cancérologie de l'Ouest.

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
2. Seidman JD, Horkayne-Szakaly I, Haiba M, Boice CR, Kurman RJ, Ronnett BM. The histologic type and stage distribution of ovarian carcinomas of surface epithelial origin. *Int J Gynecol Pathol.* janv 2004;23(1):41-4.
3. Ledermann JA. Front-line therapy of advanced ovarian cancer: new approaches. *Ann Oncol.* 1 nov 2017;28(suppl_8):viii46-50.
4. Vetter MH, Hays JL. Use of Targeted Therapeutics in Epithelial Ovarian Cancer: A Review of Current Literature and Future Directions. *Clin Ther.* mars 2018;40(3):361-71.
5. Pujade-Lauraine E. New treatments in ovarian cancer. *Ann Oncol.* 1 nov 2017;28(suppl_8):viii57-60.
6. Reinbolt RE, Hays JL. The Role of PARP Inhibitors in the Treatment of Gynecologic Malignancies. *Front Oncol.* 1 oct 2013;3:237.
7. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt ANJ, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature.* 14 avr 2005;434(7035):917-21.
8. Calabrese CR, Almasy R, Barton S, Batey MA, Calvert AH, Canan-Koch S, et al. Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *J Natl Cancer Inst.* 7 janv 2004;96(1):56-67.
9. Chandrasekaran D, Manchanda R. Germline & somatic genetic testing in ovarian cancer patients. *BJOG.* 25 mars 2018;
10. de la Hoya M, Soukarieh O, López-Perolio I, Vega A, Walker LC, van Ierland Y, et al. Combined genetic and splicing analysis of BRCA1 c.[594-2A>C; 641A>G] highlights the relevance of naturally occurring in-frame transcripts for developing disease gene variant classification algorithms. *Hum Mol Genet.* 01 2016;25(11):2256-68.
11. Baralle D, Baralle M. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J Med Genet.* oct 2005;42(10):737-48.
12. Wappenschmidt B, Becker AA, Hauke J, Weber U, Engert S, Köhler J, et al. Analysis of 30 Putative BRCA1 Splicing Mutations in Hereditary Breast and Ovarian Cancer Families Identifies Exonic Splice Site Mutations That Escape In Silico Prediction. *PLoS One* [Internet]. 11 déc 2012;7(12). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3519833/>
13. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.* janv 2011;29(1):24-6.
14. Bérout C, Letovsky SI, Braastad CD, Caputo SM, Beaudoux O, Bignon YJ, et al. BRCA Share: A Collection of Clinical BRCA Gene Variants. *Hum Mutat.* 2016;37(12):1318-28.
15. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res.* janv 2014;42(Database issue):D980-985.
16. Desmet F-O, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* mai 2009;37(9):e67.

17. Yeo G, Burge CB. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol.* 2004;11(2-3):377-94.
18. Gaildrat P, Krieger S, Théry J-C, Killian A, Rousselin A, Berthet P, et al. The BRCA1 c.5434C->G (p.Pro1812Ala) variant induces a deleterious exon 23 skipping by affecting exonic splicing regulatory elements. *J Med Genet.* juin 2010;47(6):398-403.
19. Findlay GM, Daza RM, Martin B, Zhang MD, Leith AP, Gasperini M, et al. Accurate classification of BRCA1 variants with saturation genome editing. *Nature.* 2018;562(7726):217-22.
20. Steffensen AY, Dandanell M, Jønson L, Ejlertsen B, Gerdes A-M, Nielsen FC, et al. Functional characterization of BRCA1 gene variants by mini-gene splicing assay. *Eur J Hum Genet.* dec 2014;22(12):1362-8.
21. Jansen AM, van der Klift HM, Roos MA, van Eendenburg JD, Tops CM, Wijnen JT, et al. RNA analysis of cancer predisposing genes in formalin-fixed paraffin-embedded tissue determines aberrant splicing. *Eur J Hum Genet.* 2018;26(8):1143-50.

Tables

Table 1: Baseline tumor characteristics

Sample	1	2	3	4	5
Age at diagnosis (years)	53	66	68	72	57
Tumor histology	high-grade <i>serous ovarian carcinoma</i>	high-grade <i>serous ovarian carcinoma</i>	high-grade <i>serous ovarian carcinoma</i>	high-grade undifferentiated <i>ovarian carcinoma</i>	ovarian clear cell adenocarcinoma
Tumor type	primary	metastatic	metastatic	metastatic	primary
Tumor stage (FIGO)	IIIc	IV	unknown	IIIc	-
Tumor contents	80%	60%	30%	60%	70%
Tumor fragment type	surgical sample	biopsy	biopsy	biopsy	surgical sample

Table 2: Results of BRCA1 analysis

Sample	1	2	3	4	5
[ADN] (µg/mL)	38.8	2.3	7.4	8.2	9.9
Mutation	c.5194-2A>G	c.4484+5G>A	c.5434C>G	c.547+1G>A	c.213-1G>A
AA change	p.?	p.?	p.Pro1812Ala	p.?	p.?
Exon	20	14	23	8	6
Allele frequency (%)	75.7	64.5	75.9	48.5	51.9
Somatic or germline	Somatic	Unknown	Germline	Somatic	Germline
ClinVar Database interpretation	Pathogenic/ Likely pathogenic	Uncertain significance	Pathogenic/ Likely pathogenic	Likely pathogenic	Pathogenic
UMD Database interpretation	Not recorded	Not recorded	Class 5 - Causal	Not recorded	Class 5 - Causal
ARUP Utah Database interpretation	Class 5 - Definitely pathogenic	Not recorded	Not recorded	Not recorded	Class 5 - Definitely pathogenic
HSF Splice sites prediction	Alteration of the WT acceptor site, most probably affecting splicing	Alteration of an intronic ESS site. Probably no impact on splicing	Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of splicing. Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing	Alteration of the Wild type donor site, most probably affecting splicing	Alteration of the WT acceptor site, most probably affecting splicing. Activation of an intronic cryptic acceptor site. Potential alteration of splicing
LOVD database	Pathogenic	Not recorded	Conflicting interpretations of pathogenicity	Not recorded	Pathogenic
ENIGMA database	Not recorded	Not recorded	Not recorded	Not recorded	Not recorded
RNA analysis results	Exon 20 skipping r.5194_5277del	Exon 14 skipping r.4358_4484del	Exon 23 skipping r.5415_5477del	Exon 8 skipping r.442_547del	No result
Predicted protein impact	Alteration of the BRCT2 domain	Alteration of the Coiled-coil domain	Alteration of the BRCT2 domain	Alteration of the MB2 domain (interaction with c-Myc)	No result

Table 3: PCR primer pairs used to amplify and sequence mutated BRCA1 fragments and to analyze its expression.

Mutations	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Tm (°C)	
c.5194-2A>G	AGGGGAGTGAATACAGAGT	GCCTGAATGCCTTAAATATG	55	BRCA1 mutation confirmation by Sanger sequencing
c.4484+5G>A	AAACTGGAGAAAGTATGGTGAAAAA	GGCCTTTCTGCTGACAAGTT	55	
c.5434C>G	CAAGCACCAGGTAATGAGTG	AGTGACAGTTCAGTAGTCCT	55	
c.547+1G>A	AAAGCTGCCTACCACAAATA	GGATACAACCTCAAAGACG	55	
c.213-1G>A	ACCTGTGTCAAGCTGAAAAGC	CACTGCCATCACACGGTTTA	55	
c.5194-2A>G	GGTGACCCAGTCTATTAAGAAA	GGGCCCATAGCAACAGAT	53	BRCA1 mutated fragment amplification
c.4484+5G>A	ATCCAGAACAAAGCACATCA	CAACTGTGCATGTACCACCT	55	
c.5434C>G	TACAGCTGTGTGGTGCTTCT	GTGCTACACTGTCCAACACC	55	
c.547+1G>A	CCGTGCCAAAAGACTTCTAC	TGCCTTATTAACGGTATCTTCA	53	
c.213-1G>A	GCCTTCACAGTGCCTTTATG	CGGTTTCTGTAGCCATACT	53	
Exon 2-3	TGCAGAAAATCTTAGAGTGTCCC	AAATATGTGGTACACCTTTGTGG	58	BRCA1 expression by qPCR analysis
Exon 19-20	GGGTGACCCAGTCTATTAAGAAA	CCATTGACCACATCTCCTCTGA	59	
Exon 19-21	AAAATGCTGAATGAGATCTTCA	CATTCCAGTTGATCTGTGGGC	56.5	
Exon 13-14	TCCAGAACAAAGCACATCAGA	GCCTTCTGGATTCTGGCTTAT	57.6	
Exon 13-15	GACATCAGAAAAGGTCATCC	TCCCAGAGCAACTGTGCAT	57.5	
Exon 22-23	GGAGCTTTCATCATTACCCTTGG	AGCCATTGTCCTCTGTCCAGG	61.8	
Exon 22-24	ATTCACCCTTGGCACACAAT	CACTGTCCAACACCCACTCT	58.5	
Ex7-8	AGACTTCTACAGAGTGAACCCG	ACAGTTCCAAGTTAGAGAGTTGG	59.5	
Ex7-9	CCGAAAATCCTTCCTTGAT	CTTGATCTCCCACTGCAA	56.6	

Table 4: Theranostic impact of BRCA1 mutations

Samples	Mutations	Therapeutic decisions	Patients outcomes
1	c.5194-2A>G	Eligible to PARPi	Platinum-sensitive recurrent ovarian cancer Progression after three months on PARPi (Olaparib) maintenance treatment Chemotherapy combining Gemcitabin and Bevacizumab Deceased
2	c.4484+5G>A	Eligible to PARPi	Deceased weeks after oncologist request
3	c.5434C>G	Eligible to PARPi	Platinum-sensitive recurrent ovarian cancer Maintenance treatment by PARPi (olaparib) since 6 months
4	c.547+1G>A	Eligible to PARPi	Platinum-sensitive recurrent ovarian cancer Progression after nine months on PARPi (Olaparib) maintenance treatment Chemotherapy combining Doxorubicin and Carboplatin since 2 months
5	c.213-1G>A	Eligible to PARPi	Remission after first-line chemotherapy

Figures

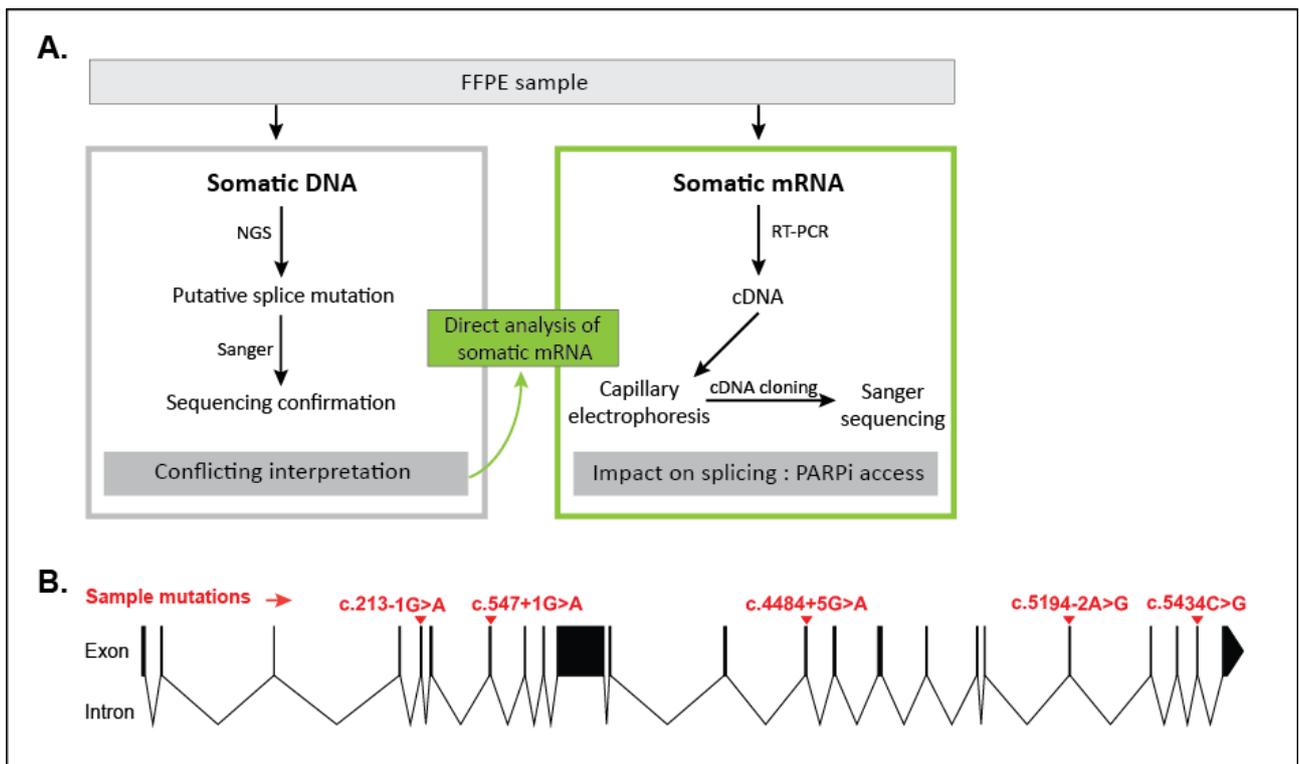


Figure 1: Workflow for splice variant assessment in this study. **A.** Evaluation of the functional impact of variants on splicing by combined somatic DNA sequencing followed by directed cDNA cloning-sequencing from mRNA isolated from FFPE samples. **B.** Exon-intron structure of the BRCA1 gene, according to <http://wormweb.org/exonintron>. The positions of the sequence variants found in each sample and evaluated here are indicated.

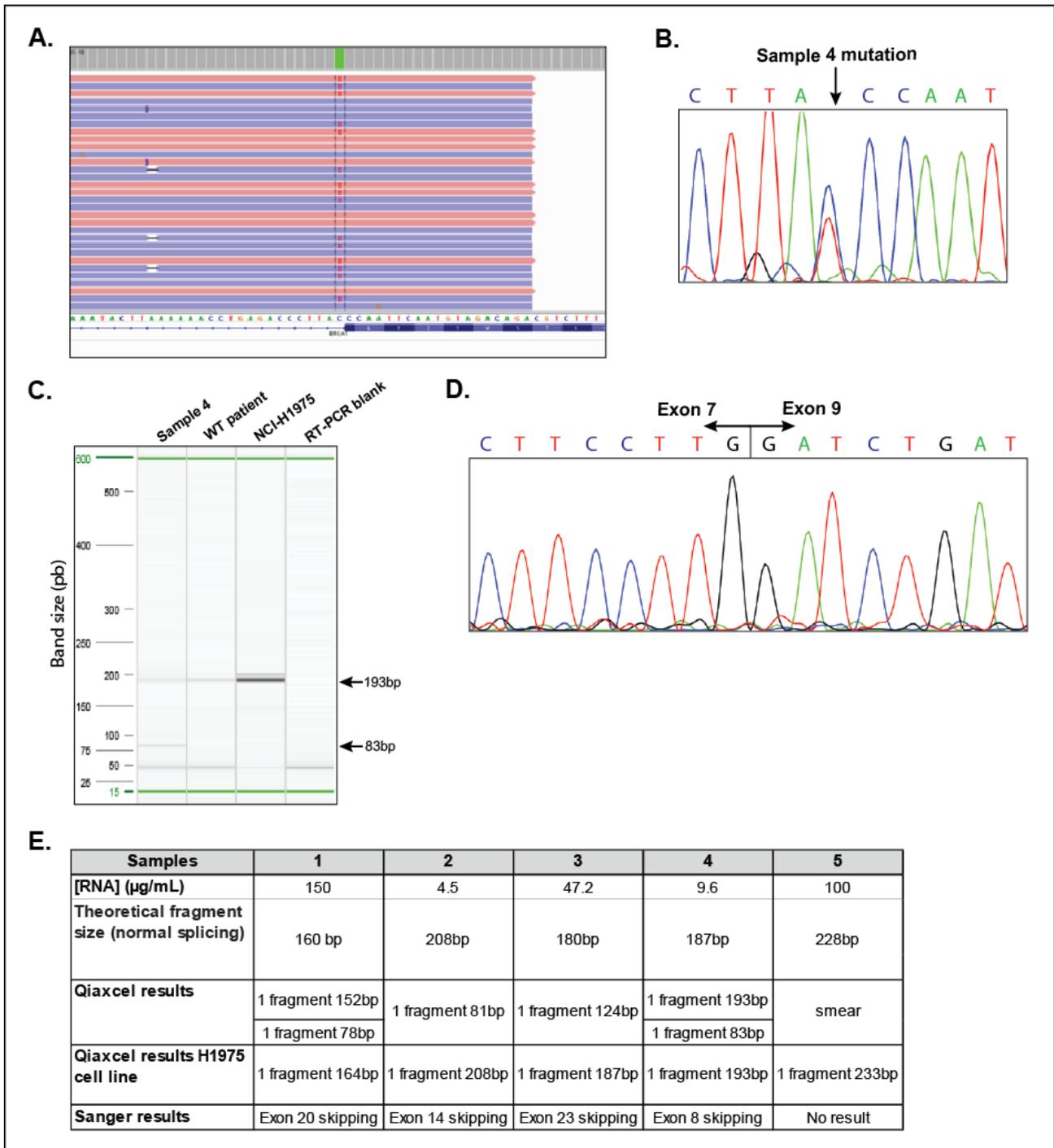


Figure 2: Analysis of the c.547+1G>A variant from Sample 4 A. The Ion Torrent data displayed in IVG from the BRCA1 variant characterization. Forward sequence reads are in red, and reverse reads are in blue. **B.** Sanger sequencing of the mutated BRCA1 amplicon for confirmation of the mutation. **C.** Analysis by capillary electrophoresis of the reverse transcription amplification product encompassing the putative skipped exon. **D.** Sanger sequencing of the 83 bp amplicon after cloning indicates the absence of exon 8. The 193 bp product corresponds to the normal splice variant of BRCA1. **E.** The table shows the results of BRCA1 mRNA characterization for the five FFPE ovarian tumors analyzed here.

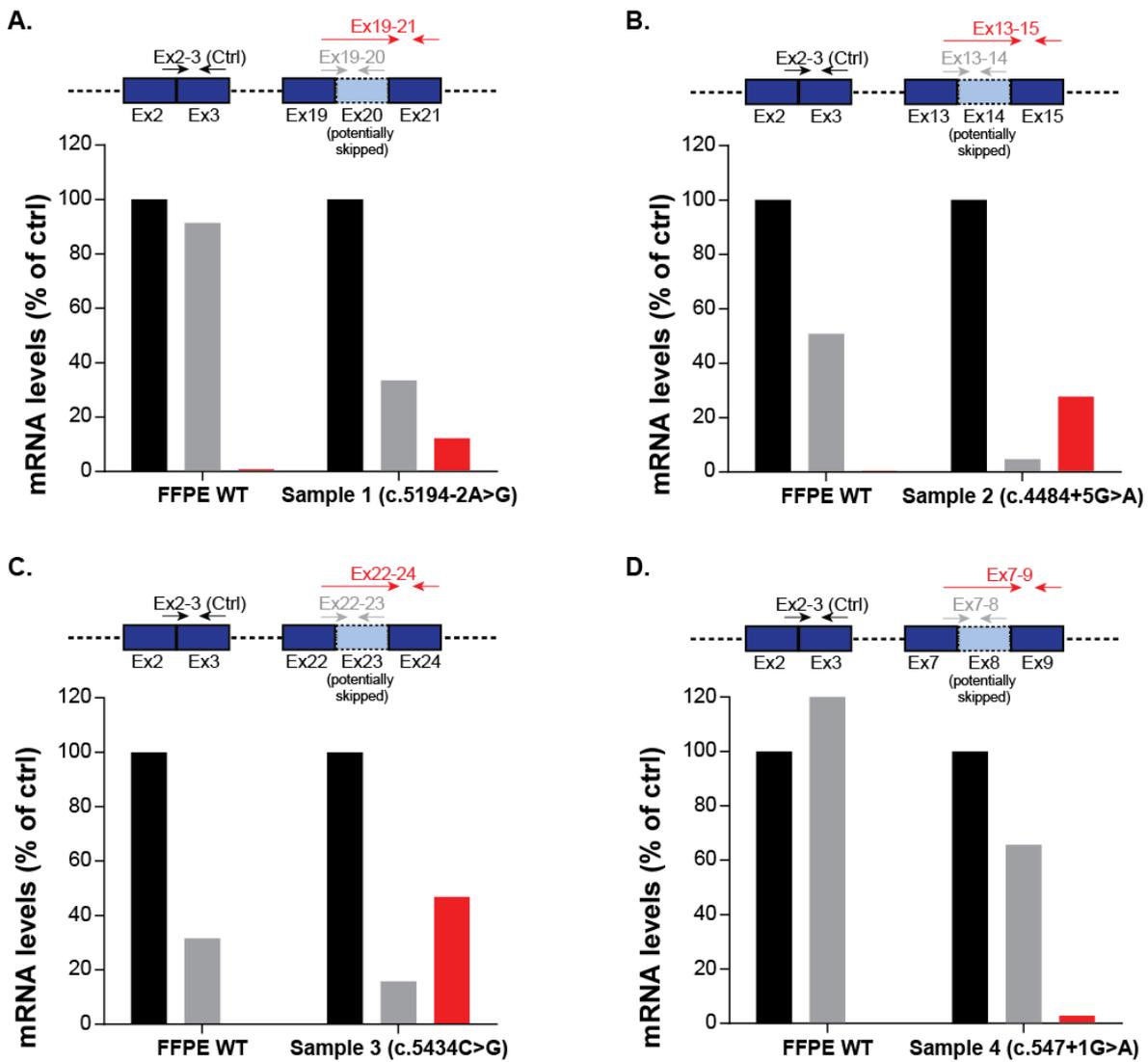


Figure 3: Analysis of aberrant transcript levels. Aberrant and full-length transcript levels were compared by RT-qPCR analysis. Another FFPE sample with WT BRCA1 expression was used to check the efficiency of the aberrant form primers. An internal control (exons 2 and 3 of BRCA1) was used to normalize all results. **A.** Sample 1, **B.** Sample 2, **C.** Sample 3, **D.** Sample 4.

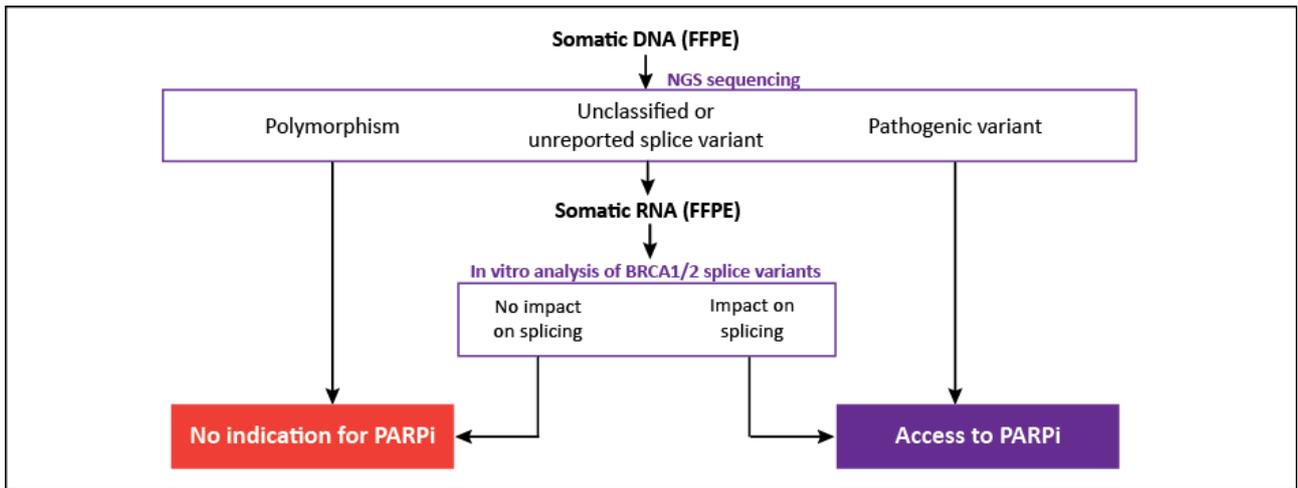
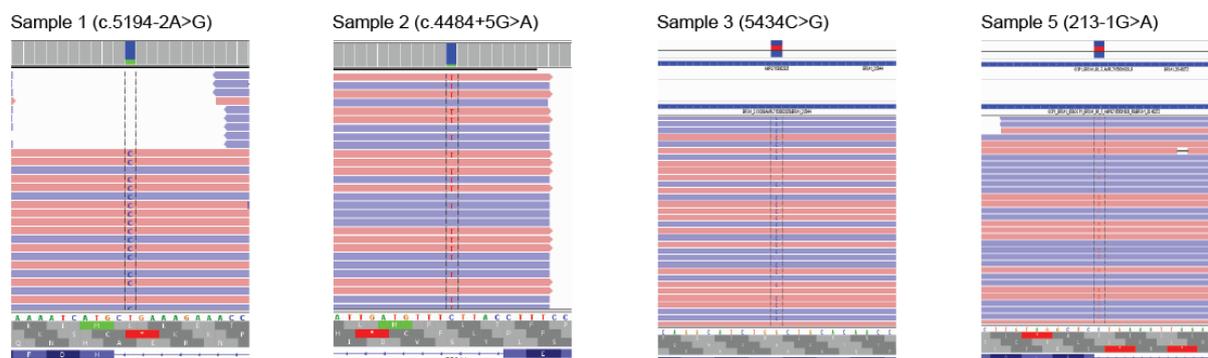


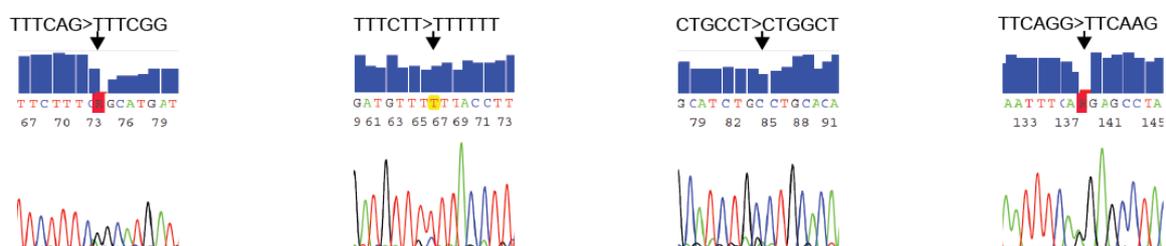
Figure 4: Decision tree

Supplementary results

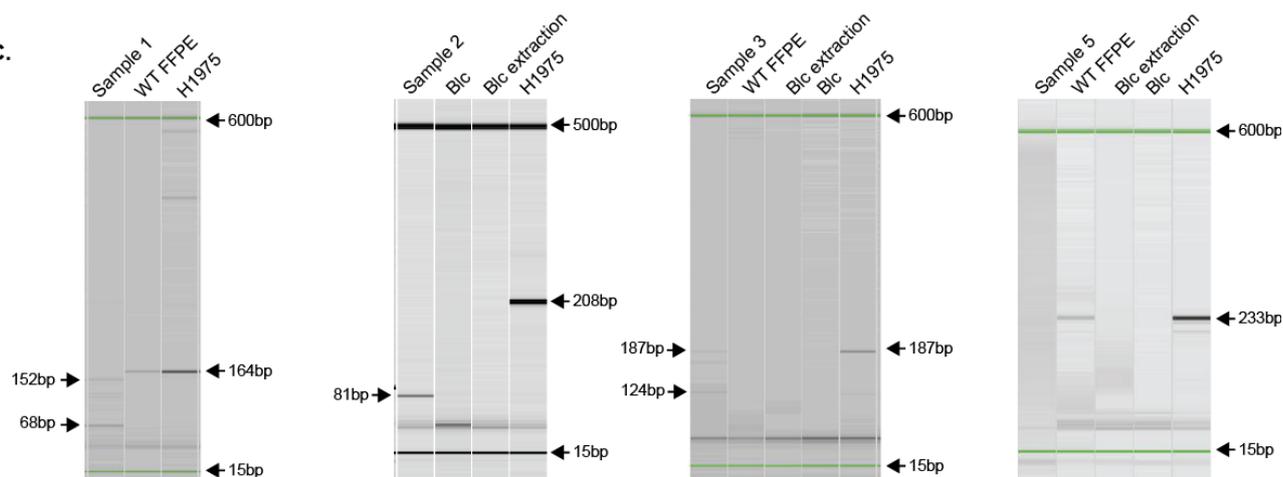
A.



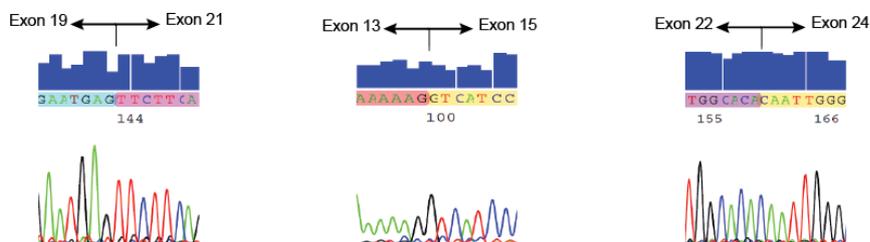
B.



C.



D.



Supplementary figure: Analysis of the c.5194-2A>G, c.4484+5G>C, c.5434C>G and c.213-1G>A variants from samples 1, 2, 3 and 5, respectively. A. The Ion Torrent data displayed in IVG from BRCA1 variant characterization. **B.** Sanger sequencing of the mutated BRCA1 amplicon for confirmation of the mutation. **C.** Capillary electrophoresis analysis of the reverse transcription-PCR product framing the putative skipped exon. **D.** Sanger sequencing of the amplicon after cloning.

2.1.1. Résultats de l'article 4

La présence de mutations de BRCA1 (ou BRCA2), qu'elles soient somatiques ou constitutionnelles, a un impact considérable sur la prise de décision thérapeutique suite à leur caractérisation dans la tumeur. En effet, des altérations pathogènes de ces gènes donnent accès aux iPARP non seulement dans les cancers de l'ovaire et du sein mais aussi prochainement dans les cancers de la prostate et du pancréas. L'identification de mutations non répertoriées ou de signification biologique inconnue est donc un réel problème, privant dans certains cas les patients d'un traitement plus efficace avec moins d'effets secondaires. L'article présenté ici traite de ces VSI de BRCA1 et de la mise en place d'une démarche expérimentale permettant de déterminer l'impact fonctionnel direct de variants affectant potentiellement l'épissage.

Grace à l'extraction de l'ARNm depuis des prélèvements FFPE, une analyse des conséquences transcriptionnelles de 5 variants à été réalisée. L'analyse par électrophorèse capillaire après transcription inverse puis amplification par PCR permet de visualiser les potentiels sauts d'exons ou rétention d'introns (Figure 2 et Supplementary result). Un clonage suivi d'un séquençage de Sanger a permis de vérifier la présence de sauts d'exons chez 4 des 5 patients (c.5194-2A>G, c.5434C>G, c.547+1G>A et c.4484+5G>A). Pour le 5ième, le matériel extrait était de trop mauvaise qualité pour être amplifiable. Cet article permet de visualiser la démarche expérimentale suivie au sein du laboratoire lors de la caractérisation de VSI pouvant affecter l'épissage (Figures 1 et 4) favorisant l'accès aux iPARP des patients dans un temps compatible avec les impératifs cliniques.

2.1.2. Discussion de l'article 4

L'implication des altérations génétiques pouvant affecter l'épissage et leurs conséquences fonctionnelles sont aujourd'hui reconnues dans différentes pathologies^{351,352}. En oncologie, la règle des sites d'épissage canonique (GU-AG) est connue, cependant elle semble ne pas s'appliquer dans tous les cas³⁵³ en raison des phénomènes d'épissages alternatifs et de compensation par l'allèle non altéré dans les cellules hétérozygotes. D'autre part, il devient difficile de déterminer les implications fonctionnelles de variants localisés au-delà de ces deux nucléotides qu'ils soient exoniques ou introniques. Sauts d'exon, rétentions d'intron, activation de sites cryptiques d'épissages ou encore création de nouveaux sites à la fois dans les introns et les exons sont autant de possibilités retrouvées dans les cellules tumorales, et ce même en présence de mutations silencieuses²⁹⁸. Les difficultés rencontrées lors de la caractérisation sont d'autant plus importantes lorsque les variants rencontrés sont somatiques. En effet, l'hétérogénéité tumorale, les pertes d'hétérozygotie ou encore les amplifications de gènes des cellules tumorales sont associés, dans les prélèvements disponibles lors du diagnostic, à la présence de cellules saines atténuant la fréquence mutationnelle. Il est donc impossible de savoir si la mutation dans les cellules tumorales est homozygote, hétérozygote ou encore si elle est présente dans l'ensemble des cellules cancéreuses. Ainsi, un test rapide et compatible avec la prise de décision thérapeutique directement sur l'ARNm, à partir de prélèvements FFPE pourtant dégradés, est d'un intérêt majeur.

Quatre des cinq variants analysés ont effectivement des conséquences sur l'épissage donnant accès aux iPARP. Cependant, c'est l'analyse du niveau d'expression de ces variants transcriptionnels par comparaison à celle des transcrits non mutés qui est particulièrement intéressante. Démontrant l'effet réel sur la production d'ARN et potentiellement de la protéine, cette analyse a été corrélée au devenir des patients suite à l'administration thérapeutique des inhibiteurs de PARP (Figure 3 et Table 4). Les patients présentant les mutations somatiques c.5194-2A>G et c.547+1G>A, dont les impacts transcriptionnels semblaient mineurs (Figure 3A et 3D), ont en effet rechutés après respectivement 3 et 9 mois de traitement. Au contraire, le variant germlinal c.5434C>G avait un impact majeur sur le niveau transcriptionnel, l'expression du transcrit muté étant supérieure à celle du variant non muté (Figure 3C). Or, ce patient est aujourd'hui toujours sous inhibiteur de PARP depuis plus de 6 mois.

L'analyse par RT-qPCR du niveau d'expression des transcrits mutés et sa possible corrélation au devenir des patients après traitement sous inhibiteurs de PARP dans une cohorte plus importante pourrait être très intéressante. Elle pourrait possiblement expliquer la plus ou moins grande sensibilité des patients à ces thérapies ciblées malgré la caractérisation de variants reconnues et classifiés comme pathogéniques. En effet, les effets de compensation liés à la présence d'un allèle non muté, les multiples transcrits de BRCA1 ou encore l'existence de ce variant uniquement dans certaines cellules tumorales ont un impact sur la sensibilité de la tumeur au traitement. D'autre part, le devenir de ces patients est également corrélé au statut germlinal ou somatique de la mutation, la sensibilité aux iPARP des variants somatiques paraissant inférieure.

La méthode de caractérisation fonctionnelle des variants affectant l'épissage de BRCA1 présentée dans cet article peut être étendue. Les variants de c-MET retrouvés dans les CBNPC, déjà mentionnés précédemment, en sont un exemple. Cependant, les VSI altérant potentiellement l'épissage sont loin d'être les seuls existants et de nombreux variants non classifiés sont répertoriés dans les bases de données. La mise en place d'une méthode permettant leur caractérisation fonctionnelle par édition génomique a donc été un axe majeur de ces travaux de thèse.

Article 5: Clinically applicable classification of unclassified variants from essential tumor suppressor genes by CRISPR-Cas9 genome editing

Amandine Billaud, Louise-Marie Chevalier, Mario Campone, Alain Morel

Soumission à Nature Communications le 7/01/20

Numéro du manuscrit : NCOMMS-20-00810

Brevet en cours de rédaction

2.1.3. Résultats complémentaires

La génération d'une méthodologie permettant la caractérisation fonctionnelle des VSI de BRCA1 ou BRCA2 a nécessité dans un premier temps la mise au point du protocole d'édition génomique au sein du laboratoire. Des KO de BRCA1 ont donc d'abord été réalisés, à l'aide d'une Cas9 protéique et d'un tracrRNA couplé à un marqueur fluorescent permettant une sélection des cellules dont l'efficacité de transfection est la plus importante. A l'issue du séquençage de Sanger, réalisé afin de cribler les clones obtenus par dilution limite, 95% étaient effectivement édités au niveau de la région de BRCA1 ciblée, dont 37% de manière homozygote (Résultat complémentaire 3A et B). Certains ne présentaient cependant pas de décalage du cadre de lecture. A l'issue de cette analyse, les clones KO-2 et KO-4 ont été sélectionnés afin de réaliser une étude fonctionnelle. Par comparaison à la lignée parentale MCF10A, ces clones KO BRCA1 présentent, comme attendus, une augmentation de la sensibilité à l'Olaparib (iPARP) liée à une augmentation des cassures doubles brins de l'ADN puis l'accumulation d'insertions/délétions par inhibition conjointe des voies de réparation BER et RH et une utilisation de la NHEJ pour compenser (Résultats complémentaires 3C, 3D, 3E et 3F). D'autre part, l'analyse du cycle cellulaire des cellules KO sous iPARP révèle des différences significatives : une diminution importante de la phase S ainsi qu'une augmentation conséquente de la fréquence de cellules polyploïdes (Résultats complémentaires 3G). Cette analyse a permis la détermination des expériences pouvant démontrer la sensibilité aux iPARP de variants de BRCA1. L'étape suivante a donc été l'édition d'une mutation ponctuelle, p.Glu1586X, caractérisée au sein du laboratoire et non répertoriée.

Le même protocole d'édition a été suivi mais avec l'ajout d'un oligonucléotide porteur de la mutation d'intérêt et facilitant la réparation lors de la transfection. A l'issue du crible d'une vingtaine de clones, seuls 35% étaient édités mais majoritairement délétés. 15% de ces clones présentaient effectivement la mutation p.Gln1586X de BRCA1, cependant tous étaient hétérozygotes (Résultats complémentaires 4A et 4B). Les clones Q1586X-9 et Q1586X-20, tous deux hétérozygotes, ainsi que le clone non muté Q1586X-5 ont été sélectionnés pour l'étude fonctionnelle. A nouveau, une plus grande sensibilité au traitement a été observée. Mais les différences entre les conditions au niveau de la viabilité cellulaire, de la clonogénicité ou encore de l'intensité de fluorescence de p-H2AX étaient fortement diminuées et ce malgré une augmentation de la concentration en Olaparib administrée (Résultats complémentaires 4C, 4D et 4E). D'autre part, l'analyse du cycle cellulaire de ces différents clones sous pression thérapeutique n'a pas permis de constater de réelles divergences, mis à part une légère diminution de cellules en phase S et une augmentation minime de celles en phase G2 (Résultats complémentaires 4F).

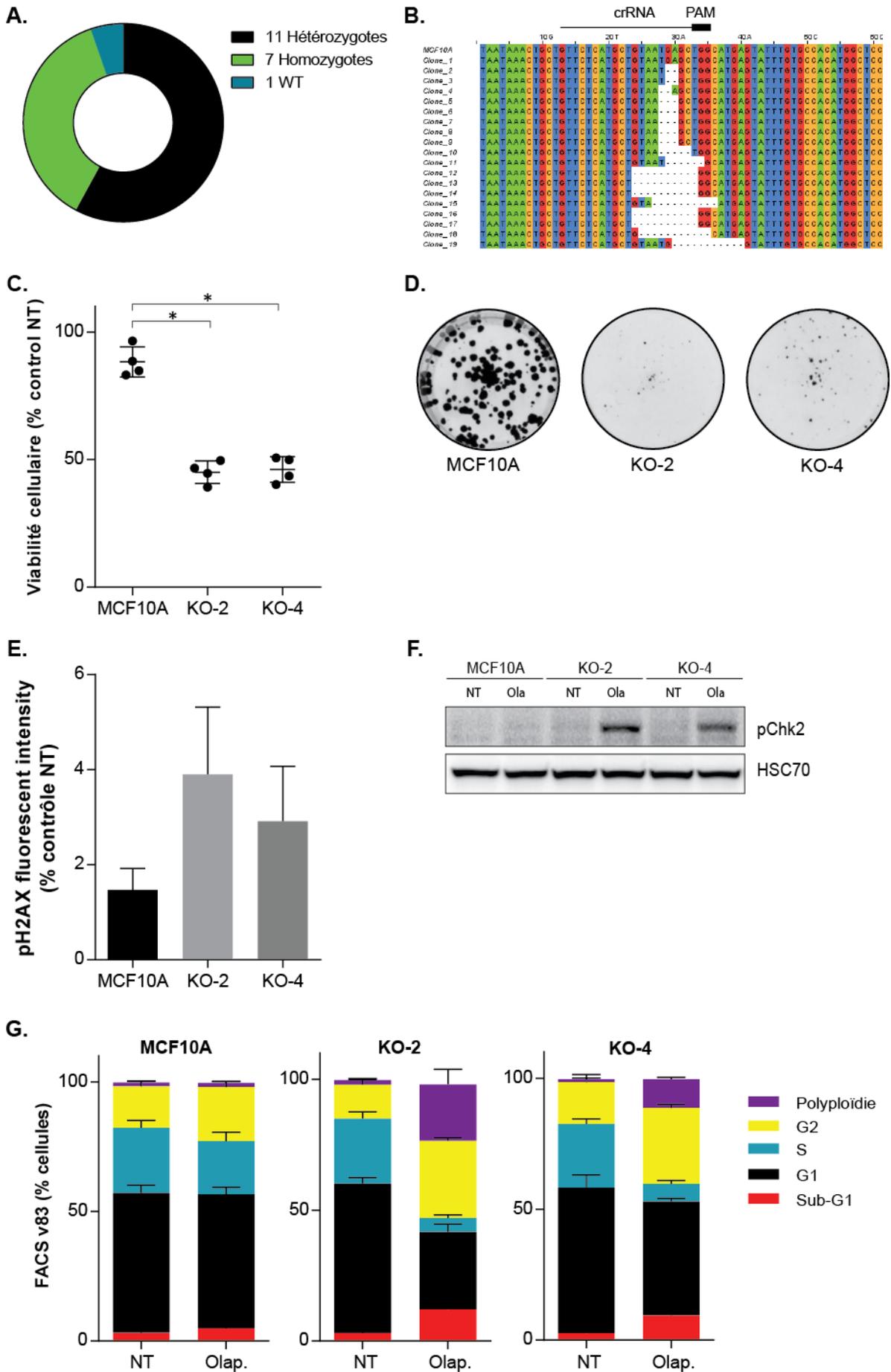


Figure 18 - Résultats complémentaires 3 : Sensibilité des cellules MCF10A KO BRCA1 à l'Olaparib.

A. Résultats obtenus à l'issue de l'analyse génomique par séquençage de Sanger des clones édités dans le but d'obtenir des cellules KO BRCA1 dans la lignée MCF10A. **B.** Alignement des séquences de ces clones obtenues à l'aide d'un séquençage de Sanger. **C.** Proportions de cellules vivantes après traitement (1 μ M Olaparib) ou non pendant 96h, à l'aide d'un test MTT, normalisation par rapport aux conditions non traitées (n=4, Kolmogorov-Smirnov). **D.** Images obtenues après réalisation d'un test de clonogénicité, en présence continue d'Olaparib (1 μ M) pendant 12 jours puis coloration au crystal violet (n=4). **E.** Intensité de fluorescence de pH2AX obtenue par cytométrie de flux après traitement à l'Olaparib à 2 μ M pendant 96h (n=5), normalisation par rapport aux conditions non traitées respectives en tenant compte des variations d'Ig. **F.** Western blot montrant le niveau d'expression protéique dans les différents clones KO BRCA1 ainsi que la lignée parentale MCF10A de p-Chk2 après traitement ou non à 2 μ M d'Olaparib pendant 72h (n=3). **G.** Proportion de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire des cellules traitées (3 μ M Olaparib) ou non pendant 96h, après marquage de l'ADN par la technique de Vindelov 83 en cytométrie de flux.

L'ensemble des résultats obtenus concernant la sensibilité des cellules hétérozygotes portant le variant p.Gln1586X de BRCA1 démontrent bien une augmentation de la sensibilité à l'Olaparib de ces cellules. Cependant, les différences observées ne sont pas aussi importantes que celles constatées en présence de cellules KO pour ce gène. Il s'agit pourtant ici de l'édition d'un codon stop, l'analyse fonctionnelle de mutations entraînant des changements d'acides aminés pourraient donc se révéler encore plus délicate. L'étude de cellules éditées de façon homozygotes serait plus discriminante, cependant cette méthodologie n'a par permis d'en générer malgré le crible d'un nombre important de clones. L'utilisation de cellules haploïdes nous a donc semblée tout à fait appropriée. D'autre part, la sélection clonale réalisée par dilution limite présente plusieurs inconvénients majeurs. Le temps nécessaire à sa réalisation est le premier d'entre eux. En effet, plusieurs semaines sont indispensables à leur prolifération puis séquençage auxquels le temps requis pour l'étude fonctionnelle doit être ajouté. Nous sommes alors au-delà des 6 semaines ce qui paraît particulièrement compromettant en termes de compatibilité clinique. D'autre part, cette sélection clonale va conduire à l'isolement de cellules aux vitesses de prolifération pouvant être quelque peu différentes. Cela s'avère problématique lorsque l'objectif est l'étude d'un traitement dont l'efficacité dépend de l'accumulation des dommages de l'ADN au cours des réplifications successives des cellules. Enfin, les potentiels effets hors cibles peuvent se révéler conflictuels si l'on étudie un seul clone, il convient donc d'en étudier plusieurs simultanément ce qui peut devenir conséquents lors d'une analyse fonctionnelle en pratique routine. L'ensemble de ces éléments ont déterminé le choix d'une évolution de notre protocole vers une édition de cellules haploïdes dans lesquels BRCA1 est un gène essentiel, présenté dans l'article suivant.

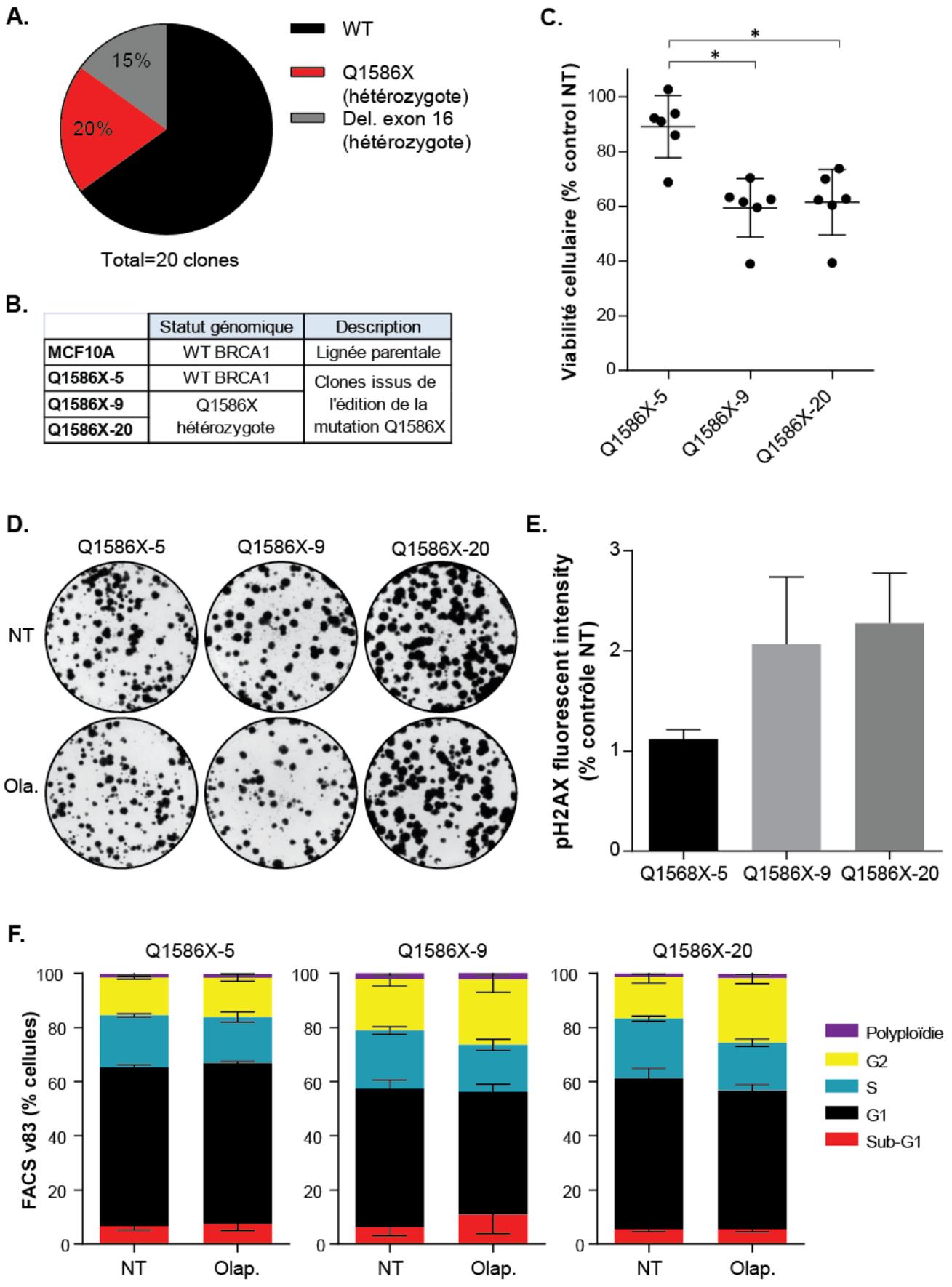


Figure 19 - Résultats complémentaires 4 : Sensibilité à l'Olaparib des clones hétérozygotes p.Gln1586X de BRCA1.

A. Histogramme résumant les résultats obtenus à l'issue de l'analyse génomique par NGS des clones édités par la mutation p.Gln1586X de BRCA1. **B.** Tableau résumant le profil génomique des différentes lignées cellulaires utilisées. **C.** Proportions de cellules vivantes après traitement (3 μ M Olaparib) ou non pendant 96h, à l'aide d'un test MTT, normalisation par rapport aux conditions non traitées (n=6, Kolmogorov-Smirnov). **D.** Images obtenues après réalisation d'un test de clonogénicité, en présence continue d'Olaparib (1 μ M) pendant 12 jours puis coloration au crystal violet (n=4). **E.** Intensité de fluorescence de pH2AX obtenue par cytométrie de flux après traitement à l'Olaparib à 2 μ M pendant 96h (n=5), normalisation par rapport aux conditions non traitées respectives en tenant compte des variations d'Ig. **F.** Proportion de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire des cellules traitées (3 μ M Olaparib) ou non pendant 96h, après marquage de l'ADN par la technique de Vindelov 83 en cytométrie de flux.

Clinically applicable classification of unclassified variants from essential tumor suppressor genes by CRISPR-Cas9 genome editing

Authors: Amandine Billaud^{1,2}, Louise-Marie Chevalier^{1,2}, Mario Campone², Alain Morel^{*1,2}

¹ CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, Labex IGO, 49000 Angers, France

² Institut de cancérologie de l'Ouest Paul Papin, 49000 Angers

*Corresponding author: alain.morel@ico.unicancer.fr, +33(0)241352717

Running title: VUS functional testing by CRISPR-Cas9 genome editing

Keywords: VUS, genome editing, functional testing, BRCA1/2, POLE

Abstract

Targeted therapies are promising but variants of uncertain significance (VUS) limit their use for clinical management and necessitate functional testing *in vitro*. Using *BRCA1* and *BRCA2* variants and *POLE* mutations, we developed a rapid functional assay based on CRISPR-Cas9 genome editing. We first evaluated the function scores of 26 *BRCA1* variants and seven *BRCA2* variants. For the 23 variants that were unclassified or for which conflicting interpretations had been reported, we found evidence of a neutral impact for 15, and six were classified as pathogenic. Finally, we extended our study to seven *POLE* variants. Our new rapid functional assay can be used to characterize the functional implication of *BRCA1* and *BRCA2* mutations, giving patients whose mutations were evaluated as pathogenic access to PARP inhibitors treatment. This method could potentially be extended to the classification of VUS from all essential tumor suppressor genes, and can be performed within a timeframe compatible with clinical applications, thereby having a direct theranostic impact.

Acknowledgments: We thank J. Dauve and A. Renoult for their help with NGS sequencing analysis. This work was supported in part by a grant from Cancéropôle Grand Ouest. Amandine Billaud is supported by a grant from Institut de Cancérologie de l'Ouest.

Author contributions: A.B, L-M.C. and A.M. conceived the project. A.B. and A.M. designed the experiments. A.B. performed experiments and A.B., L-M.C. and A.M. performed analysis. A.B., L-M.C., M.C. and A.M. wrote the manuscript.

Introduction

Over the last two decades, the therapeutic options available in oncology have evolved towards therapies targeted on the basis of tumoral genetic information¹. These new treatments improve patient outcomes and have fewer adverse effects. However, the functional significance of many variants of targetable genes remains unknown. In the Clinvar database, 237 934 variants of uncertain significance (VUS) are registered for the total set of genes considered. Most are missense mutations and potential splice site variants. With recent technical improvements and the development of whole-exome and whole-genome sequencing, this number of VUS is likely to rise still further in the coming years², with one in three variants classified as VUS overall, and 80% located on tumor suppressor genes³. As VUS affect treatment options and patient management, this trend highlights the need for a method of functional testing.

Mutations of the *BRCA1* and *BRCA2* genes can be used to illustrate this problem. These two tumor suppressor genes have many roles, mostly in genome protection via the homologous recombination (HR) pathway⁴⁻⁶. Inheritable mutations of *BRCA1/2* increase the risk of breast cancer (50-80%) and ovarian cancer (40-60%)^{7,8}, and have also been implicated in prostatic and pancreatic cancers. With the development of PARP inhibitors, pathogenic mutations of these genes are now biomarkers of response to these treatments^{9,10}. Their multiple interaction domains and protein partners account for the tremendous diversity of variants found in tumors. More than 2660 *BRCA1* and 4840 *BRCA2* VUS are registered in Clinvar, which includes 35.7% and 45.7% of the total known variants of *BRCA1* and *BRCA2* respectively. However, databases, such as Clinvar, BRCA exchange and UMD, mostly contain constitutive variants. Somatic variants, which may be detected in only one or two individuals, also exist and many such variants remain unreported. Functional testing *in vitro* is currently based on transcriptional activation^{11,12}, HR activity^{13,14} and splicing^{15,16}. However, such tests are not necessarily compatible with clinical management in terms of the time taken to obtain results to guide treatment.

CRISPR-Cas9 genome editing is a promising tool for meeting the challenge of VUS classification¹⁷⁻¹⁹. Here, we adapted the concept developed in *BRCA1* variant characterization by saturation genome editing^{20,21} to the study of precise variants detected in our clinical testing laboratory. By comparing editing frequencies, by NGS sequencing, between a variant of interest and a silencing mutation classified as benign, we were able to evaluate the functional consequences of 33 mutations of *BRCA1/2*, including 23 VUS. We then extended our method to the evaluation of seven variants of *POLE*, another tumor suppressor gene biomarker for immunotherapy administration, demonstrating the utility of this approach for characterization mutations of essential tumor suppressor genes in general. The essentiality of the *BRCA1*, *BRCA2* and *POLE* genes in our haploid model^{21,22} was a key feature, making it possible to evaluate function rapidly, within three weeks, compatible with direct clinical application.

Methods

HAP1 cell culture

Wild-type haploid HAP1 cells were purchased from Horizon Discovery and cultured in Isocove's DMEM (IMDM) containing L-glutamine and 25mM HEPES (Corning), supplemented with 10% fetal calf serum (Eurobio). Cells were grown at 37°C, under an atmosphere containing 5% CO₂ and were passaged before confluence, to prevent reversion to the diploid state. We checked that the HAP1 cells were haploid by vindelow83 and FACS analyse before their use.

Genetically engineered HAP1 cells

Polyclonal LIG4 knock-out cells were generated with CRISPR-Cas9 technology²³. A guide RNA (gRNA) was first designed to target the second exon with an *AflIII* restriction site three nucleotides upstream from the PAM sequence. An Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA (IDT DNA) (5'-CAATTACACAGTACGTGTCT-3') and an Alt-R CRISPR-Cas9 tracrRNA with an ATTO550 fluorescent dye (IDT DNA) were complexed at a final concentration of 1µM with 6pmol of Alt-R S.p. Hifi Cas9 Nuclease V3 (IDT DNA) in presence of Lipofectamine CRISPRMAX Cas9 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific). The mixture was incubated for 20 minutes, and reverse transfection was then performed by adding RNA-Cas9 ribonucleoprotein complexes to 1.6x10⁵ cells. Four hours after transfection, cells were sorted by FACS on the basis of ATTO550 fluorescence. Only the 20% of cells with the highest level of fluorescence were retained and used to seed with IMDM supplemented with 1% penicillin-streptomycin (Gibco). The cells were incubated for five days, and then subjected to limiting dilution. About 20 clones were amplified for DNA extraction with Chelex 100 Resin (Biorad). We used 10µL of these DNA extract for PCR amplification (forward primer: 5'-CTGGAGAACAGAATTGCAGA-3'; reverse primer: 5'-TAGCAATCATATTCACGGGC-3') followed by digestion with the *AflIII* restriction enzyme (New England Biolabs) for 1h at 37°C. The mixture was then incubated for 20min at 80°C for enzyme inactivation. The clones were screened by following their migration in a 2% agarose gel on electrophoresis. Clones that had undergone genomic editing and had lost the restriction site were identified by Sanger sequencing on an ABI 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) with the BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific). Results were visualized and analyzed with Sequencing Analysis 5.3.1 software.

VUS selection and gRNA design

The first *BRCA1*, *BRCA2* and *POLE* variants to be characterized were those found in somatic DNA from patients at the *Institut de Cancérologie de l'Ouest* (ICO). They were selected for study on the basis of their status as variants of uncertain significance or unclassified variants; well-known mutations were also analyzed as controls. All variants were characterized by NGS sequencing. We then searched for about 10 variants of *BRCA1* and five of *BRCA2* for which conflicting interpretations had been reported in the databases. Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA (IDT DNA) were designed with the Alt-R Custom Cas9 crRNA design tool (IDT DNA). The PAM sequence had to be adjacent to the mutation to facilitate the editing of KO LIG4 HAP1 cells²⁴. We also selected the gRNA on the basis of the possibility of inserting a silent mutation into the PAM sequence or into the 3 to 5 nucleotides immediately upstream²⁴. This increases editing efficiency and will be used as a control in subsequent experiments. For each variant, we designed two Ultramer DNA Oligos (IDT DNA) of about 84nt. The first contained the patient's variant and the second contained a silent mutation, already reported to be benign if possible. Both contained the silent control mutation mentioned above. All the gRNA and DNA oligonucleotides designed are described in Supplementary Table 1.

Transfection of LIG4 KO HAP1 cells

For each variant, two transfections were performed simultaneously, both with the same gRNA but with different DNA oligomers (the VUS to be classified in one transfection or the silent mutation in the other). We used the same protocol, but with 2nmol of DNA oligonucleotides added before the Lipofectamine CRISPRMAX Cas9 Transfection Reagent. A cell suspension containing 400 000 cells/mL in IMDM supplemented with 10% FBS was then prepared and Alt-R HDR Enhancer (IDT DNA) was added to a final concentration of 2nM. Reverse transfection was then performed. On day 1 post-transfection, the medium was replaced with fresh IMDM supplemented with 10% FBS. On day 4 to 5, depending on the degree of confluence, the cells were released by trypsin treatment and used to seed 6 cm-diameter plates. Two days after plating, a second transfection was performed with the same protocol for both types of transfection,

to enrich the cells preparation in edited cells. The cells were then incubated for a further four to five days before DNA extraction.

DNA extraction and NGS sequencing

All gDNA were extracted from edited cells with the Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit (Promega) and quantified using a Qubit (Thermo Fisher Scientific) and the Quantifluor dsDNA System Kit (Promega). We then used 20ng of the extracted DNA to generate the NGS library. The libraries were prepared with the Oncomine BRCA Assay Manual Kit or Ion Ampliseq POLE (Thermo Fisher Scientific), allowing amplification of the entire *BRCA1* and *BRCA2* or *POLE* coding regions and noncoding putative splice boundaries. Samples were barcoded and the libraries were subjected to clonal amplification by PCR emulsion with an Ion Chef System (Thermo Fisher Scientific). The prepared libraries were then sequenced on an Ion Torrent S5 Sequencer with the Ion 520 and 530 Chef Kit (Thermo Fisher Scientific). Variants of interest were visualized with Integrative Genomics Viewer (IGV).

Sequencing analysis and VUS function score evaluation

Following NGS sequencing, insertions or deletions located around the expected cleavage site, in the eight nucleotides centered on the PAM sequence or the seven nucleotides centered on the VUS, were also counted. Indel frequencies were then calculated by dividing the total amount of indels by the total number of reads. For the evaluation of SNV coverage, the ratio of the total numbers of reads for the VUS evaluated and the control SNV was calculated. Finally, function scores for all the variants studied were calculated by comparing the sequence frequencies of all the inserted variants (VUS of interest, silent control SNV and silent reference SNV) and the results contained in the available databases (UMD database, Clinvar, BRCA exchange).

Statistics

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism analysis software.

Results

Generation of the polyclonal LIG4 knock-out HAP1 model

In oncology, the functional testing of variants of uncertain significance has become a major issue in the context of access to targeted therapy. We used the example of *BRCA1/2* mutations, which are of particular relevance for PARP inhibitors sensitivity, to develop a method based on the CRISPR-Cas9 tool. We first tested genome editing on diploid cells, but the efficiency of editing was low and clonal expansion, which is time consuming, was required. Moreover, most of the clones were heterozygous, with highly variable sensitivity to PARP inhibitors depending on proliferation rates. We therefore adapted our method with the use of haploid HAP1 cells. We promoted DNA repair by homologous recombination after the endonuclease action of Cas9 by inhibiting the non-homologous end-joining pathway (NHEJ)²⁵ by knock-out of the *LIG4* gene.

The gRNA targeting this gene was selected according to its proximity to the *AflIII* restriction site, which is located at the Cas9 double-stranded cleavage site (Figure 1A). Briefly, cells were transfected and, 4h later, the cells with the highest level of ATTO550 fluorescence were sorted and subjected to clonal expansion (Figure 1B). DNA extraction and the PCR amplification of these clones were associated with *AflIII* digestion. The clones that had lost the restriction site were assumed to have undergone editing and were subjected to Sanger sequencing (Figure 1C). All six of the clones sequenced had been edited, but only three also presented a frameshift (Figure 1D and 1E). We pooled 5, 8 and 17 to constitute the polyclonal LIG4 knock-out HAP1 cell line, to prevent side effects and putative off-target effects associated with clonal selection.

A comparison of editing frequencies between *BRCA1/2* variants and silent control SNV can be used for functional classification

In HAP1 cells, *BRCA1* and *BRCA2* are essential genes^{21,22}. Genomic editing to create a pathogenic mutation of these genes thus leads to cell death, facilitating the screening of edited cells. Moreover, edited cells with insertions or deletions instead of the mutation of interest also die, due to the essential nature of the gene concerned. We checked that the absence of a mutation following NGS sequencing was due to the pathogenicity of the mutation rather than a problem linked to genomic editing, by simultaneously performing a second transfection, with the same gRNA, but the insertion of a silent mutation already classified as benign in databases where possible (Figure 2A). Thus, for each mutation, we designed one gRNA and two oligonucleotides (Figure 2B), one carrying the mutation of interest and the other carrying a silent control mutation. We also added a second silent mutation, also classified as benign where possible, located in the corresponding PAM motif or 3nt upstream from the PAM motif. This second modification had two purposes. First, its insertion prevented from re-editing blocking gRNA association²⁴. This second mutation was present in both sets of conditions, and was therefore also used as reference for comparisons. Following NGS sequencing, mutations frequencies were compared and function score was calculated (Figure 2B). In our example, the p.Pro1812Ala mutation was pathogenic. We performed two transfections in series, to maximize editing efficiency and mutation frequencies (Figure 2A).

We then tested our method by using it to characterize 10 variants of *BRCA1* and *BRCA2* already classified as benign or pathogenic in databases. We evaluated the indel frequency to estimate the editing efficiency in the two conditions compared for each mutation. Indeed, this indel frequency was identical for both conditions when analyzed for the 8nt surrounding the PAM sequence (Figure 3A) but not for the 7nt surrounding the edited mutation (patient or silent control mutation) (Figure 3B). These results confirmed published findings; the Cas9 protein cleaves the DNA 3nt upstream from the PAM sequence. Moreover, the observed linear regression made it possible to evaluate genomic editing efficiency and to compare the two conditions with the same gRNA. Following NGS sequencing, the coverage of the mutation of interest (patient or silent control) and the reference control mutation was also checked and shown to be similar in the two conditions (Figure 3C). Finally, function scores were calculated from sequence frequencies (Figure 3D). The significant differences observed between benign and pathogenic mutations validated the use of this method to characterize the function of variants of uncertain significance for the *BRCA1* and *BRCA2* genes.

Functional characterization of *BRCA1/2* variants of unknown significance

Variants of *BRCA1* and *BRCA2* were initially selected after characterization in our laboratory, on the basis of an absence of annotation concerning their function. We then also studied other mutations classified as VUS in the databases (Table 1). The 20 *BRCA1* and 3 *BRCA2* variants affected different domains of the proteins and were distributed along the entire length of these genes (Figure 4A and 4B). All reference silent mutations, silent control variants and their classifications in databases are listed in Supplementary Table 2. For each mutation, we checked the coverage (Figure 4C) and indel frequencies (Figure 4D) for the variant of interest and the control. All function scores were then calculated from NGS frequencies (Figure 4E and Table 1), and the variants were classified according to their impact on cell survival and, consequently, their pathogenicity. Most of the VUS analyzed were neutral (about 65.2%), but six were found to be pathogenic. Another two variants (c.3238T>C and c.5194-2A>G) had intermediate function scores.

Extension of the experimental process to the functional evaluation of *POLE* variants

We then extended our protocol to the characterization of VUS from other tumor suppressor genes that were also essential in our model. We chose to study variants of the *POLE* gene because of potential interest of their functional impact for determining access to immunotherapy. We therefore selected seven *POLE* mutations from databases, included two classified as benign and two classified as pathogenic (Figure 5B). The same protocol was followed to evaluate their function scores, and the results obtained were compared with published findings (Figure 5A and 5B). The p.Leu424Val variant, which has been classified as pathogenic in databases, was found to have a function score of -0.031.

Discussion

The characterization of variants of uncertain significance is a major challenge in oncology. The objective of this study was to develop a clinically applicable method for evaluating the functional impact of VUS. Following on from the work of Findlay et al²¹, we decided to use haploid cells, and we adapted their observation to the characterization of single-nucleotide variants in our laboratory to obtain functional data, potentially providing access to targeted therapy in a timeframe compatible with clinical management. We compared the variant of interest and a silent control mutation, where possible classified as benign in databases, to validate the on-target efficiency of the gRNA (Figure 2A). A second silent mutation, used as a reference, was also inserted in both these situations, to make it possible to compare the efficiency of genome editing between the two sets of conditions (Figure 2B). This method requires the gene studied to be essential tumor suppressor gene in our model. We increased the efficiency of HDR after Cas9-mediated double-stranded cleavages, by genetically modified HAP1 cells and knocking out the *LIG4* gene, which has been implicated in the NHEJ pathway, to generate a polyclonal *LIG4* KO cell model (Figure 1). We then evaluated our method for characterizing *BRCA1* and *BRCA2* VUS, which have important implications for PARP inhibitors sensitivity in ovarian and breast cancers.

We first characterized about 10 variants of *BRCA1/2* that had already been classified as benign or pathogenic (Figure 3D). We then extended our study to the characterization of VUS, evaluating the function scores of 33 variants of *BRCA1/2*, including 23 unreported or of uncertain significance (Table 1 and Figure 4E). We classified 20 of these variants as neutral, six as pathogenic and two as intermediate. These results were consistent with the saturation genome editing study of the RING and BRCT domains of *BRCA1* (p.Ile31Asn, p.Ala1752Thr, p.Ala1752Pro, p.Gly1770Val and p.Pro1812Ala)²¹. Four of the six variants we classified as pathogenic concerned the BRCT domain of *BRCA1*; the other two were previously unreported nonsense mutations. The results were more surprising for the p.Gln210= variant of *BRCA1*, which was also found pathogenic. However, this silent mutation may create or strengthen a splice site according to databases. One of the two intermediate variants, c.5194-2A>G, has already been reported to affect splicing and may also be pathogenic. Its classification as functionally intermediate might reflect the existence of a large number of *BRCA1* splicing variants. The second intermediate variant, p.Leu1080=, is located in the middle of exon 11 of *BRCA1*. This synonymous variant has been reported in databases having a likelihood of resulting in a splicing alteration according to bioinformatic analyses. However, our intermediate function score is consistent with the finding of the ESE finder tool, a bioinformatic tool used to identify exonic splicing enhancers, which predicted that this variant might create an SRp40 ESE site. We cannot rule out the possibility that the cutoff used to classify the mutations might be too low, but this value could be refined further after the analysis of more *BRCA1/2* variants. Moreover, all variants were compared to silent mutations classified as non-pathogenic or as assumed to be benign. Following NGS sequencing, all these variants were indeed found to be benign (Sup. Table 2).

A three-week period to determine the functional impact of a variant is compatible with clinical management and is one of the main advantages of our protocol (Figure 2A). Moreover, no clone selection is required, thus avoiding potential off-target effects that could occurred in one cell. This genome editing-based protocol can be used to evaluate exonic, intronic and even splicing variants. The main difficulty is finding a Cas9 PAM sequence (NGG) close enough to the mutation to edit, to ensure binding of the gRNA. However, increasing numbers of Cas proteins from different species are becoming available, increasing PAM diversity²⁶. We have already tested our protocol with the Cpf1 endonuclease. Similar results were obtained for the variant studied, implying a stable function score, but editing efficiency in our hands was lower with this method. The need to improve editing efficiency may cease to be relevant with the appearance of base editing^{27,28} and, now, prime editing²⁹, which increase efficiency without the need for a double-strand break limiting off-target insertion and deletion frequencies. Moreover, prime editing will make functional characterization possible not only for point mutations, but also for insertions or deletions. We have also generalized in another polyclonal cell line, knock-out for the *XRCC4* gene, also implicated in the NHEJ pathway³⁰. The same function score was obtained for the mutations analyzed in this line, including p.Gln210= variant of *BRCA1*.

We then extended our analysis to the characterization of another essential tumor suppressor gene: *POLE*, which is important for determining access to immunotherapy. Four mutations were used as control: two

benign and two pathogenic. However, one of the pathogenic mutations (p.Leu424Val) had a function score typical of a neutral mutation. We also analyzed three *POLE* VUS (Figure 5A and B). Prediction algorithms in databases were conflicted concerning the consequences of p.Arg1826Trp variant for protein function: SIFT (deleterious) and PolyPhen-2 (probably damaging). The function score of this variant was consistent with it being a pathogenic variant. Two VUS were classified as intermediate (p.Asn363Asp and p.Asp301Gly), but the cutoff used here should be refined by the evaluation of more well-known variants. Both these intermediate variants are located in the exonuclease domain, and may therefore affect the proof-reading activity of the protein, leading to a hypermutation phenotype³¹. The amino acids Asp301 and Asn363 are highly conserved between species. Both are predicted to affect function, but no functional tests have been performed. Moreover, the replacement of Asn with Asp in position 210 greatly decreases the endonuclease activity of *POLE*³² and p.Asn363Asp variant has not been reported, but p.Asn363Lys is classified as pathogenic. The p.Asp301Gly and p.Asn363Asp variants, which had intermediate function scores, may therefore, actually be pathogenic. The principal difficulty encountered during this analysis concerned p.Leu424Val *POLE* mutation, observed in multiple individuals with either an attenuated polyposis phenotype or a history of colorectal cancer³³⁻³⁵. This mutation classified as pathogenic, is also located in the exonuclease domain. However, the function score obtained here suggested that it was more a benign mutation (Figure 5). Leucine and valine have similar properties, so this substitution is generally considered conservative. According to an article on hypermutation, the mutation of leucine in position 424 has consequences very different to those of other well-known pathogenic mutations of *POLE* (p.Pro436Ser or p.Pro286Arg)³⁶. A strong mutation phenotype was observed when this residue was replaced with a proline or an isoleucine residue, but not when it was replaced with a valine. The mutation load associated with the loss of *POLE* proof-reading activity therefore depending on the type of amino-acid change involved, potentially accounting for our function score. This finding raises the possibility that some mutations may be pathogenic only when coupled with other genomic aberrations. Alternatively, there may have been too little time before DNA extraction in our model for missense mutations to accumulate, due to the loss of exonuclease activity. The loss of some genes may require more time, despite their essentiality for highly deleterious effects on cell survival.

The method presented here was proved effective for the characterization of the functional impact of *BRCA1* and *BRCA2* VUS. More importantly, it can be used to obtain the necessary biological evidence of VUS function required for the prescription of targeted treatment within three weeks, which is compatible with use in clinical application. The patient carrying the genomic abnormality therefore benefits from an analysis of his or her own mutation, with potential consequences for relatives. This is particularly important for extremely rare somatic variants, which resemble orphan diseases. A clinical trial should be performed to confirm the accuracy of our method. The extension of its application to the study of *POLE* variants is already underway, and this method could be extended to the characterization of all essential tumor suppressor genes in our model²², not only within the field of oncology. At a time at which purely *in silico* approaches are being used to guide therapeutic decisions, a method evaluating the functional implications of VUS is essential. Genomic editing is, thus, an amazing tool for personalizing medicine and providing access to targeted therapy.

Bibliography

1. Van't Veer, L. J. & Bernardis, R. Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature* **452**, 564–570 (2008).
2. Robson, M. E. *et al.* American Society of Clinical Oncology Policy Statement Update: Genetic and Genomic Testing for Cancer Susceptibility. *J. Clin. Oncol.* **33**, (2015).
3. Liu, Y. *et al.* Targeting tumor suppressor genes for cancer therapy. *BioEssays* **37**, 1277–1286 (2015).
4. Roy, R., Chun, J. & Powell, S. N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 68–78 (2011).
5. Huen, M. S. Y., Sy, S. M. H. & Chen, J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 138–148 (2010).
6. Shahid, T. *et al.* Structure and mechanism of action of the BRCA2 breast cancer tumor suppressor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 962–968 (2014).
7. Norquist, B. M. *et al.* Mutations in homologous recombination genes and outcomes in ovarian carcinoma patients in GOG 218: An NRG oncology/Gynecologic oncology group study. *Clin. Cancer Res.* **24**, 777–783 (2018).
8. Tutt, A. & Ashworth, A. The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition. *Trends Mol. Med.* **8**, 571–576 (2002).
9. Farmer, H. *et al.* Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**, 917–21 (2005).
10. Bryant, H. E. *et al.* Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* **434**, 913–917 (2005).
11. Konstantinopoulos, P. A. *et al.* Gene expression profile of BRCAness that correlates with responsiveness to chemotherapy and with outcome in patients with epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3555–3561 (2010).
12. Jazaeri, A. A. *et al.* Gene expression profiles of BRCA1-linked, BRCA2-linked, and sporadic ovarian cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 990–1000 (2002).
13. Popova, T. *et al.* Ploidy and large-scale genomic instability consistently identify basal-like breast carcinomas with BRCA1/2 inactivation. *Cancer Res.* **72**, 5454–5462 (2012).
14. Graeser, M. *et al.* A marker of homologous recombination predicts pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **16**, 6159–6168 (2010).
15. Fraile-Bethencourt, E. *et al.* Functional classification of DNA variants by hybrid minigenes: Identification of 30 spliceogenic variants of BRCA2 exons 17 and 18. *PLoS Genet.* **13**, 1–21 (2017).
16. Spearman, A. D. *et al.* Clinically applicable models to characterize BRCA1 and BRCA2 variants of uncertain significance. *J. Clin. Oncol.* **26**, 5393–5400 (2008).
17. Jinek, M. *et al.* A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science (80-.)*. **337**, 816–822 (2012).
18. Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281–2308 (2013).
19. Doench, J. G. Am I ready for CRISPR? A user's guide to genetic screens. *Nat. Rev. Genet.* **19**, 67–80 (2017).
20. Findlay, G. M., Boyle, E. A., Hause, R. J., Klein, J. C. & Shendure, J. Saturation editing of genomic regions by multiplex homology-directed repair. *Nature* **513**, 120–123 (2014).
21. Findlay, G. M. *et al.* Accurate functional classification of thousands of BRCA1 variants with saturation genome editing. *Nature* 294520 (2018). doi:10.1101/294520
22. Blomen, V. *et al.* Gene essentiality and synthetic lethality in haploid human cells. *Science (80-.)*. **350**, 1092 (2015).
23. Yu, X. *et al.* Improved delivery of Cas9 protein/gRNA complexes using lipofectamine CRISPRMAX. *Biotechnol. Lett.* **38**, 919–929 (2016).
24. Paquet, D. *et al.* Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature* **533**, 125–129 (2016).
25. Chu, V. T. *et al.* Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **33**, 543–548 (2015).
26. Leenay, R. T. *et al.* Identifying and visualizing functional PAM diversity across CRISPR-Cas systems. *Mol. Cell* **62**, 137–147 (2016).
27. Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A. & Liu, D. R. Programmable editing of a target

- base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* **533**, 420–424 (2016).
28. Gaudelli, N. M. *et al.* Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* **551**, 464–471 (2017).
 29. Anzalone, A. V. *et al.* Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* **576**, (2019).
 30. Pierce, A. J., Hu, P., Han, M., Ellis, N. & Jasin, M. Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev.* **15**, 3237–3242 (2001).
 31. Palles, C. *et al.* Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat. Genet.* **45**, 136–143 (2013).
 32. Nishioka, M. *et al.* Long and accurate PCR with a mixture of KOD DNA polymerase and its exonuclease deficient mutant enzyme. *J. Biotechnol.* **88**, 141–149 (2001).
 33. Valle, L. *et al.* New insights into POLE and POLD1 germline mutations in familial colorectal cancer and polyposis. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 3506–3512 (2014).
 34. Elsayed, F. A. *et al.* Germline variants in POLE are associated with early onset mismatch repair deficient colorectal cancer. *Eur. J. Hum. Genet.* **23**, 1080–1084 (2015).
 35. Spier, I. *et al.* Frequency and phenotypic spectrum of germline mutations in POLE and seven other polymerase genes in 266 patients with colorectal adenomas and carcinomas. *Int. J. Cancer* **137**, 320–331 (2015).
 36. Campbell, B. B. *et al.* Comprehensive Analysis of Hypermutation in Human Cancer. *Cell* 1–15 (2017). doi:10.1016/j.cell.2017.09.048

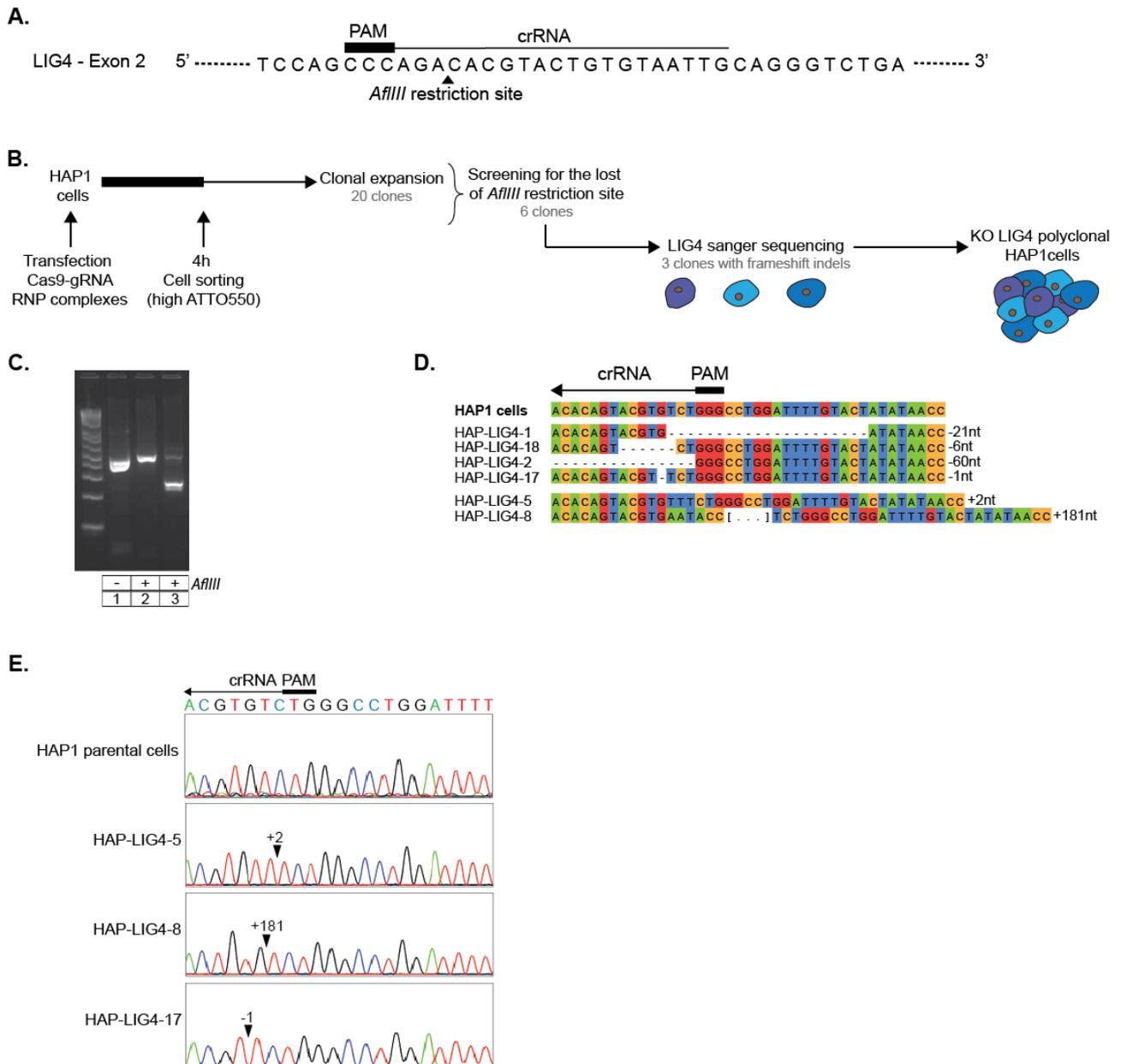


Figure 1: Generation of polyclonal LIG4 knock-out HAP1 cells. **A.** Schematic diagram of the *LIG4* DNA region targeted by the gRNA, and localization of the *AflIII* restriction site used to knock out this gene in HAP1 cells. **B.** Schematic diagram of the protocol used to generate the polyclonal LIG4 KO cell line. **C.** Electrophoresis results following digestion with the *AflIII* restriction enzyme for screening of the clones. **D.** Sanger sequence alignments of the clones selected on basis of *AflIII* restriction site loss relative to HAP1 parental cells. **E.** Sanger electrophoregrams of LIG4 KO clones with insertions or deletions causing frameshifts relative to the HAP1 parental cell line.

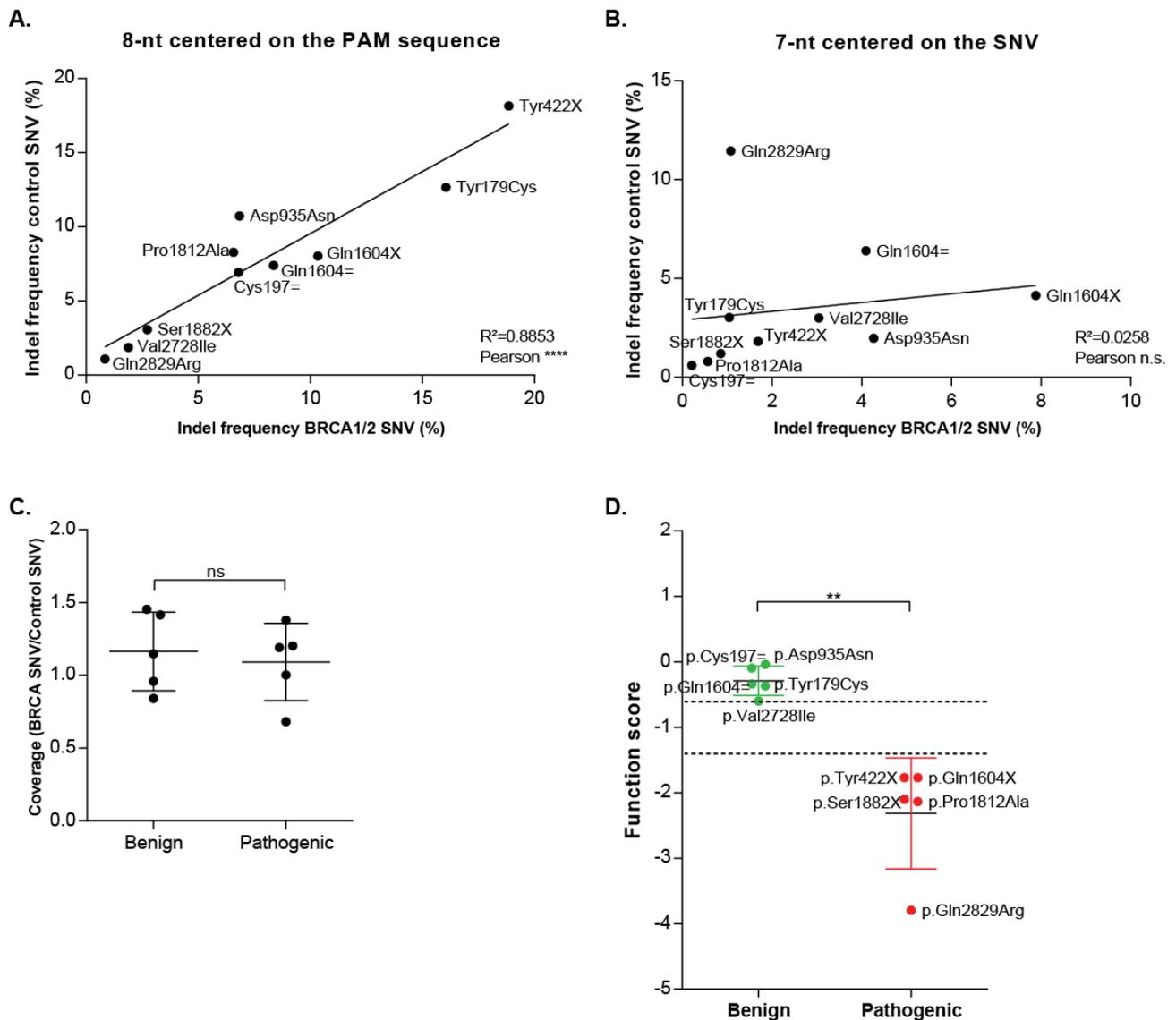


Figure 3: Comparison of editing frequencies between *BRCA1/2* variants and silent control SNVs for functional classification. **A.** Insertion and deletion frequencies determined following the NGS sequencing of *BRCA1/2* variants, compared with those for the corresponding silent control. These means include the 8 nt surrounding the PAM sequence. **B.** Same analysis for the 7 nt surrounding the mutations of interest. **C.** Analysis of NGS sequencing coverage with the following formula: Mutation of interest (Mutation+Reference control)/Silent control (Mutation+Reference control). The results for benign *BRCA1/2* variants are compared with those obtained for pathogenic mutations (Mann-Whitney tests, $p=0.8016$). **D.** Determination of the function score following CRISPR-Cas9 editing and NGS sequencing for benign and pathogenic *BRCA1/2* mutations (Mann-Whitney tests, $p=0.0079$).

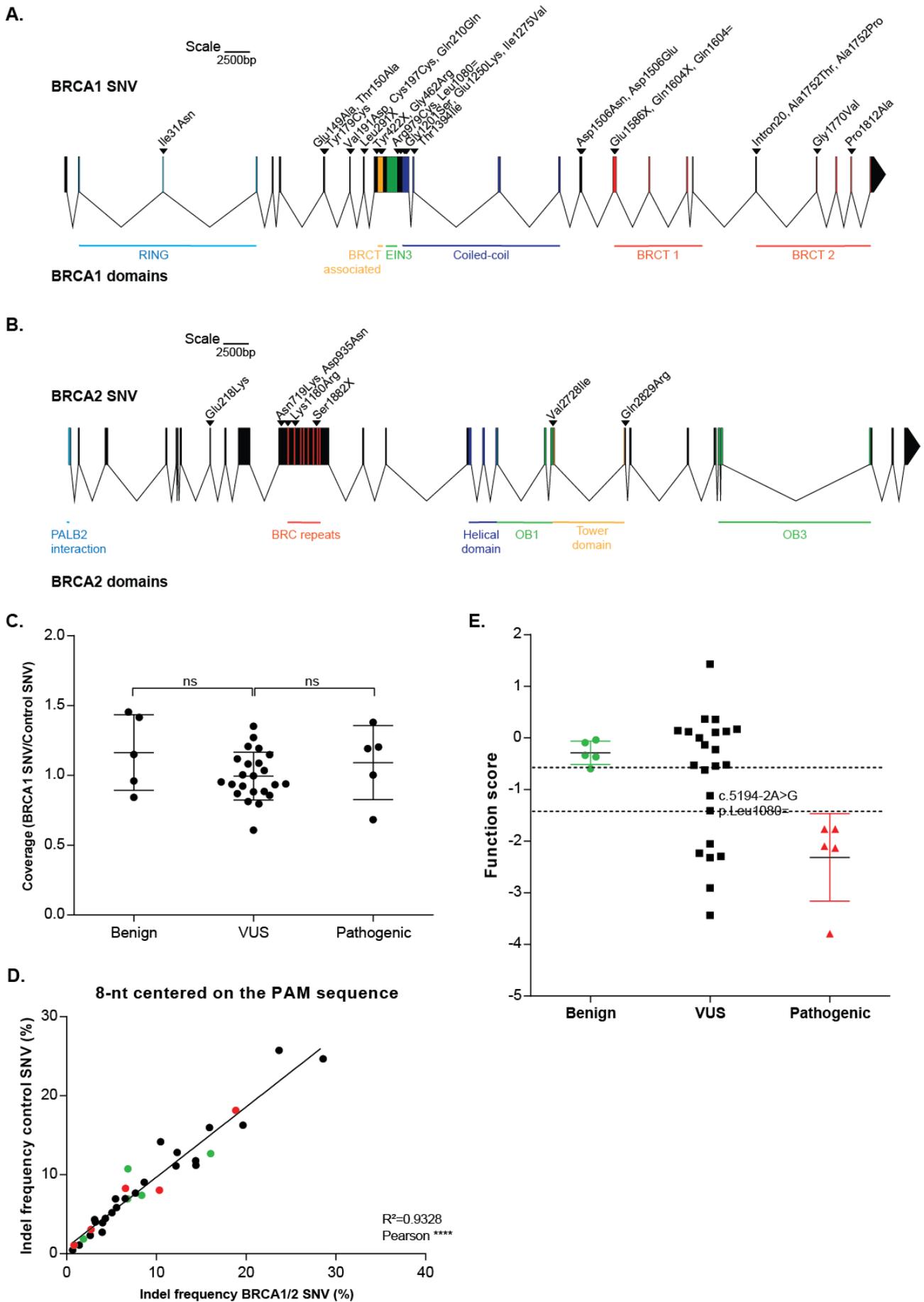


Figure 4: Functional characterization of *BRCA1/2* variants of unknown significance. A. Schematic representation of the introns and exons of the *BRCA1* gene, showing the location of the variants selected

for this analysis. **B.** Similar representation for the *BRCA2* gene. **C.** Analysis of NGS sequencing coverage with the following formula: Mutation of interest (Mutation+Reference control)/Silent control (Mutation+Reference control). Results for all *BRCA1/2* variants characterized by comparison with the classified benign and pathogenic mutations (Mann-Whitney tests, $p=0.1934$ and $p=0.2902$). **D.** Frequencies of insertions and deletions according to the NGS sequencing of *BRCA1/2* variants and corresponding silent editing controls and linear regression analysis. These means include the 8 nt surrounding the PAM sequence. Previously characterized variants are shown in colors: benign mutations in green and pathogenic mutations in red. **E.** Function score evaluation after CRIPSR-Cas9 editing and NGS sequencing of *BRCA1/2* variants of unknown significance and comparison with the scores obtained for benign and pathogenic mutations.

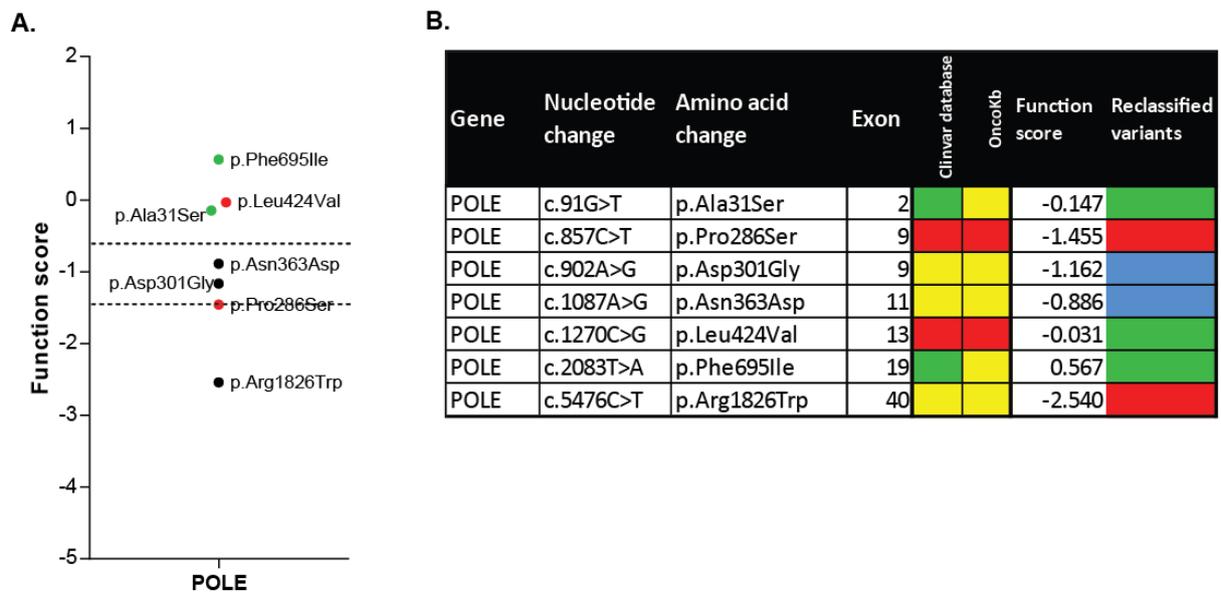


Figure 5: Extension of the experimental process to the functional evaluation of *POLE* variants.

A. Function score evaluation following the CRISPR-Cas9 editing and NGS sequencing of *POLE* variants of unknown significance, and comparison with the scores obtained for two benign and two pathogenic mutations. **B.** Table comparing the calculated function scores of *POLE* variants and Clinvar and OncoKb databases classifications: benign mutations are shown in green, unreported mutations are shown in yellow, pathogenic mutations are shown in red and intermediate mutations are shown in blue.

Gene	Nucleotide change	Amino change	acid	Exon	UMD database	Clinvar database	BRCA exchange	Function score	Reclassified variants
BRCA1	c.92T>A	p.Ile31Asn		3	Orange	Yellow	Yellow	-0.624	Green
BRCA1	c.446A>C	p.Glu149Ala		3	Orange	Orange	Orange	0.361	Green
BRCA1	c.448A>G	p.Thr150Ala		8	Yellow	Yellow	Yellow	-0.138	Green
BRCA1	c.536A>G	p.Tyr179Cys		8	Green	Green	Green	-0.369	Green
BRCA1	c.572T>A	p.Val191Asp		8	Orange	Orange	Yellow	-0.229	Green
BRCA1	c.591C>T	p.Cys197=		8	Green	Green	Green	-0.096	Green
BRCA1	c.630A>G	p.Gln210=		10	Orange	Orange	Orange	-2.055	Red
BRCA1	c.872T>G	p.Leu291X		11	Yellow	Yellow	Yellow	-2.298	Red
BRCA1	c.1266T>G	p.Tyr422X		11	Red	Red	Red	-1.771	Red
BRCA1	c.1384G>A	p.Gly462Arg		11	Orange	Orange	Orange	-0.527	Green
BRCA1	c.2935C>T	p.Arg979Cys		11	Orange	Orange	Green	0.122	Green
BRCA1	c.3238T>C	p.Leu1080=		11	Orange	Green	Green	-1.415	Blue
BRCA1	c.3601G>A	p.Gly1201Ser		11	Orange	Green	Green	0.138	Green
BRCA1	c.3748G>A	p.Glu1250Lys		11	Green	Orange	Green	0.117	Green
BRCA1	c.3823A>G	p.Ile1275Val		11	Green	Orange	Orange	-0.531	Green
BRCA1	c.4181C>T	p.Thr1394Ile		12	Orange	Orange	Orange	1.430	Green
BRCA1	c.4516G>A	p.Asp1506Asn		15	Yellow	Yellow	Yellow	-0.004	Green
BRCA1	c.4518T>G	p.Asp1506Glu		15	Yellow	Yellow	Yellow	0.165	Green
BRCA1	c.4756G>T	p.Glu1586X		15	Yellow	Yellow	Yellow	-2.319	Red
BRCA1	c.4810C>T	p.Gln1604X		16	Red	Red	Red	-1.769	Red
BRCA1	c.4812A>G	p.Gln1604=		16	Green	Green	Green	-0.340	Green
BRCA1	c.5194-2A>G			20	Yellow	Red	Red	-1.123	Blue
BRCA1	c.5254G>A	p.Ala1752Thr		20	Orange	Orange	Orange	-2.909	Red
BRCA1	c.5254G>C	p.Ala1752Pro		20	Orange	Red	Orange	-2.235	Red
BRCA1	c.5309G>T	p.Gly1770Val		21	Orange	Red	Red	-3.439	Red
BRCA1	c.5434C>G	p.Pro1812Ala		23	Red	Orange	Red	-2.136	Red
BRCA2	c.652G>A	p.Glu218Lys		8	Yellow	Yellow	Yellow	-0.546	Green
BRCA2	c.2157T>G	p.Asn719Lys		11	Yellow	Yellow	Yellow	0.359	Green
BRCA2	c.2803G>A	p.Asp935Asn		11	Green	Green	Green	-0.042	Green
BRCA2	c.3539A>G	p.Lys1180Arg		11	Orange	Orange	Orange	0.104	Green
BRCA2	c.5645C>A	p.Ser1882X		11	Red	Red	Red	-2.104	Red
BRCA2	c.8182G>A	p.Val2728Ile		18	Green	Green	Green	-0.598	Green
BRCA2	c.8486A>G	p.Gln2829Arg		19	Red	Orange	Orange	-3.797	Red

Table 1: Function scores for the evaluated BRCA1/2 variants and comparison with databases annotations. Benign mutations are shown in green, unreported mutations are shown in yellow, pathogenic mutations are shown in red and intermediate mutations are shown in blue.

Supplementary Table 1: gRNA and oligonucleotides sequences designed to edit *BRCA1*, *BRCA2* and *POLE* variants in the study.

Genes	Names	RNAg sequences
BRCA1	BRCA1-Ile31Asn	TGCTAGTCTGGAGTTGATCA
BRCA1	BRCA1-Glu149Ala	TGGCTTCCTGCTAAACAGTA
BRCA1	BRCA1-Thr150Ala	TGGCTTCCTGCTAAACAGTA
BRCA1	BRCA1-Tyr179Cys	GACGTCTGTCTACATTGAAT
BRCA1	BRCA1-Val191Asp	TTCTGAAGATACCGTTAATA
BRCA1	BRCA1-Cys197=	TTCTGAAGATACCGTTAATA
BRCA1	BRCA1-Gln210=	ATCCAAACTGATTTTCATCCC
BRCA1	BRCA1-Leu291X	GTTCTCATGCTGTAATGAGC
BRCA1	BRCA1-Tyr422X	TGTATTGGACGTTCTAAATG
BRCA1	BRCA1-Gly462Arg	TGGGAAAACCTATCGGAAGA
BRCA1	BRCA1-Arg979Cys	AAAGTGGTGGTATACGATAT
BRCA1	BRCA1-Leu1080=	GAATGCTATGCTTAGATTAG
BRCA1	BRCA1-Gly1201Ser	CCCTTTCACCCATACACATT
BRCA1	BRCA1-Glu1250Lys	AGACAGACACTCGGTAGCAA
BRCA1	BRCA1-Ile1275Val	TAACCAGGTAATATTGGCAA
BRCA1	BRCA1-Thr1394Ile	ACACACGCTTTTTACCTGAG
BRCA1	BRCA1-Asp1506Asn	ACCACCTATCATCTAATGAT
BRCA1	BRCA1-Asp1506Glu	ACCACCTATCATCTAATGAT
BRCA1	BRCA1-Glu1586X	GCCAACACGAGCTGACTCTG
BRCA1	BRCA1-Gln1604X	TTGGGGAACTTTCAATGCAG
BRCA1	BRCA1-Gln1604=	TTGGGGAACTTTCAATGCAG
BRCA1	BRCA1-Intron20	GAAACCAAACACAACCCATC
BRCA1	BRCA1-Ala1752Thr	AAAGCGAGCAAGAGAATCCC
BRCA1	BRCA1-Ala1752Pro	AAAGCGAGCAAGAGAATCCC
BRCA1	BRCA1-Gly1770Val	ACCTGTGGGCATGTTGGTGA
BRCA1	BRCA1-Pro1812Ala	CTGGCTGCACAACCACAATT
BRCA2	BRCA2-Glu218Lys	CTTACAGCAGTAGTATCATG
BRCA2	BRCA2-Asn719Lys	TGATTCTCTGTCATGCCTGC
BRCA2	BRCA2-Asp935Asn	ATGGTTTTATATGGAGACAC
BRCA2	BRCA2-Lys1180Arg	TGTCTACCTGACCAATCGAT
BRCA2	BRCA2-Ser1882X	AACCTGCCATAATTTTCGTT
BRCA2	BRCA2-Val2728Ile	AGATGGGTGGTATGCTGTTA
BRCA2	BRCA2-Gln2829Arg	TCAAAGAGCATACCCTATAC
POLE	POLE-Ala31Ser	AGTTTCGGCACTCAAGCGCC
POLE	POLE-Pro286Ser	TGTAGGAAATCATCATAATC

POLE	POLE-Asp301Gly	CACCTGGCCATCGATCATGT
POLE	POLE-Asn363Asp	CATCATGGTCACCTACAACG
POLE	POLE-Leu424Val	GGGCAGTCATAATCTCAAGG
POLE	POLE-Ala456Pro	GAATACGTGGCCAGAGTCTG
POLE	POLE-Phe695Ile	CCATCGGATCCAGCACCAGC
POLE	POLE-Arg1826Trp	AGCGGTAGAAGTGCATCACC
Genes	Names	Donor sequences
BRCA1	BRCA1-Ile31Asn-mut	GCAAAATATGTGGTCACACTTTGTGGAGACAGGTTCTTTGTTCAACTCCAGACTAGCAGGGTAGGGG GGGAGAAAAAGAAAATAAATGAGGC
BRCA1	BRCA1-Ile31Asn-sil	GCAAAATATGTGGTCACACTTTGTGGAGACAGGTTCTTTAATCAACTCCAGACTAGCAGGGTAGGGG GGGAGAAAAAGAAAATAAATGAGGC
BRCA1	BRCA1-Glu149Ala-mut	CCAAGGTTAGAGAGTTGGACACTGAGACTGGTTGCTTAAACAGTATGATAAAGAACAGTCAAGC AATTGTTGGCCAGTTCTGTGC
BRCA1	BRCA1-Glu149Ala-sil	CCAAGGTTAGAGAGTTGGACACTGAGACTCGTTTCTGCTAAACAGTATGATAAAGAACAGTCAAGC AATTGTTGGCCAGTTCTGTGC
BRCA1	BRCA1-Thr150Ala-mut	CCAAGGTTAGAGAGTTGGACACTGAGACTGGCTTCTGCTAAACAGTATGATAAAGAACAGTCAAGC AATTGTTGGCCAGTTCTGTGC
BRCA1	BRCA1-Thr150Ala-sil	CCAAGGTTAGAGAGTTGGACACTGAGACTCGTTTCTGCTAAACAGTATGATAAAGAACAGTCAAGC AATTGTTGGCCAGTTCTGTGC
BRCA1	BRCA1-Tyr179Cys-mut	GCAATTATTATAAATACTTAAAAAACCTGAGACCCTTACCTAATTCAATGCAGACAGACGTCTTTTGA GGTTGTATCCGCTGC
BRCA1	BRCA1-Tyr179Cys-sil	GCAATTATTATAAATACTTAAAAAACCTGAGACCCTTACCTAATTCAATATAGACAGACGTCTTTTGA GGTTGTATCCGCTGC
BRCA1	BRCA1-Val191Asp-mut	GGTTCTCTTTGACTCACCTGCAATAAGTTGCTTTATTATCGGTATCTTCAGAAGAATCAGATCCTAAAA AATTTCCCCC
BRCA1	BRCA1-Val191Asp-sil	GGTTCTCTTTGACTCACCTGCAATAAGTTGCTTTATTACGGTATCTTCAGAAGAATCAGATCCTAAAA AATTTCCCCC
BRCA1	BRCA1-Cys197=-mut	CCAGCTTCATAGACAAAGGTTCTTTGACTCACCTACAATAAGTTGCTTTATTAAACGGTATCTTCAGA AGAATCAGATCC
BRCA1	BRCA1-Cys197=-sil	CCAGCTTCATAGACAAAGGTTCTTTGACTCACCTGCAGTAAGTTGCTTTATTAAACGGTATCTTCAG AAGAATCAGATCC
BRCA1	BRCA1-Gln210=-mut	GCCATTACCCTTTTTGCAGAATCCAAACTGATTTATCCCTCGTTCCCTGAGGGGTGATTTGTAACA ATTCTTGATCTCCC
BRCA1	BRCA1-Gln210=-sil	GCCATTACCCTTTTTGCAGAATCCAAACTGATTTATCCCTCGTACCTTGAGGGGTGATTTGTAACA ATTCTTGATCTCCC
BRCA1	BRCA1-Leu291X-mut	CTACATTCATTCTGTCTTTAGTGAGTCATAAACTGCTGTTCTCATGCTGTAATGAGCTTGCATGAGTAT TTGTGCCACATGGCTCC
BRCA1	BRCA1-Leu291X-sil	CTACATTCATTCTGTCTTTAGTGAGCAATAAACTGCTGTTCTCATGCTGTAATGAGCTTGCATGAGTAT TTGTGCCACATGGCTCC
BRCA1	BRCA1-Tyr422X-mut	CACTGGCCAGTAAGTCTATTTTCTCTGAAGAACCAGACTATTCATCTACTTCATTTAGAACGTCCAATA CATCAGCTACTTTGGC
BRCA1	BRCA1-Tyr422X-sil	CACTGGCCAGTAAGTCTATTTTCTCTGAAGAACCAGAGTATTCATCTACTTCATTTAGAACGTCCAATA CATCAGCTACTTTGGC
BRCA1	BRCA1-Gly462Arg-mut	CAGTTACATGGCTTAAGTTGGGGAGGCTTGCTTTCTCCGATAGGTTTTCTCAATATTTGTCTTCAA TATTACTCTACTG
BRCA1	BRCA1-Gly462Arg-sil	CAGTTACATGGCTTAAGTTGGGGAGGCTTGCTTTCTCCGATAGGTTTTCTCAATATTTGTCTTCAA TATTACTCTACTG

BRCA1	BRCA1-Arg979Cys-mut	CTTACATTTAGTTTTAACAAATGACTTGATGGGAAAAAGTGGTGGTATACAATATGGATTTTGTAAAA GTCCATGTTTATTTGG
BRCA1	BRCA1-Arg979Cys-sil	CTTACATTTAGTTTTAACAAATGACTTGATGGGAAAAAGTGGTGGTATGCGATATGGATTTTGTAAAA GTCCATGTTTATTTGG
BRCA1	BRCA1-Leu1080=-mut	GGAAGACTTTGTTTATAGACCTCAGGTTGCAAACTCCTAATCTAAGCATAGCATTGATTTTGGCCC TCTGTTTCTACCTAGTTCTGC
BRCA1	BRCA1-Leu1080=-sil	GGAAGACTTTGTTTATAGACCTCAGGTTGCAAAACACCTAATCTAAGCATAGCGTTCAATTTTGGCCC TCTGTTTCTACCTAGTTCTGC
BRCA1	BRCA1-Gly1201Ser-mut	GGACTCTAATTTCTTGGCCCTCTTCGGTAACTCTGAGCGAAATGTGTATGGGTGAAAGGGCTAGGA CTCCTGCTAAGCTCTCC
BRCA1	BRCA1-Gly1201Ser-sil	GGACTCTAATTTCTTGGCCCTCTTCGGTATCCCTGAGCGAAATGTGTATGGGTGAAAGGGCTAGGA CTCCTGCTAAGCTCTCC
BRCA1	BRCA1-Glu1250Lys-mut	GCTATTCTTCAATGATAATAAATTCCTCTGTGTTCTTAGACAGACACTTGGTAGCAACAGTGCTAT GCCTAGTAGACTGAGAAGG
BRCA1	BRCA1-Glu1250Lys-sil	GCTATTCTTCAATGATAATAAATTCCTCTGTGTTCTTAGACAGACACTTGGTAGCAACAGTGCTAT GCCTAGTAGACTGAGAAGG
BRCA1	BRCA1-Ile1275Val-mut	CCTCACTAAGGTGATGTTCTGAGATGCTTTTGCCAATACTACCTGGTACTGCAGTCATTTAAGCTA TTCTTCAATGATAATAAATTCCTC
BRCA1	BRCA1-Ile1275Val-sil	CCTCACTAAGGTGATGTTCTGAGATGCTTTTGCCAAGATTACCTGGTACTGCAGTCATTTAAGCTA TTCTTCAATGATAATAAATTCCTC
BRCA1	BRCA1-Thr1394Ile-mut	GCAAAGGACACCACACACGCATGTGCACACACACACGCTTTTACCTGAATTGTTAAAATGTCA CTCTGAGAGGATAGCCC
BRCA1	BRCA1-Thr1394Ile-sil	GCAAAGGACACCACACACGCATGTGCACACACACACGCTTTTACCTGAGTTGTTAAGATGTC ACTCTGAGAGGATAGCCC
BRCA1	BRCA1-Asp1506Asn-mut	CTCCCAGAGCAACTGTGCATGTACCACCTATTATCTAATGATGGACATTTAGAAGGGGATGACCTAG AAAGATAAATGGAAGG
BRCA1	BRCA1-Asp1506Asn-sil	CTCCCAGAGCAACTGTGCATGTACCACCTGTCATCTAATGATGGACATTTAGAAGGGGATGACCTAG AAAGATAAATGGAAGG
BRCA1	BRCA1-Asp1506Glu-mut	CTCCCAGAGCAACTGTGCATGTACCACCTCTCATCTAATGATGGACATTTAGAAGGGGATGACCTAG AAAGATAAATGGAAGG
BRCA1	BRCA1-Asp1506Glu-sil	CTCCCAGAGCAACTGTGCATGTACCACCTGTCATCTAATGATGGACATTTAGAAGGGGATGACCTAG AAAGATAAATGGAAGG
BRCA1	BRCA1-Glu1586X-mut	GCAGAGGTTGAAGATGGTATGTTGCCAACACGAGCTGACTATGGAGCTCTGTCTTCAGAAGGATCAG ATTCAGGGTCATCAGAG
BRCA1	BRCA1-Glu1586X-sil	GCAGAGGTTGAAGATGGTATGTTGCCAACACGAGCTGATTCTGGAGCTCTGTCTTCAGAAGGATCAG ATTCAGGGTCATCAGAG
BRCA1	BRCA1-Gln1604X-mut	GCAGCAGCTGGACTCTGGGCAGATTCTGCAACTTTCAATTAGGGAACCTTCAATGCAGACGTTGAAG ATGGTATGTTGCCAACACGAGCTGACTCTGGGGC
BRCA1	BRCA1-Gln1604X-sil	GCAGCAGCTGGACTCTGGGCAGATTCTGCAACTTTCAACTGGGGAACCTTCAATGCAGACGTTGAAG ATGGTATGTTGCCAACACGAGCTGACTCTGGGGC
BRCA1	BRCA1-Gln1604=-mut	GCAGCAGCTGGACTCTGGGCAGATTCTGCAACTTTCAACTGGGGAACCTTCAATGCAGACGTTGAAG ATGGTATGTTGCCAACACGAGCTGACTCTGGGGC
BRCA1	BRCA1-Gln1604=-sil	GCAGCAGCTGGACTCTGGGCAGATTCTGCAACTTTCAATTGTGGAACCTTCAATGCAGACGTTGAAG ATGGTATGTTGCCAACACGAGCTGACTCTGGGGC
BRCA1	BRCA1-Intron20-mut	CCATTGACCACATCTCTCTGACTTCAAATCATGCGAAAGAAACCAACACAACCCATCAGGATAA GAGAAAGAGAAGCTTCTTCAATGG
BRCA1	BRCA1-Intron20-sil	CCATTGACCACATCTCTCTGACTTCAAATCATGCTGAAAGAACCAACACAACCCATCAGGATAA GAGAAAGAGAAGCTTCTTCAATGG

BRCA1	BRCA1-Ala1752Thr-mut	GAGGGAGGGAGCTTACCTTTCTGTCTGGGATTCTCTTGGTCGCTTTGGACCTTGGTGGTTTCTCC ATTGACCACATCTCC
BRCA1	BRCA1-Ala1752Thr-sil	GAGGGAGGGAGCTTACCTTTCTGTCTGGGATTCTCTAGCTCGCTTTGGACCTTGGTGGTTTCTCC ATTGACCACATCTCC
BRCA1	BRCA1-Ala1752Pro-mut	GAGGGAGGGAGCTTACCTTTCTGTCTGGGATTCTCTTGTTCGCTTTGGACCTTGGTGGTTTCTCC ATTGACCACATCTCC
BRCA1	BRCA1-Ala1752Pro-sil	GAGGGAGGGAGCTTACCTTTCTGTCTGGGATTCTCTAGCTCGCTTTGGACCTTGGTGGTTTCTCC ATTGACCACATCTCC
BRCA1	BRCA1-Gly1770Val-mut	GGAACTCTGGGGTTCTCCAGGCTTACCTGTGGGCATGTTGGTGAACGGCACATAGCAACAGATT TCTAGCCCCCTGAAGATCTGG
BRCA1	BRCA1-Gly1770Val-sil	GGAACTCTGGGGTTCTCCAGGCTTACCTGTGGGCATGTTGGTGAACGGACCATAGCAACAGATT TCTAGCCCCCTGAAGATCTGG
BRCA1	BRCA1-Pro1812Ala-mut	GGAAGCCATTGTCCTGTCCAGGCATCTGCCTGCACAACCACAATTGGATGGACACCCTGGATCCC CAGGAAGGAAAGAGCATT
BRCA1	BRCA1-Pro1812Ala-sil	GGAAGCCATTGTCCTGTCCAGGCATCCGGTGCACAACCACAATTGGATGGACACCCTGGATCCC CAGGAAGGAAAGAGCATT
BRCA2	BRCA2-Glu218Lys-mut	CAGTCAGAAATGAAGAAGCATCTAAAAGTATTTCTCACGATACTACTGCTGTAAGTAAATATGAC ATTGATTAGACTGTTG
BRCA2	BRCA2-Glu218Lys-sil	CAGTCAGAAATGAAGAAGCATCTGAGACTGTATTTCTCACGATACTACTGCTGTAAGTAAATATGAC ATTGATTAGACTGTTG
BRCA2	BRCA2-Asn719Lys-mut	GTTATTTATTACCCAGAAGCTGATTCTCTGTCATGCCTGCAAGAAGGACAGTGTGAAAAGGATCCA AAAAGCAAAAAGTTTCAG
BRCA2	BRCA2-Asn719Lys-sil	GTTATTTATTACCCAGAAGCTGATTCTCTGTCATGCCTGCAAGAAGGACAGTGTGAAAAGGATCCA AAAAGCAAAAAGTTTCAG
BRCA2	BRCA2-Asp935Asn-mut	CGAACCCATTTTCAAGAAGCTACCATGGTTTTATATGGAGATACAGTAATAAACAAAGCAACCCAAG TGTCATTAATAAAGATTGG
BRCA2	BRCA2-Asp935Asn-sil	CGAACCCATTTTCAAGAAGCTACCATGGTTTTATATGGAGATACAGGTGACAAAAGCAACCCAAG TGTCATTAATAAAGATTGG
BRCA2	BRCA2-Lys1180Arg-mut	GCTGATCTTCATGTCATAATGAATGCTCCATCGATTGGTCAGGTAGACAGCAGCAGGCAATTTGAAG GTACAGTTGAAATTAACGG
BRCA2	BRCA2-Lys1180Arg-sil	GCTGATCTTCATGTCATAATGAATGCTCCATCGATTGGTCAGGTAGACAGCAGCAACAATTTGAAG GTACAGTTGAAATTAACGG
BRCA2	BRCA2-Ser1882X-mut	CAGTAAAGTAATTAAGGAAAACAACGAGAATAAATAAAAAATTTGTCAAACGAAAATTATGGCAGGTT GTTACGAGGCATTGG
BRCA2	BRCA2-Ser1882X-sil	CAGTAAAGTAATTAAGGAAAACAACGAGAATAAATCCAAAATTTGTCAAACGAAAATTATGGCAGGTT GTTACGAGGCATTGG
BRCA2	BRCA2-Val2728Ile-mut	GATACCCAAAAAGTGGCCATTATTGAACTTACAGATGGGTGGTATGCTATTAAAGCCCAGTTAGATCC TCCCCTCTAGCTGTC
BRCA2	BRCA2-Val2728Ile-sil	GATACCCAAAAAGTGGCCATTATTGAACTTACAGATGGGTGGTATGCTGTAAAAGCCCAGTTAGATC CTCCCCTCTAGCTGTC
BRCA2	BRCA2-Gln2829Arg-mut	GGAAATGTTGGTTGTGTTGATGTAATTATTCAAAGAGCATACCCTATCCGGGTATGATGATTCTTGA AACTTACCATATATTT
BRCA2	BRCA2-Gln2829Arg-sil	GGAAATGTTGGTTGTGTTGATGTAATTATTCAAAGAGCATATCCTATCCAGGTATGATGATTCTTGA AACTTACCATATATTT
POLE	POLE-Ala31Ser-mut	CCCTTCTTCACTCAGGGATGATGGCGCCACTTCTCAGTTTCGCTCACTCAAGCGCCTCGAACGGAG TCAGTGGACGGATAAGATGG
POLE	POLE-Ala31Ser-sil	CCCTTCTTCACTCAGGGATGATGGCGCCACTTCTCAGTTTCGCGCCCTCAAGCGCCTCGAACGGAG TCAGTGGACGGATAAGATGG

POLE	POLE-Pro286Ser-mut	GACATTGAGACGACCAAAGTCCCTCAAGTTTTCTGATGCTGAGACAGATCAGATTATGATGATTTCTACATGATCGATGGCCAGG
POLE	POLE-Pro286Ser-sil	GACATTGAGACGACCAAAGTCCCTCAAGTTTTCTGATGCCGAGACAGATCAGATTATGATGATTTCTACATGATCGATGGCCAGG
POLE	POLE-Asp301Gly-mut	GCTGAGACAGACCAGATTATGATGATTTCTGACATGATCGGTGGCCAGGTGAGCAGGTGGCTTCTGGAAAGTAAGCTCCTGGG
POLE	POLE-Asp301Gly-sil	GCTGAGACAGACCAGATTATGATGATTTCTGACATGATTGATGGCCAGGTGAGCAGGTGGCTTCTGGAAAGTAAGCTCCTGGG
POLE	POLE-Asn363Asp-mut	GGTTTGAACACGTCCAGGAGACCAAACCCACCATCATGGTCACCTACGACGGAGACTTTTTTGACTGTGAGTCTGTGTCTTC
POLE	POLE-Asn363Asp-sil	GGTTTGAACACGTCCAGGAGACCAAACCCACCATCATGGTCACCTACAATGGAGACTTTTTTGACTGTGAGTCTGTGTCTTC
POLE	POLE-Leu424Val-mut	GGTGGGTGAAGAGGGACAGTTACCTTCTGTGGGCAGTCATAATGTCAAGGCCGCCCAAGGCCAAGCTAGGCTATGATCCCG
POLE	POLE-Leu424Val-sil	GGTGGGTGAAGAGGGACAGTTACCTTCTGTGGGCAGTCATAATGTCAAGGCCGCCCAAGGCCAAGCTAGGCTATGATCCCG
POLE	POLE-Ala456Pro-mut	GATGGCCCTGCTCTCTGGGTTCTTCTCAGACTCTGCCACGATTCTGTGTCAGATGCTGTGCCACTTACTACCTGTAC
POLE	POLE-Ala456Pro-sil	GATGGCCCTGCTCTCTGGGTTCTTCTCAGACTCTGCCACATATTCTGTGTCAGATGCTGTGCCACTTACTACCTGTAC
POLE	POLE-Phe695Ile-mut	CAGCCAGTCGCAGCGAATACCATCGGATCCAGCACCAGCTCGAGTCAGAGAAGATCCCCCCTTGTTCCCAGAGGGGCCAGCTCGG
POLE	POLE-Phe695Ile-sil	CAGCCAGTCGCAGCGAATACCATCGGATCCAGCACCAGCTCGAGTCAGAGAAGTTTTCCCCCCTTGTTCCCAGAGGGGCCAGCTCGG
POLE	POLE-Arg1826Trp-mut	CCCAGTACCACAACATCTATGCAGACAATCAGGTGATGCACTTCTACCGCTGGCTTGGTCGCCATCTCTCTGCTTCATGACCC
POLE	POLE-Arg1826Trp-sil	CCCAGTACCACAACATCTATGCAGACAATCAGGTGATGCACTTCTACCGCTGGCTTCGTTGCCATCTCTCTGCTTCATGACCC

Supplementary Table 2: BRCA1/2 and POLE variants used as silent controls or references with their functional impact according to different databases. Benign mutations are shown in green, unreported mutations are shown in yellow, pathogenic mutations are shown in red and intermediate mutations are shown in blue.

Gene	Nucleotide change	Amino acid change	Exon	Silent control	Silent reference	UMD database	Clinvar database	BRCA exchange	Characterized variant
BRCA1	c.93C>T	Ile31=	3						Ile31Asn
BRCA1	c.96G>A	Lys32=	3						Ile31Asn
BRCA1	c.442-12C>T		3						Glu149Ala, Thr150Ala
BRCA1	c.450C>G	Thr150=	3						Glu149Ala, Thr150Ala
BRCA1	c.537C>T	Tyr179=	8						Tyr179Cys
BRCA1	c.546G>A	Leu182=	8						Tyr179Cys
BRCA1	c.573T>A	Val191=	8						Val191Asp
BRCA1	c.579G>A	Lys193=	8						Val191Asp, Cys197Cys
BRCA1	c.591C>T	Tyr196=	8						Cys197Cys
BRCA1	c.633A>T	Gly211=	10						Gln210Gln
BRCA1	c.636C>G	Thr212=	10						Gln210Gln
BRCA1	c.840C>A	Ala280=	11						Leu291X
BRCA1	c.873A>G	Leu291=	11						Leu291X
BRCA1	c.1254G>A	Glu418=	11						Tyr422X
BRCA1	c.1266T>C	Tyr422=	11						Tyr422X
BRCA1	c.1386G>A	Gly462=	11						Gly462Arg
BRCA1	c.1404G>A	Lys468=	11						Gly462Arg
BRCA1	c.2928C>T	Asn976=	11						Arg979Cys
BRCA1	c.2937T>C	Arg979=	11						Arg979Cys
BRCA1	c.3243T>C	Asn1081=	11						Leu1080=
BRCA1	c.3261G>A	Gly1087=	11						Leu1080=
BRCA1	c.3594C>G	Leu1198=	11						Gly1201Ser
BRCA1	c.3603T>A	Gly1201=	11						Gly1201Ser
BRCA1	c.3738C>T	Thr1246=	11						Glu1250Lys
BRCA1	c.3750G>A	Glu1250=	11						Glu1250Lys
BRCA1	c.3825A>C	Ile1275=	11						Ile1275Val
BRCA1	c.3834G>A	Lys1278=	11						Ile1275Val
BRCA1	c.4173G>A	Ile1391=	12						Thr1394Ile
BRCA1	c.4179C>A	Thr1393=	12						Thr1394Ile
BRCA1	c.4503C>T	Cys1501=	15						Asp1506Asn, Asp1506Glu
BRCA1	c.4518T>C	Asp1506=	15						Asp1506Asn, Asp1506Glu
BRCA1	c.4752C>T	Ala1584=	15						Glu1586X
BRCA1	c.4758G>A	Glu1586=	15						Glu1586X
BRCA1	c.4791C>G	Thr1597=	16						Gln1604X, Gln1604=
BRCA1	c.4809C>A	Pro1603=	16						Gln1604=
BRCA1	c.4812A>G	Gln1604=	16						Gln1604X
BRCA1	c.5194-28C>G		20						c.5194-2A>G
BRCA1	c.5194-10T>G		20						c.5194-2A>G

BRCA1	c.5256A>T	Ala1752=	20						Ala1752Thr, Ala1752Pro
BRCA1	c.5268G>A	Gln1756=	20						Ala1752Thr, Ala1752Pro
BRCA1	c.5310G>T	Gly1770=	21						Gly1770Val
BRCA1	c.5313C>G	Pro1771=	21						Gly1770Val
BRCA1	c.5415C>T	His1805=	23						Pro1812Ala
BRCA1	c.5436A>G	Pro1812=	23						Pro1812Ala
BRCA2	c.654A>G	Glu218=	8						Glu218Lys
BRCA2	c.669T>C	His223=	8						Glu218Lys
BRCA2	c.2139G>A	Gln713=	11						Asn719Lys
BRCA2	c.2157T>C	Asn719=	11						Asn719Lys
BRCA2	c.2796C>T	Asp932=	11						Asp935Asn
BRCA2	c.2805T>C	Asp935=	11						Asp935Asn
BRCA2	c.3510C>T	Ala1170=	11						Lys1180Arg
BRCA2	c.3540G>A	Lys1180=	11						Lys1180Arg
BRCA2	c.5646A>C	Ser1882=	11						Ser1882X
BRCA2	c.5655C>T	Cys1885=	11						Ser1882X
BRCA2	c.8184T>A	Val2728=	18						Val2728Ile
BRCA2	c.8187G>A	Lys2729=	18						Val2728Ile
BRCA2	c.8478C>T	Tyr2826=	19						Gln2829Arg
BRCA2	c.8484A>C	Ile2828=	19						Gln2829Arg
Gene	Nucleotide change	Amino acid change	Exon	Silent control	Silent reference	Exac	Clinvar database	OncobKb	Characterized variant
POLE	c.93A>C	Ala31=	2						Ala31Ser
POLE	c.105G>C	Leu35=	2						Ala31Ser
POLE	c.864T>C	Ala288=	9						Pro286Ser
POLE	c.874C>T	Asp291=	9						Pro286Ser
POLE	c.891C>G	Ser297=	9						Asp301Gly
POLE	c.900C>T	Ile300=	9						Asp301Gly
POLE	c.1089C>T	Asn363=	11						Asn363Arg
POLE	c.1092G>A	Gly364=	11						Asn363Arg
POLE	c.1272C>G	Leu424=	13						Leu424Val
POLE	c.1278G>C	Ala426=	13						Leu424Val
POLE	c.1360-6C>T		14						Ala456Pro
POLE	c.1371G>A	Thr457=	14						Ala456Pro
POLE	c.2070G>C	Leu690=	19						Phe695Ile
POLE	c.2085C>T	Phe695=	19						Phe695Ile
POLE	c.5448C>T	Asn1815=	40						Arg1826Trp
POLE	c.5478G>T	Arg1826=	40						Arg1826Trp

2.1.4. Résultats de l'article 5

Suite aux résultats obtenus dans les lignées diploïdes et l'édition de clones uniquement hétérozygotes, la lignée cellulaire haploïde HAP1 a été sélectionnée comme modèle d'étude. Les récents résultats publiés par Findlay et son équipe concernant le « saturation genome editing » basé sur ces mêmes cellules et le caractère essentiel de BRCA1 dans cette lignée ont été déterminants pour la mise en place de notre méthodologie³⁵⁴⁻³⁵⁶. Nous avons donc, dans un premier temps, réalisé un KO de LIG4, gène essentiel pour le fonctionnement de la voie de réparation des jonctions non homologues alternative à la recombinaison homologue lors de cassures doubles brins de l'ADN. Cette modification permet de favoriser la RH, augmentant l'efficacité d'édition³⁵⁷. Nous avons sélectionné plusieurs clones KO pour ce gène afin de constituer la lignée KO LIG4 polyclonale, limitant les éventuels effets hors cibles (Figure 1).

Dans notre modèle, les gènes BRCA1 et BRCA2 sont essentiels, l'insertion de mutations au caractère pathogénique va donc entraîner la mort des cellules éditées, facilitant le criblage et donnant une indication quant à sa conséquence fonctionnelle. Afin d'avoir un contrôle d'édition, nous réalisons en parallèle l'édition d'une mutation « contrôle » silencieuse, et classifiée si possible comme non pathogène dans les bases de données, en présence du même ARNg que la mutation d'intérêt. Enfin, permettant à la fois la comparaison de l'efficacité dans les deux conditions et une amélioration de l'efficacité d'édition (car intervenant au niveau du PAM ou 3nt en amont), une seconde mutation silencieuse est également insérée, appelée mutation de référence. La liste de toutes ces mutations ayant permis la caractérisation fonctionnelle est disponible (Supplementary table 2). Cette méthodologie (Figure 2) nous a permis l'étude fonctionnelle de 26 altérations de BRCA1 et 7 de BRCA2 dont 10 contrôles déjà classifiés comme bénins ou pathogènes dans les bases de données (Figure 3). A l'issue de l'édition puis du séquençage et sur les 23 variants non classifiés ou d'impact fonctionnel indéterminé, 6 ont pu être démontrés comme pathogéniques et 2 mutations de BRCA1 (p.Leu1080= et c.5194-2A>G) disposaient d'un score fonctionnel intermédiaire (Figure 4 et Table 1).

Cette méthodologie reposant sur l'essentialité des gènes suppresseurs de tumeur dans notre modèle, elle peut virtuellement être étendue considérablement. Nous avons donc choisi pour illustrer cela le gène POLE dont les altérations pathogéniques sont aujourd'hui des biomarqueurs permettant l'accès à l'immunothérapie. Sept mutations de ce gène ont donc été étudiées donc 4 étaient déjà classifiées dans les bases de données. Bien que notre modèle semble tout à fait applicable à la caractérisation fonctionnelle des mutations de cette cible, une des mutations pathogénique (p.Leu424Val) a cependant été retrouvée comme neutre (Figure 5).

2.1.5. Discussion de l'article 5

La mise au point de cette méthodologie permet la caractérisation fonctionnelle de VSI de tous les gènes suppresseurs de tumeur essentiels dans un modèle unique. Dans notre cas, ce sont les gènes BRCA1, BRCA2 et POLE qui ont été utilisés comme exemples. L'utilisation d'une lignée haploïde polyclonale

KO LIG4 permet d'éviter les éventuels biais liés aux effets hors cibles dans un des clones. D'autre part, cette analyse sur population générale, permise par l'essentialité des gènes facilitant le crible, évite la sélection clonale limitant à nouveau les conséquences des effets hors cibles tout en faisant gagner un temps considérable. Il devient alors possible de donner l'impact fonctionnel d'un variant dans un délai de 3 semaines, ce qui est compatible avec les impératifs cliniques.

Concernant BRCA1, les scores fonctionnels sont corrélés à ceux obtenus dans l'article de Findlay, mentionné précédemment, pour les mutations p.Ile31Asn, p.Ala1752Thr, p.Ala1752Pro, p.Gly1770Val et p.Pro1812Ala. Lors de notre étude deux altérations ont présenté des scores intermédiaires (p.Leu1080= et c.5194-2A>G) et toutes deux avaient des potentiels effets sur l'épissage. D'une part, il faut rappeler que les limites permettant de discriminer mutations pathogènes ou bénignes reposent sur un nombre limité de variants, ces limites mériteraient donc d'être affinées avec un échantillonnage plus important. La mutation de BRCA1, p.Leu1080= étant à la limite de la pathogénie serait donc probablement re-classifiée. La mutation c.5194-2A>G est elle plus intéressante. En effet, son impact intermédiaire rejoint les observations précédentes réalisées dans l'article 4. En effet, celle-ci avait été déterminée comme ayant un impact transcriptionnel mineur chez le patient, ce qui était corrélé à sa rechute sous iPARP seulement 3 mois après le début de l'administration du traitement. L'hypothèse alors soulevée quant à l'expression de transcrits variés de BRCA1 et l'effet modéré de cette altération sur l'épissage compensant la perte de l'exon 20 semble donc se vérifier.

Lors de l'application de cette méthodologie à l'étude de variants de POLE, un cas discordant est apparu en présence de la mutation p.Leu424Val. En effet, classifiée comme pathogénique, cette altération a présenté un score plutôt associé à une altération d'impact fonctionnel neutre. Comme discuté dans l'article, cette altération a été précédemment associée à une prédisposition héréditaire au cancer colorectal³⁵⁸⁻³⁶⁰. Les résultats obtenus sont donc dans un premier temps surprenants. Cependant, ils rejoignent une observation réalisée dans un autre article concernant les conséquences de différentes mutations de POLE sur l'acquisition d'un phénotype associé à une hypermutation²⁷. En effet, les auteurs avaient observés que contrairement à d'autres altérations pathogènes de POLE, le changement d'acide aminé au niveau de la Leucine 424 n'était pas toujours associé à une hypermutation. Ce phénotype dépendait du type d'acide aminé apparu suite à la mutation. L'absence d'hypermutation pourrait permettre d'expliquer pourquoi l'édition de cette mutation n'a pas une conséquence létale dans notre modèle. Cette observation ne remet pas en question l'observation réalisée quant à son caractère héréditaire. Il est en effet possible d'imaginer que certaines altérations ont un caractère prédictif car facilitant l'acquisition d'un phénotype tumoral sans pour autant avoir un caractère délétère de part leur seule présence. Ainsi, nous pourrions penser que c'est l'association entre la perte du domaine exonucléasique de POLE et un dysfonctionnement des mécanismes de réparation qui vont concourir à la tumorigénèse. Cette mutation de POLE est d'ailleurs fréquemment associée à des anomalies du mécanisme de réparation des mésappariements. D'autre part, la seconde hypothèse quant à cette discordance renvoie au temps d'incubation suite aux transfections successives qui

pourrait également être insuffisant pour l'accumulation de mutations conduisant à la mort cellulaire. La perte de certains gènes essentiels pourrait ainsi nécessiter plus de temps pour être délétère.

Enfin, toujours dans l'idée d'étendre notre méthodologie et de valider sa fonctionnalité, nous avons généré un second modèle d'étude suivant le protocole décrit précédemment : les HAP KO XRCC4 polyclonales. L'édition dans ce deuxième modèle de différents variants de BRCA1 a permis de valider les scores fonctionnels obtenus précédemment (Résultats complémentaires 5A), confortant au passage la classification de p.Gln210= comme variant pathogénique. L'une des principales limites actuelles de notre test fonctionnel est la nécessité de la présence d'un motif PAM suffisamment proche de la mutation d'intérêt (20 à 25nt maximum). Cependant, des Cas9 protéiques provenant d'autres espèces bactériennes arrivent actuellement sur le marché, multipliant les possibilités³⁶¹. Ainsi, nous avons testé l'édition en présence de Cpf1 protéique en suivant la même méthodologie. La mutation étudiée, p.Tyr422X, a obtenu à nouveau un score pathogène (Résultats complémentaires 5B). Cependant, l'efficacité d'édition est plus faible et le protocole mérite d'être optimisé.

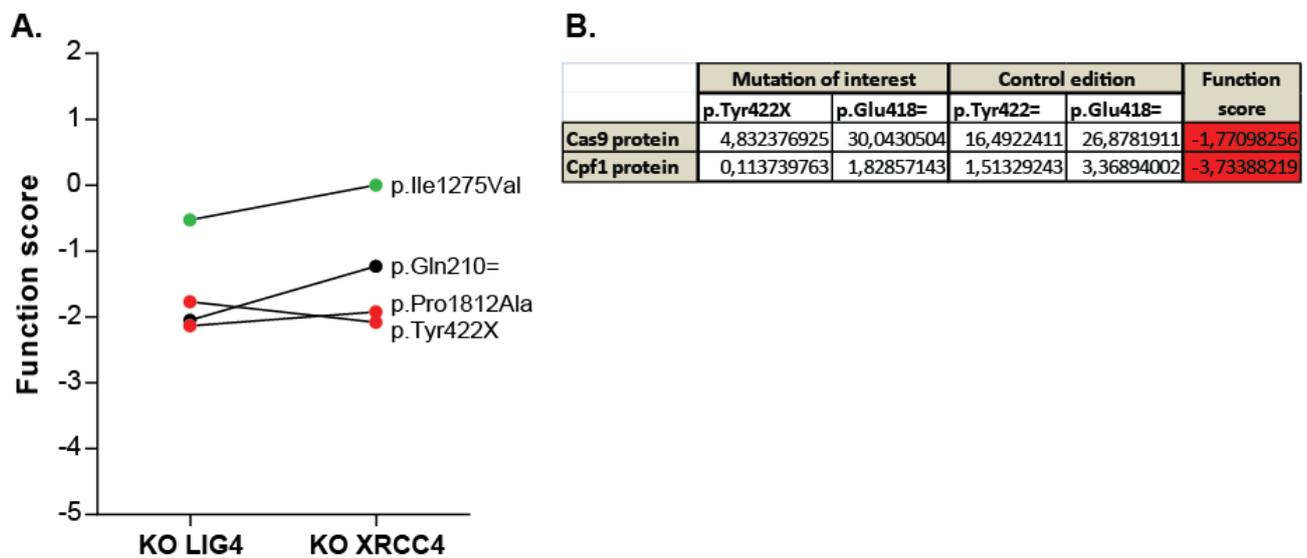


Figure 20 - Résultats complémentaires 5 : Extension des possibilités de la méthode de caractérisation fonctionnelle des VSI.

A. Scores obtenus après édition dans la lignée polyclonales HAP1 KO XRCC4, par comparaison au modèle présenté dans l'article KO LIG4, de mutations bénignes ou pathogènes de BRCA1. Mutations pathogène en rouge, mutation bénigne en vert et mutation de signification inconnue en noire. **B.** Résultats obtenus par séquençage NGS et scores fonctionnelles correspondants suite à l'édition par Cpf1 et la Cas9, toutes deux protéiques, de la même altération pathogène de BRCA1, p.Tyr422X.

Très récemment, l'apparition du « prime editing » nous offre des perspectives de développement intéressantes³⁶². Dans cette nouvelle génération d'outil d'édition génomique, la fusion d'une Cas9 modifiée à une réverse transcriptase permet une édition génomique sans coupures doubles brins de l'ADN ni oligonucléotides donneurs. De plus, le « prime editing » permet l'édition non seulement de mutations ponctuelles mais également d'insertions ou de délétions. Le pegRNA alors utilisé nécessite toujours la présence d'un motif PAM mais la mutation peut être beaucoup plus éloignée de cette séquence élargissant les possibilités d'études. L'utilisation de cet outil en suivant le protocole développé ici pourrait donc permettre la caractérisation de nombreux variants, de BRCA1/2, d'autres gènes de la recombinaison homologue ou plus généralement de tous les gènes suppresseurs de tumeurs de notre modèle d'étude ; et ce, toujours dans un délai de 3 semaines compatibles avec les impératifs clinique.

Conclusion générale de la partie 2

L'étude et la caractérisation fonctionnelle des VSI de BRCA1 et BRCA2 constituent l'objectif principal de la deuxième partie de ces travaux de thèse. D'abord, grâce à l'étude des variants affectant l'épissage directement au niveau transcriptionnel, certains VSI de BRCA1 ont pu être classifiés. C'est ensuite l'outil d'édition génomique CRISPR-Cas9 et la mise en place de notre modèle de lignée haploïde modifiée dans lesquels nos gènes d'intérêt sont essentiels qui a permis le progrès le plus important.

Les résultats obtenus sont, d'une part, corrélés à la bibliographie ainsi qu'à nos résultats précédents. Mais l'avantage majeur de la méthodologie mise en place est la possibilité de réaliser la caractérisation fonctionnelle d'un VSI en trois semaines, temps compatibles avec les impératifs diagnostics avant décision thérapeutique. Suite à la corrélation observée entre le devenir des patients sous iPARP et les effets transcriptionnels mineurs ou majeurs des différents variants dans l'article 4, il sera intéressant de croiser ces différents éléments avec le score fonctionnel établi (Figure 21) lors d'une étude clinique de phase 2 en cours de discussion.

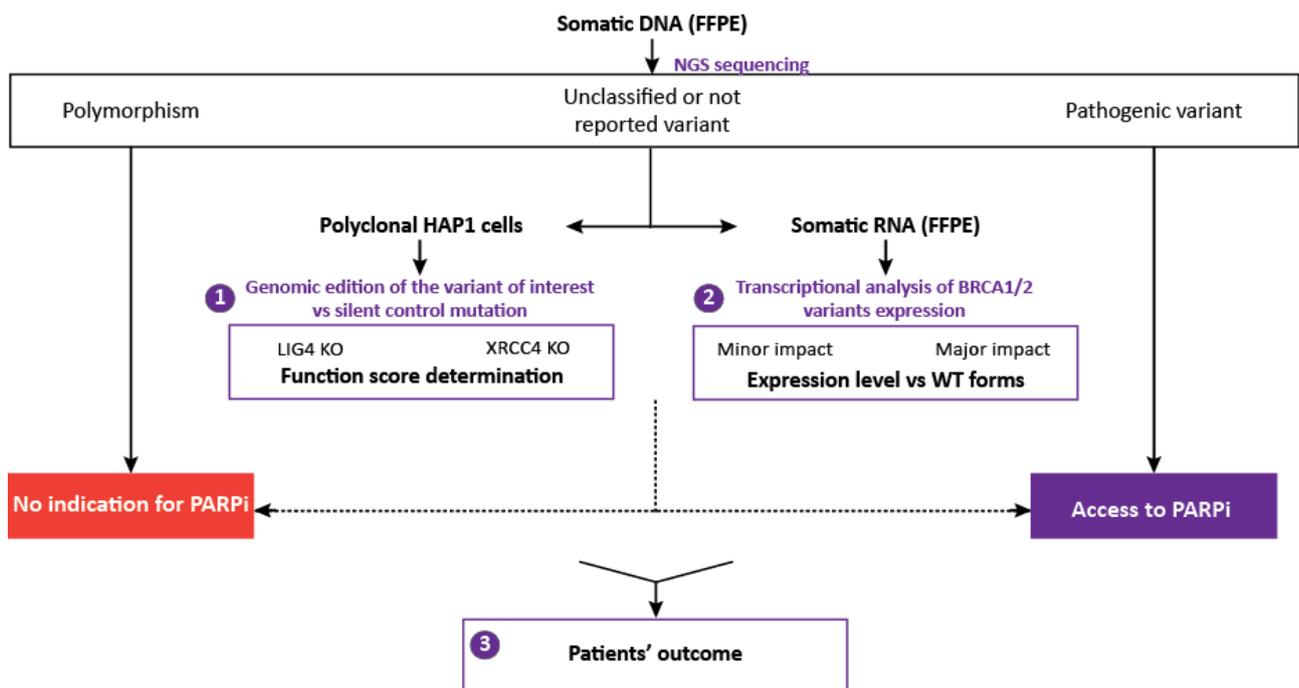


Figure 21 : Proposition de protocole pouvant être appliqué lors de la caractérisation par séquençage NGS de VSI de BRCA1/2.

D'autre part, la méthodologie présentée ici traite principalement des VSI de BRCA1 et BRCA2 mais pourrait être étendue à l'ensemble des gènes de la recombinaison homologe. Ces derniers sont également associés à une sensibilité plus importante aux iPARP dans les différentes localisations tumorales présentées précédemment (ovaire, sein, prostate, pancréas). Plus largement, elle pourrait être étendue à l'ensemble des gènes suppresseurs de tumeurs essentiels dans notre modèle³⁵⁴, illustré ici par la caractérisation fonctionnelle de variants de POLE. D'autre part, nous pouvons également penser que nous

pourrions de même caractériser des variants oncogéniques en associant l'édition génomique à une exposition à un traitement auquel la mutation conférerait une sensibilité. L'ajout de cette incubation ajouterait cependant un délai d'une semaine avant rendu du résultat. Enfin, et au-delà de l'oncologie, la combinaison de notre méthodologie au nouvel outil que constitue le prime editing, permettrait virtuellement l'étude fonctionnelle de 89% des altérations génétiques associées à des pathologies humaines³⁶² soit plus de 75 000 altérations génétiques.

Discussion générale et perspectives

Les thérapies ciblées en oncologie sont apparues depuis une quinzaine d'années. Elles ont permis des progrès thérapeutiques considérables et sont devenues incontournables en cancérologie. Leur développement exponentiel s'explique par la multiplicité des biomarqueurs identifiés en partie liés à la disposition d'une rupture technologique concernant le séquençage nouvelle génération. Les mécanismes d'action de ces nouveaux médicaments reposent sur deux grands principes fondamentaux, l'addiction oncogénique et la létalité synthétique, tous deux abordés au cours de ces travaux. A travers l'étude de deux localisations tumorales fondamentalement différentes, les cancers bronchiques et ovariens, nous avons pu aborder les principales caractéristiques inhérentes aux thérapies ciblées. L'objectif de ces travaux était cependant d'évoquer les limitations actuelles de ces nouveaux traitements et de repousser si possible leurs limites en pratique courante. En effet, sans répondre à tous ces enjeux majeurs de l'oncologie, nous avons évoqué quelques pistes d'étude que nous résumerons ici (Figure 22).

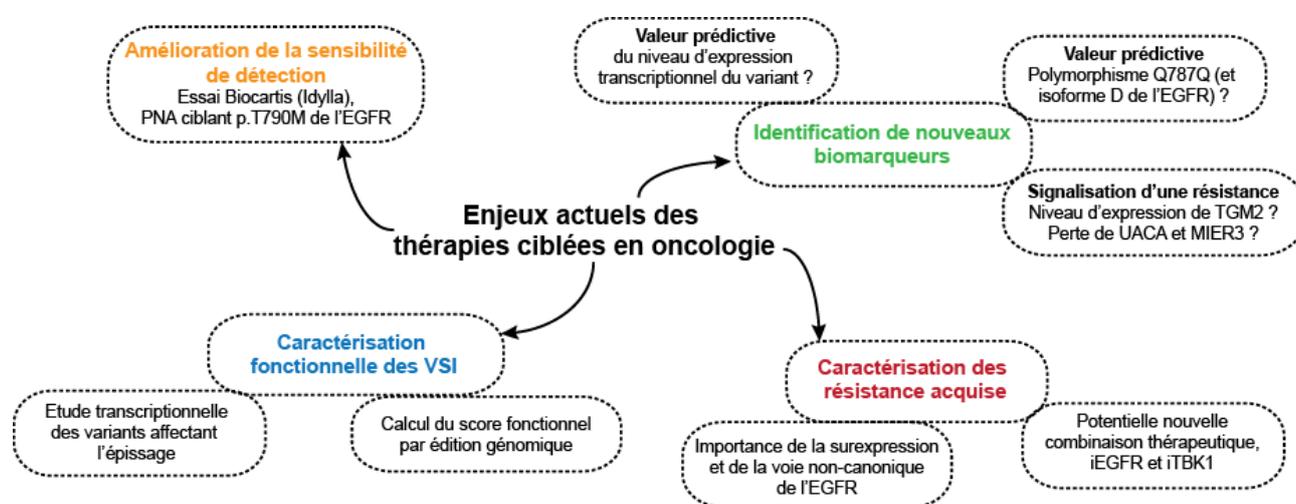


Figure 22 : Schéma-bilan résumant les différents travaux et résultats obtenus lors de ces travaux de thèse.

Amélioration de la sensibilité de détection

Les décès liés au cancer interviennent principalement au stade métastatique (90%)¹³, les diagnostics trop tardifs sont donc partiellement responsables, en particulier dans les cancers bronchiques⁶⁶. Lors de ces travaux de thèse, nous avons évoqué cette problématique en évaluant différentes méthodologies permettant une amélioration de la sensibilité de détection des biomarqueurs et du délai de rendu des résultats de caractérisation des cibles. Une première étude, prospective, interrogeant la spécificité et la sensibilité de détection des mutations les plus fréquentes de l'EGFR dans les CBNPC par la technologie Biocartis (Idylla) a d'abord été réalisée (Article 1). Cette technologie en cours de déploiement dans les laboratoires non spécialisés repose sur l'utilisation directe du prélèvement et permet un gain de temps considérable. La sensibilité pour certaines mutations ciblées est cependant inférieure aux pratiques par NGS et nous avons décrits plusieurs cas discordants. Les résultats ainsi obtenus incitent donc à une grande prudence sur l'usage unique de cette technologie dans une équipe non spécialisée en biologie moléculaire. Une seconde étude a été réalisée concernant la mutation de résistance

aux ITK-EGFR de première génération p.Thr790Met de l'EGFR à l'aide de peptide nucléique acide (Article 2). Favorisant un enrichissement de la fraction mutée lors de l'analyse par pyroséquençage, les PNA améliorent effectivement la sensibilité de détection. Cette méthode ciblée très sensible est cependant qualitative et non quantitative.

L'amélioration de la détection des biomarqueurs, de sensibilité ou résistance et du temps de rendu du résultat au prescripteur, favorise un diagnostic plus précoce donc un accès ou une adaptation plus rapide des thérapies ciblées augmentant les chances de survie du patient. Cette plus grande sensibilité permet également d'envisager des analyses de l'ADN tumoral circulant sur biopsies liquides (sang, liquide céphalo-rachidien, lavage broncho-alvéolaire...).

Identification de nouveaux biomarqueurs

La caractérisation de nouveaux biomarqueurs, théranostiques ou pronostiques, donnant des indications de sensibilité ou de résistance aux thérapies constitue le second enjeu abordé dans ces travaux. Nous avons, dans un premier temps, observé une augmentation de la fréquence d'apparition du polymorphisme p.Gln787Gln dans notre cohorte de patients présentant des CBNPC mutés EGFR ayant rechutés sous ITK-EGFR (Cohorte Article 2). La valeur prédictive de ce polymorphisme dans ce contexte n'a pas été précédemment décrite. Elle pourrait cependant, selon la bibliographie, être corrélée à une expression plus importante de l'isoforme D du récepteur à l'EGF qui ne possède pas de domaine tyrosine kinase et serait donc moins sensible à l'inhibition, favorisant ainsi la rechute malgré une sensibilité initiale au traitement. D'autre part, notre troisième étude sur ce même récepteur dans les CBNPC a également permis la mise en évidence par analyse transcriptomique de potentiels biomarqueurs de résistance acquise aux ITK-EGFR (Article 3). Le maintien de l'expression de TGM2 a, dans notre modèle, été corrélé à une résistance acquise au traitement. Or, une forte expression de cette même protéine avait déjà été corrélée à un mauvais pronostic dans d'autres localisations tumorales. TGM2 devient donc un candidat biomarqueur d'une résistance acquise au traitement. Dans ce même article, nous avons également évoqué les pertes d'expressions de MIER3 et UACA lors de la résistance acquise, probablement associés à la signature de résistance TBK1 que nous avons mis en évidence.

Par ailleurs, dans des cancers ovariens lors de l'évaluation de l'expression transcriptionnelle de variants d'épissage de BRCA1 par comparaison avec les transcrits non mutés, nous avons observé une corrélation entre le niveau d'expression du transcrit muté et le devenir du patient (Article 4). En effet, lors de la présence d'un variant à l'impact mineur sur l'expression transcriptionnelle, la rechute sous iPARP semble plus précoce. Cette observation a cependant été réalisée sur un nombre très faible de patients et une étude sur une cohorte plus importante devra être envisagée.

En résumé, la caractérisation de ces nouveaux biomarqueurs a pour objectif une amélioration de la prise de décision thérapeutique et du suivi de l'évolution tumorale ainsi que l'identification éventuelle de nouvelles cibles thérapeutiques et donc de nouvelles opportunités de traitements.

Caractérisation de nouveaux mécanismes de résistance acquise aux ITK-EGFR

La résistance acquise aux ITK-EGFR dans les CBNPC sensibles est un phénomène récurrent après administration continue du traitement ciblé en raison de la redondance des voies de signalisation cellulaires et de la considérable plasticité des cellules tumorales. Les différents mécanismes de résistances impliqués ont fait l'objet de nombreuses études mais 15 à 20% sont encore d'origines non identifiées¹⁴⁰. Nous avons donc reproduit cette résistance acquise *in vitro* par mutagenèse aléatoire puis application d'une pression de sélection à l'aide d'un ITK-EGFR (Article 3). Le modèle d'étude résultant a favorisé la caractérisation d'un nouveau mécanisme de résistance acquise aux ITK-EGFR de première mais aussi de troisième génération. La signature TBK1 de résistance aux ITK-EGFR ainsi que l'effet synergique de la co-inhibition EGFR/TBK1 dans nos cellules résistantes, et dans les lignées cellulaires présentant une addiction oncogénique à l'EGFR, nous semble particulièrement intéressantes. Cette caractérisation *in vitro* démontre également l'importance de l'activation de la voie non canonique du récepteur lors de sa surexpression, très fréquente dans les CBNPC¹¹². Passant par TBK1, cette voie non canonique n'est pas prise en considération à ce jour et pourrait participer à la résistance acquise aux ITK-EGFR. Le rôle et l'importance de cette voie de signalisation dans la résistance acquise doivent être vérifiés dans une étude clinique.

La caractérisation de nouveaux mécanismes de résistance favorise l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et ainsi la proposition éventuelle de nouvelles combinaisons médicamenteuses.

Caractérisation fonctionnelle des variants de signification inconnue

La présence de variants non annotés ou de signification biologique inconnue est une limite majeure à la prescription des thérapies ciblées. Elle prive les patients d'un traitement qui pourrait être plus efficace tout en entraînant moins d'effets secondaires. Seule une étude fonctionnelle de ces VSI peut permettre d'exclure ou d'inclure un patient dans un protocole de thérapie ciblée. L'étude que nous avons menée sur l'impact fonctionnel de ces VSI s'est dans un premier temps focalisée sur la caractérisation des mutations de BRCA1 puis BRCA2, dont la pathogénie permet l'accès aux inhibiteurs de PARP dans les cancers ovariens. Ce sont d'abord des variants de BRCA1 affectant potentiellement l'épissage qui ont été caractérisés en analysant leurs conséquences transcriptionnelles (Article 4). Cette évaluation directement à partir des ARNm extraits de prélèvements d'origine FFPE a permis l'analyse de leur pathogénie permettant l'accès des patients aux iPARP. Nous avons démontré que cette approche est également applicable à l'étude de mutations affectant l'épissage d'autres gènes tel que c-MET dans les CBNPC.

Afin de pouvoir évaluer les conséquences biologiques de tous types de variants de BRCA1 et BRCA2, nous avons mis au point une méthodologie basée sur l'édition génomique. Elle repose pour cela sur l'essentialité de ces gènes dans la lignée haploïde HAP1 polyclonale, que nous avons modifiée au niveau de ses mécanismes de réparation (Article 5). Pour cela, la pathogénie d'une mutation de BRCA1/2 est évaluée par la fréquence de la mutation éditée à l'issue du séquençage comparée à celle d'un variant contrôle,

silencieux, et permettant le calcul d'un score fonctionnel. Cette étude dans un modèle unique nous a permis la caractérisation d'une trentaine de mutations constitutionnelles et somatiques de BRCA1 et BRCA2 et la reclassification de 6 d'entre elles, ouvrant potentiellement l'accès des patients aux iPARP. Réalisée dans un délai de 3 semaines, cette méthodologie est compatible avec les impératifs de temps de la prise en charge thérapeutique. Une étude clinique est ainsi envisagée afin de valider son intérêt comme analyse théranostique préalable à la prescription des iPARP dans un premier temps, et une éventuelle orientation vers une consultation oncogénétique pour la prise en charge des apparentés.

Son application peut par ailleurs être étendue de manière considérable. BRCA1 et BRCA2 sont des gènes essentiels du modèle tout comme l'ensemble des gènes de la recombinaison homologue qui sont également des indicateurs d'une sensibilité aux iPARP dans différentes localisations tumorales et qui peuvent donc être évalués par notre méthodologie. De manière plus générale, ce sont l'ensemble des suppresseurs de tumeurs essentiels dans notre modèle qui sont concernés, comme nous l'avons démontré avec l'étude des variants de POLE, biomarqueurs potentiellement prédictifs de réponse à l'immunothérapie. La combinaison de notre essai de fonctionnalité avec les progrès considérables et récents de l'édition génomique comme la disposition de nouvelle Cas, du développement de l'édition de base et plus récemment du « prime editing » offre des perspectives théranostiques considérables inaccessibles auparavant.

A l'heure de la médecine de précision, l'étude des limitations actuelles des thérapies ciblées demeure un enjeu considérable. Les ruptures technologiques concernant l'analyse des génomes étendent considérablement le paysage mutationnel des cellules tumorales. Ainsi, en dehors des mutations largement étudiées déterminant soit la sensibilité soit la résistance à des thérapies ciblées, nombre d'entre elles sont de significations inconnues. Cette constatation implique l'impossibilité d'administrer des thérapies ciblées à des patients qui auraient pourtant pu en bénéficier. La preuve fonctionnelle de pathogénie pour certaines cibles thérapeutiques devient donc un argument indispensable préalable au traitement. Par ailleurs, à la lumière des différentes observations réalisées dans ce travail et dans la littérature et malgré les progrès indéniables apportés par le séquençage ADN, il serait illusoire de résumer la sensibilité ou la résistance d'une cellule tumorale à un profil mutationnel. Ainsi, nous sommes en droit de prévoir la nécessité prochaine du séquençage d'ARN. En effet, ce type d'analyse combine l'identification des variants, celles des signatures transcriptionnelles associées ainsi que l'évaluation du niveau d'expression mineur ou majeur de ces variants, éléments dont nous avons démontré l'intérêt dans la prise de décision thérapeutique. Les analyses transcriptomiques et fonctionnelles des cellules tumorales pour chaque patient deviennent alors un des éléments indissociables de la médecine personnalisée, préventive, prédictive et participative évoluant vers une médecine des preuves ou Médecine 5P.

Bibliographie

1. Burrell, R. a, McGranahan, N., Bartek, J. & Swanton, C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* **501**, 338–45 (2013).
2. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A J. Clin.* **00**, 1–31 (2018).
3. Jemal, A. *et al.* Global Cancer Statistics: 2011. *CA. Cancer J. Clin.* **61**, 69–90 (2011).
4. Tabin, C. J. *et al.* Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* **300**, 143–149 (1982).
5. Knudson, A. G. J. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 820–823 (1971).
6. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
7. Serrano, M., Gmez-lahoz, E., Depinho, R. A., Beach, D. & Bar-sagi, D. Inhibition of Ras-Induced Proliferation and Cellular Transformation by p16. *Science (80-.).* **267**, (1995).
8. Armuth, V. & Berenblum, I. Further exploration of stages in carcinogenesis. *Carcinog. Compr. Surv.* **7**, 41–42 (1982).
9. Dagogo-Jack, I. & Shaw, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 81–94 (2017).
10. Renan, M. J. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol. Carcinog.* **7**, 139–146 (1993).
11. Hanahan, D. & Weinberg, R. a. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
12. Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585–621 (1961).
13. Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R. & Weinberg, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* **168**, 670–691 (2016).
14. Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**, 269–270 (1956).
15. Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* **140**, 883–899 (2010).
16. Martincorena, I. *et al.* Universal Patterns of Selection in Cancer and Somatic Tissues. *Cell* (2017). doi:10.1016/j.cell.2017.09.042
17. Pan, S. T., Li, Z. L., He, Z. X., Qiu, J. X. & Zhou, S. F. Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **43**, 723–737 (2016).
18. Lord, C. J. & Ashworth, A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* **481**, 287–294 (2012).
19. Alexandrov, L. B. *et al.* Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science (80-.).* **354**, 618–622 (2016).
20. Alexandrov, L. B. *et al.* Clock-like mutational processes in human somatic cells. *Nat. Genet.* **47**, 1402–1407 (2015).
21. Morganella, S. *et al.* The topography of mutational processes in breast cancer genomes. *Nat. Commun.* **7**, 11383 (2016).

22. Nik-zainal, S. *et al.* Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature* **534**, 47–54 (2016).
23. Bozic, I. *et al.* Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 18545–18550 (2010).
24. Vogelstein, B. *et al.* Cancer Genome Landscapes. *Science (80-.)*. **339**, 1546–1558 (2013).
25. Sanchez-Vega, F. *et al.* Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* **173**, 321–337.e10 (2018).
26. Robinson, D. R. *et al.* Integrative clinical genomics of metastatic cancer. *Nature* (2017). doi:10.1038/nature23306
27. Campbell, B. B. *et al.* Comprehensive Analysis of Hypermutation in Human Cancer. *Cell* 1–15 (2017). doi:10.1016/j.cell.2017.09.048
28. Zehir, A. *et al.* Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat. Med.* **23**, 703–713 (2017).
29. Bakhoun, S. F. & Cantley, L. C. The multifaceted role of chromosomal instability in cancer and its microenvironment. *Cell* **174**, 1–27 (2018).
30. Bakhoun, S. F. *et al.* Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature* **553**, 467–472 (2018).
31. Flavahan, W. A., Gaskell, E. & Bernstein, B. E. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science (80-.)*. **357**, eaal2380 (2017).
32. Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, 23–8 (1976).
33. Greaves, M. & Maley, C. C. Clonal evolution in cancer. *Nature* **481**, 306–313 (2012).
34. Klein, C. A. Parallel progression of tumour and metastases. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 156 (2009).
35. Visvader, J. E. Cells of origin in cancer. *Nature* (2011). doi:10.1038/nature09781
36. Maley, C. C. *et al.* Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 605–619 (2017).
37. Lawrence, M. S. *et al.* Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* **499**, 214–218 (2013).
38. Jamal-Hanjani, M. *et al.* Tracking the Evolution of Non–Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **376**, 2109–2121 (2017).
39. Hu, Z. *et al.* Quantitative evidence for early metastatic seeding in colorectal cancer. *Nat. Genet.* **51**, (2019).
40. Ding, L. *et al.* Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* **481**, 506–510 (2012).
41. Meyer, U. a. Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 669–676 (2004).
42. Hartwell, L. H. Integrating Genetic Approaches into the Discovery of Anticancer Drugs. *Science (80-.)*. **278**, 1064–1068 (1997).
43. Sawyers, C. L. The cancer biomarker problem. *Nature* **452**, 548–52 (2008).
44. Van't Veer, L. J. & Bernards, R. Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature* **452**, 564–570 (2008).

45. Sawyers, C. Targeted cancer therapy. *Nature* **432**, 294–297 (2004).
46. Huang, M., Shen, A., Ding, J. & Geng, M. Molecularly targeted cancer therapy: some lessons from the past decade. *Trends Pharmacol. Sci.* **35**, 41–50 (2014).
47. Hudziak, R. M. *et al.* p185HER2 Monoclonal Antibody Has Antiproliferative Effects In Vitro and Sensitizes Human Breast Tumor Cells to Tumor Necrosis Factor. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1165–1172 (1989).
48. Quintás-Cardama, A., Kantarjian, H. & Cortes, J. Imatinib and beyond - Exploring the full potential of targeted therapy for CML. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 535–543 (2009).
49. O'Brien, S. G. *et al.* Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **348**, 994–1004 (2003).
50. Garnett, M. J. *et al.* Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. *Nature* **483**, 570–575 (2012).
51. Weinstein, I. B. Addiction to Oncogenes—the Achilles Heal of Cancer. *Science (80-.)*. **297**, 64–65 (2002).
52. Weinstein, I. B. & Joe, A. Oncogene Addiction. *Cancer Res.* 3077–3081 (2008). doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-3293
53. Sharma, S. V. *et al.* 'Oncogenic shock': Explaining oncogene addiction through differential signal attenuation. in *Clinical Cancer Research* **12**, 4392–4395 (2006).
54. Luo, J., Solimini, N. L. & Elledge, S. J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell* **136**, 823–837 (2009).
55. Kaelin, W. G. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 689–698 (2005).
56. Dobzhansky, T. Genetics of natural populations; recombination and variability in populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **31**, 269–290 (1946).
57. O'Neil, N. J., Bailey, M. L. & Hieter, P. Synthetic lethality and cancer. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 613–623 (2017).
58. Lord, C. J., Tutt, A. N. J. & Ashworth, A. Synthetic Lethality and Cancer Therapy: Lessons Learned from the Development of PARP Inhibitors. *Annu. Rev. Med.* **66**, 455–470 (2015).
59. Ashworth, A., Lord, C. J. & Reis-Filho, J. S. Genetic interactions in cancer progression and treatment (. *Cell* **145**, 30–38 (2011).
60. Costanzo, M. *et al.* A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function. *Science (80-.)*. **353**, (2016).
61. Barbie, D. A. *et al.* Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* **462**, 108–112 (2009).
62. Wang, Y. K. *et al.* Genomic consequences of aberrant DNA repair mechanisms stratify ovarian cancer histotypes. *Nat. Genet.* **49**, 856–864 (2017).
63. Farmer, H. *et al.* Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**, 917–21 (2005).
64. Bryant, H. E. *et al.* Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* **434**, 913–917 (2005).
65. Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E. & Adjei, A. A. Non-small cell lung cancer:

- epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin. Proc.* **83**, 584–94 (2008).
66. Herbst, R. S., Heymach, J. V. & Lippman, S. M. Molecular Origins of Cancer Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **6**, 53–55 (2008).
 67. Hung, R. J. *et al.* A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature* **452**, 633–637 (2008).
 68. Zheng, Z. *et al.* DNA Synthesis and Repair Genes RRM1 and ERCC1 in Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **356**, 800–808 (2007).
 69. Hosgood, D. *et al.* The Potential Role of LungMicrobiota in Lung Cancer Attributed to Household Coal Burning Exposures. *Environ. Mol. Mutagen.* **51**, 229–235 (2014).
 70. Vargas, A. J. & Harris, C. C. Biomarker development in the precision medicine era: lung cancer as a case study. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 525–537 (2016).
 71. Spira, A. *et al.* Airway epithelial gene expression in the diagnostic evaluation of smokers with suspect lung cancer. *Nat. Med.* **13**, 361–366 (2007).
 72. Wistuba, I. I., Mao, L. & Gazdar, A. F. Smoking molecular damage in bronchial epithelium. *Oncogene* **21**, 7298–7306 (2002).
 73. Brock, M. V. *et al.* DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1118–1128 (2008).
 74. Gazdar, A. F., Bunn, P. A. & Minna, J. D. Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 725–737 (2017).
 75. Borges, M. *et al.* An achaete-scute homologue essential for neuroendocrine differentiation in the lung. *Nature* **386**, 852–855 (1997).
 76. Pao, W. & Girard, N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* **12**, 175–180 (2011).
 77. Meador, C. B. *et al.* Beyond histology: Translating tumor genotypes into clinically effective targeted therapies. *Clin. Cancer Res.* **20**, 2264–2275 (2014).
 78. Heigener, D. F. & Reck, M. Lung cancer 2017: Giant steps and stumbling blocks. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 71–72 (2017).
 79. Barlesi, F. *et al.* Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: Results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet* **387**, 1415–1426 (2016).
 80. Skoulidis, F. & Heymach, J. V. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nat. Rev. Cancer* **19**, (2019).
 81. Lindsay, C. R. & Blackhall, F. H. Direct Ras G12C inhibitors: crossing the rubicon. *Br. J. Cancer* **121**, 197–198 (2019).
 82. Zhang, X. T. *et al.* The EGFR mutation and its correlation with response of gefitinib in previously treated Chinese patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* **16**, 1334–1342 (2005).
 83. Haghgoo, S. M. *et al.* Pharmacogenomics and targeted therapy of cancer: Focusing on non-small cell lung cancer. *Eur. J. Pharmacol.* **754**, 82–91 (2015).
 84. Ji, H. *et al.* LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature* **448**, 807–810 (2007).
 85. Whitsett, T. G., Richer, A., Friel, J., Carson, V. & Inge, L. Genomic profiling toward precision medicine in

- non-small cell lung cancer: getting beyond EGFR. *Pharmgenomics. Pers. Med.* **63** (2015). doi:10.2147/PGPM.S52845
86. Mok, T. S. *et al.* Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* **361**, 947–957 (2009).
 87. Mok, T. S. *et al.* Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* **362**, 2251–2259 (2009).
 88. Rosell, R. *et al.* Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): A multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **13**, 239–246 (2012).
 89. Miller, V. A. *et al.* Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): A phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncol.* **13**, 528–538 (2012).
 90. Goss, G. *et al.* Osimertinib for pretreated EGFR Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **17**, 1643–1652 (2016).
 91. Soria, J.-C. *et al.* Osimertinib in Untreated EGFR -Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* NEJMoa1713137 (2017). doi:10.1056/NEJMoa1713137
 92. Hynes, N. E. & MacDonald, G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 177–184 (2009).
 93. Velu, T. J. Structure, function and transforming potential of the epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* **70**, 205–216 (1990).
 94. Ogiso, H. *et al.* Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* **110**, 775–787 (2002).
 95. Kovacs, E., Zorn, J. A., Huang, Y., Barros, T. & Kuriyan, J. A Structural Perspective on the Regulation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 739–764 (2015).
 96. Thiel, K. W. & Carpenter, G. Epidermal growth factor receptor juxtamembrane region regulates allosteric tyrosine kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19238–19243 (2007).
 97. Red Brewer, M. *et al.* The Juxtamembrane Region of the EGF Receptor Functions as an Activation Domain. *Mol. Cell* **34**, 641–651 (2009).
 98. Kovacs, E. *et al.* Analysis of the role of the C-terminal tail in the regulation of the epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* **1162**, MCB.00248-15 (2015).
 99. Schlange, T., Matsuda, Y., Lienhard, S., Huber, A. & Hynes, N. E. Autocrine WNT signaling contributes to breast cancer cell proliferation via the canonical WNT pathway and EGFR transactivation. *Breast Cancer Res.* **9**, 1–15 (2007).
 100. Hynes, N. E. & Lane, H. a. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 341–54 (2005).
 101. Jura, N. *et al.* Catalytic Control in the EGF Receptor and Its Connection to General Kinase Regulatory Mechanisms. *Mol. Cell* **42**, 9–22 (2011).
 102. Red Brewer, M. *et al.* Mechanism for activation of mutated epidermal growth factor receptors in lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E3595-604 (2013).
 103. Allison, M. Turning the tide in lung cancer. *Nat. Biotechnol.* **28**, 999–1002 (2010).

104. Ono, M. *et al.* Sensitivity to gefitinib (Iressa, ZD1839) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with dependence on the epidermal growth factor (EGF) receptor/extracellular signal-regulated kinase 1/2 and EGF receptor/Akt pathway for proliferation. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 465–472 (2004).
105. Hirsch, F. R. *et al.* Epidermal growth factor receptor inhibition in lung cancer: status 2012. *J. Thorac. Oncol.* **8**, 373–84 (2013).
106. Avraham, R. & Yarden, Y. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 104–117 (2011).
107. Kirisits, A., Pils, D. & Krainer, M. Epidermal growth factor receptor degradation: An alternative view of oncogenic pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 2173–2182 (2007).
108. Levkowitz, G. *et al.* Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol. Cell* **4**, 1029–1040 (1999).
109. Downward, J. *et al.* Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* **307**, 521–527 (1984).
110. Kim, Y., Apetri, M., Luo, B. B., Settleman, J. E. & Anderson, K. S. Differential effects of tyrosine kinase inhibitors on normal and oncogenic EGFR signaling and downstream effectors. *Mol. Cancer Res.* **13**, 765–774 (2015).
111. Greulich, H. *et al.* Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants. *PLoS Med.* **2**, 1167–1176 (2005).
112. Sharma, S. V., Bell, D., Settleman, J. & Haber, D. A. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature Reviews Cancer* **7**, (2007).
113. Politi, K. *et al.* Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. *Genes Dev.* **20**, 1496–1510 (2006).
114. Shan, Y. *et al.* Oncogenic mutations counteract intrinsic disorder in the EGFR kinase and promote receptor dimerization. *Cell* **149**, 860–870 (2012).
115. Ji, H. *et al.* Epidermal growth factor receptor variant III mutations in lung tumorigenesis and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7817–7822 (2006).
116. Engelman, J. A. *et al.* ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3788–3793 (2005).
117. Wu, C. J. *et al.* A predictive phosphorylation signature of lung cancer. *PLoS One* **4**, 1–9 (2009).
118. Paez, J. G. *et al.* EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science (80-.).* **304**, 1497–1501 (2004).
119. Lynch, T. J. *et al.* Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N. Engl. J. Med.* **350**, (2004).
120. Pao, W. *et al.* EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from 'never smokers' and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 13306–13311 (2004).
121. Han, S. *et al.* Predictive and Prognostic Impact of Epidermal Growth Factor Receptor Mutation in Non - Small-Cell Lung Cancer Patients Treated With Gefitinib. *Clin. Oncol.* **23**, 2493–2501 (2005).
122. Jackman, D. M. *et al.* Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated

- with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib. *Clin. Cancer Res.* **12**, 3908–3914 (2006).
123. Chou, T. *et al.* Mutation in the Tyrosine Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor Is a Predictive and Prognostic Factor for Gefitinib treatment in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**, 3750–3758 (2005).
 124. Lee, C. K. *et al.* Gefitinib or Erlotinib vs Chemotherapy for EGFR Mutation-Positive Lung Cancer: Individual Patient Data Meta-Analysis of Overall Survival. *J. Natl. Cancer Inst.* **109**, 1–9 (2017).
 125. Ballard, P. *et al.* Preclinical comparison of osimertinib with other EGFR-TKIs in EGFR-mutant NSCLC brain metastases models, and early evidence of clinical brain metastases activity. *Clin. Cancer Res.* **22**, 5130–5140 (2016).
 126. Jackman, D. *et al.* Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 357–360 (2010).
 127. Cortot, B. & Janne, P. a. Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *Eur. Respir. Rev.* **23**, 356–366 (2014).
 128. Alfieri, R. R. *et al.* Metabolism of the EGFR tyrosin kinase inhibitor gefitinib by cytochrome P450 1A1 enzyme in EGFR-wild type non small cell lung cancer cell lines. *Mol. Cancer* **10**, 1–14 (2011).
 129. Filosto, S., Becker, C. R. & Goldkorn, T. Cigarette smoke induces aberrant EGF receptor activation that mediates lung cancer development and resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* **11**, 795–804 (2012).
 130. Costa, C. *et al.* The impact of EGFR T790M mutations and BIM mRNA expression on outcome in patients with EGFR-Mutant NSCLC treated with erlotinib or chemotherapy in the randomized phase III EURTAC trial. *Clin. Cancer Res.* **20**, 2001–2010 (2014).
 131. Bell, D. W. *et al.* Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nat. Genet.* **37**, 1315–1316 (2005).
 132. Bivona, T. G. *et al.* FAS and NF- κ B signalling modulate dependence of lung cancers on mutant EGFR. *Nature* **471**, 523–526 (2011).
 133. Stewart, E. L., Tan, S. Z., Liu, G. & Tsao, M. Known and putative mechanisms of resistance to EGFR targeted therapies in NSCLC patients with EGFR mutations — a review. *Transl. Lung Cancer Res.* **4**, 67–81 (2015).
 134. Erjala, K. *et al.* Signaling via ErbB2 and ErbB3 associates with resistance and epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification with sensitivity to EGFR inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* **12**, 4103–4111 (2006).
 135. Yamamoto, C. *et al.* Loss of PTEN expression by blocking nuclear translocation of EGR1 in gefitinib-resistant lung cancer cells harboring epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res.* **70**, 8715–8725 (2010).
 136. Bianco, R. *et al.* Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* **22**, 2812–2822 (2003).
 137. Maheswaran, S. *et al.* Detection of Mutations in EGFR in Circulating Lung-Cancer Cells. *N. Engl. J. Med.* **359**, (2008).
 138. Balak, M. N. *et al.* Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor

- receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6494–6501 (2006).
139. Yu, H. A. *et al.* Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin. Cancer Res.* **19**, 2240–2247 (2013).
 140. Rotow, J. & Bivona, T. G. Understanding and targeting resistance mechanisms in NSCLC. *Nat. Publ. Gr.* **17**, 637–658 (2017).
 141. Forde, P. M. & Ettinger, D. S. Managing Acquired Resistance in EGFR - Mutated Non - Small Cell Lung Cancer. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* **13**, 528–532 (2015).
 142. Jotte, R. M. & Spigel, D. R. Advances in molecular- based personalized non- small- cell lung cancer therapy: targeting epidermal growth factor receptor and mechanisms of resistance. *Cancer Med.* 1–12 (2015). doi:10.1002/cam4.506
 143. Nguyen, K. H., Kobayashi, S. & Costa, D. B. Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Non - Small-Cell Lung Cancers Dependent on the Epidermal Growth Factor Receptor Pathway. *Clin. Lung Cancer* **10**, 281–289 (2009).
 144. Engelman, J. A. *et al.* Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. *J. Clin. Invest.* **116**, 2695–2706 (2006).
 145. Soucheray, M. *et al.* Intratumoral Heterogeneity in EGFR-Mutant NSCLC Results in Divergent Resistance Mechanisms in Response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibition. *Cancer Res.* **75**, 4372–4384 (2015).
 146. Yun, C.-H. *et al.* The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 2070–2075 (2008).
 147. Fujii, A. *et al.* Hypermethylation of the CpG dinucleotide in epidermal growth factor receptor codon 790: implications for a mutational hotspot leading to the T790M mutation in non-small-cell lung cancer. *Cancer Genet.* (2015). doi:10.1016/j.cancergen.2014.12.005
 148. Camidge, D. R., Pao, W. & Sequist, L. V. Acquired resistance to TKIs in solid tumours : learning from lung cancer. *Nat. Publ. Gr.* **11**, 473–481 (2014).
 149. Sequist, L. V. *et al.* Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci. Transl. Med.* **3**, (2011).
 150. Li, M. *et al.* Balancing Protein Stability and Activity in Cancer: A New Approach for Identifying Driver Mutations Affecting CBL Ubiquitin Ligase Activation. *Cancer Res.* **76**, 561–571 (2016).
 151. Sawai, A. *et al.* Inhibition of Hsp90 down-regulates mutant epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and sensitizes EGFR mutant tumors to paclitaxel. *Cancer Res.* **68**, 589–596 (2008).
 152. Xia, W. *et al.* An heregulin-EGFR-HER3 autocrine signaling axis can mediate acquired lapatinib resistance in HER2+ breast cancer models. *Breast Cancer Res.* **15**, (2013).
 153. Huang, Y., Benaich, N., Tape, C., Kwok, H. F. & Murphy, G. Targeting the sheddase activity of Adam17 by an Anti-ADAM17 antibody D1(A12) inhibits head and neck squamous cell carcinoma cell proliferation and motility via blockage of bradykinin induced HERs transactivation. *Int. J. Biol. Sci.* **10**, 702–714 (2014).
 154. Engelman, J. A. *et al.* MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science (80-.).* **316**, 1039–1043 (2007).
 155. Takezawa, K. *et al.* HER2 amplification: A potential mechanism of acquired resistance to egfr inhibition

- in EGFR -mutant lung cancers that lack the second-site EGFR T790M mutation. *Cancer Discov.* **2**, 922–933 (2012).
156. Terai, H. *et al.* Activation of the FGF2-FGFR1 autocrine pathway: A novel mechanism of acquired resistance to gefitinib in NSCLC. *Mol. Cancer Res.* **11**, 759–767 (2013).
 157. Sharifnia, T. *et al.* Genetic modifiers of EGFR dependence in non-small cell lung cancer. **111**, (2014).
 158. Özvegy-Laczka, C., Cserepes, J., Elkind, N. B. & Sarkadi, B. Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: Role of ABC multidrug transporters. *Drug Resist. Updat.* **8**, 15–26 (2005).
 159. Galetti, M. *et al.* Effect of ABCG2 / BCRP Expression on Efflux and Uptake of Gefitinib in NSCLC Cell Lines. 1–18 (2015). doi:10.1371/journal.pone.0141795
 160. Ercan, D., Xu, C. & Yanagita, M. Reactivation of ERK Signaling Causes Resistance to EGFR Kinase Inhibitors Reactivation of ERK Signaling Causes Resistance to EGFR Kinase Inhibitors. *Cancer Res.* 934–947 (2012). doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0103
 161. Tricker, E. M. *et al.* Combined EGFR/MEK inhibition prevents the emergence of resistance in EGFR-mutant lung cancer. *Cancer Discov.* **5**, 960–971 (2015).
 162. A.GOLD, K. *et al.* Clinical Trial Results A Phase I / II Study Combining Erlotinib and Dasatinib for Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncologist* **19**, 1040–1041 (2014).
 163. Buck, E. *et al.* Feedback mechanisms promote cooperativity for small molecule inhibitors of epidermal and insulin-like growth factor receptors. *Cancer Res.* **68**, 8322–8332 (2008).
 164. Sharma, S. V. *et al.* A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations. *Cell* **141**, 69–80 (2010).
 165. Blakely, C. M. *et al.* Evolution and clinical impact of co-occurring genetic alterations in advanced-stage EGFR-mutant lung cancers. *Nat. Genet.* **49**, (2017).
 166. Oser, M. G., Niederst, M. J., Sequist, L. V & Engelman, J. a. Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin. *Lancet Oncol.* **16**, e165–e172 (2015).
 167. Rastogi, I. *et al.* Mechanism of c-Met and EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance through epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **477**, 937–944 (2016).
 168. Raoof, S. *et al.* Targeting FGFR overcomes EMT-mediated resistance in EGFR mutant non-small cell lung cancer. *Oncogene* 6399–6413 (2019). doi:10.1038/s41388-019-0887-2
 169. Ayeni, D., Politi, K. & Goldberg, S. B. Emerging Agents and New Mutations in EGFR-Mutant Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **21**, 3818–3821 (2015).
 170. Thress, K. S. *et al.* Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat. Med.* **21**, (2015).
 171. Ercan, D. *et al.* EGFR mutations and resistance to Irreversible pyrimidine based EGFR inhibitors. *Clin. Cancer Res.* 3913–3924 (2015). doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2789
 172. Lizzaeri, C., Gregore, V., Karachaliou, N., Rosell, R. & Santarpia, M. Mechanisms of resistance to osimertinib. *J. Thorac. Dis.* (2019). doi:10.21037/jtd.2019.08.30
 173. Knebel, F. H. *et al.* Sequential liquid biopsies reveal dynamic alterations of EGFR driver mutations and indicate EGFR amplification as a new mechanism of resistance to osimertinib in NSCLC. *Lung Cancer*

- 108**, 238–241 (2017).
174. Minari, R. *et al.* Primary resistance to osimertinib due to SCLC transformation: Issue of T790M determination on liquid re-biopsy. *Lung Cancer* **115**, 21–27 (2018).
 175. Jia, Y. *et al.* Overcoming EGFR(T790M) and EGFR(C797S) resistance with mutant-selective allosteric inhibitors. *Nature* **534**, 129–132 (2016).
 176. Lheureux, S., Gourley, C., Vergote, I. & Oza, A. M. Epithelial ovarian cancer. *Lancet* **393**, 1240–1253 (2019).
 177. Bell, D. *et al.* Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **474**, 609–615 (2011).
 178. Norquist, B. M. *et al.* Inherited mutations in women with ovarian carcinoma. *JAMA Oncol.* **2**, 482–490 (2016).
 179. Pennington, K. P. *et al.* Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Clin. Cancer Res.* **20**, 764–775 (2014).
 180. Norquist, B. M. *et al.* Mutations in homologous recombination genes and outcomes in ovarian carcinoma patients in GOG 218: An NRG oncology/Gynecologic oncology group study. *Clin. Cancer Res.* **24**, 777–783 (2018).
 181. Pan, Z. & Xie, X. BRCA mutations in the manifestation and treatment of ovarian cancer. *Oncotarget* (2017).
 182. Tutt, A. & Ashworth, A. The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition. *Trends Mol. Med.* **8**, 571–576 (2002).
 183. Venkitaraman, A. R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**, 171–182 (2002).
 184. Roy, R., Chun, J. & Powell, S. N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 68–78 (2011).
 185. Hamada, J. *et al.* Increased Oxidative DNA Damage in Mammary Tumor Cells by Continuous Epidermal Growth Factor Stimulation. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, (2001).
 186. Evers, B. & Jonkers, J. Mouse models of BRCA1 and BRCA2 deficiency: Past lessons, current understanding and future prospects. *Oncogene* **25**, 5885–5897 (2006).
 187. Moynahan, M. E. The cancer connection: BRCA1 and BRCA2 tumor suppression in mice and humans. *Oncogene* **21**, 8994–9007 (2002).
 188. Cressman, V. L. *et al.* Mammary tumor formation in p53- and BRCA1-deficient mice. *Cell Growth Differ.* **10**, 1–10 (1999).
 189. Gowen, L. C., Johnson, B. L., Latour, A. M., Sulik, K. K. & Koller, B. H. Brca 1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nat. Genet.* **12**, 191–194 (1996).
 190. King, T. A. *et al.* Heterogenic loss of the wild-type BRCA allele in human breast tumorigenesis. *Ann. Surg. Oncol.* **14**, 2510–2518 (2007).
 191. Smith, P. D. *et al.* Novel p53 mutants selected in BRCA-associated tumours which dissociate transformation suppression from other wild-type p53 functions. *Oncogene* **18**, 2451–2459 (1999).
 192. Garsed, D. W. *et al.* Homologous recombination DNA repair pathway disruption and retinoblastoma protein loss are associated with exceptional survival in high-grade serous ovarian cancer. *Clin. Cancer*

- Res.* **24**, 569–580 (2018).
193. Rouet, P., Smih, F. & Jasin, M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 8096–8106 (1994).
 194. Tsuzuki, T. *et al.* Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 6236–6240 (1996).
 195. Lord, C. J. & Ashworth, A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the Clinic. *Science (80-.)*. **355**, 1152–1158 (2017).
 196. Weinstock, D. M. & Jasin, M. Alternative Pathways for the Repair of RAG-Induced DNA Breaks. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 131–139 (2006).
 197. Pierce, A. J., Hu, P., Han, M., Ellis, N. & Jasin, M. Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev.* **15**, 3237–3242 (2001).
 198. Allen, C., Kurimasa, A., Brenneman, M. A., Chen, D. J. & Nickoloff, J. A. DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 3758–3763 (2002).
 199. Scully, R., Panday, A., Elango, R. & Willis, N. A. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2019). doi:10.1038/s41580-019-0152-0
 200. Moynahan, M. E. & Jasin, M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 196–207 (2010).
 201. Baumann, P., Benson, F. E. & West, S. C. Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* **87**, 757–766 (1996).
 202. Sung P. Catalysis of ATP-Dependent Homologous DNA Pairing and Strand Exchange by Yeast RAD51 Protein on JSTOR. *Science (80-.)*. **265**, 1241–1243 (1994).
 203. Huen, M. S. Y., Sy, S. M. H. & Chen, J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 138–148 (2010).
 204. Sankaran, S., Crone, E. D., Palazzo, E. R. & Parvin, D. J. BRCA1 Regulates γ -Tubulin Binding to Centrosomes. *Cancer Biol. Ther.* **509**, 385–388 (2007).
 205. Daza-Martin, M. *et al.* Isomerization of BRCA1–BARD1 promotes replication fork protection. *Nature* (2019). doi:10.1038/s41586-019-1363-4
 206. Wang, B. *et al.* Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science (80-.)*. **316**, 1194–1198 (2007).
 207. Shahid, T. *et al.* Structure and mechanism of action of the BRCA2 breast cancer tumor suppressor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 962–968 (2014).
 208. Yuan, S. S. F. *et al.* BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res.* **59**, 3547–3551 (1999).
 209. Schlacher, K. *et al.* Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell* **145**, 529–542 (2011).
 210. Thorslund, T. *et al.* The breast cancer tumor suppressor BRCA2 promotes the specific targeting of RAD51 to single-stranded DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1263–1265 (2010).
 211. Gibson, B. A. & Kraus, W. L. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 411–424 (2012).

212. Bitler, B. G., Watson, Z. L., Wheeler, L. J. & Behbakht, K. PARP inhibitors: Clinical utility and possibilities of overcoming resistance. *Gynecol. Oncol.* **147**, 695–704 (2017).
213. Hu, Y. *et al.* PARP1-driven poly-ADP-ribosylation regulates BRCA1 function in homologous recombination-mediated DNA repair. *Cancer Discov.* **4**, 1430–1447 (2014).
214. El-Khamisy, S. F., Masutani, M., Suzuki, H. & Caldecott, K. W. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **31**, 5526–5533 (2003).
215. Ström, C. E. *et al.* Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate. *Nucleic Acids Res.* **39**, 3166–3175 (2011).
216. Wang, Z. Q. *et al.* PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev.* **11**, 2347–2358 (1997).
217. Ménissier De Murcia, J. *et al.* Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 7303–7307 (1997).
218. Helleday, T. The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: Clearing up the misunderstandings. *Mol. Oncol.* **5**, 387–393 (2011).
219. Maya-Mendoza, A. *et al.* High speed of fork progression induces DNA replication stress and genomic instability. *Nature* 1 (2018). doi:10.1038/s41586-018-0261-5
220. Madison, D. L. & Lundblad, J. R. C-terminal binding protein and poly(ADP)ribose polymerase 1 contribute to repression of the p21waf1/cip1 promoter. *Oncogene* **29**, 6027–6039 (2010).
221. Lee, M. H., Na, H., Kim, E. J., Lee, H. W. & Lee, M. O. Poly(ADP-ribosyl)ation of p53 induces gene-specific transcriptional repression of MTA1. *Oncogene* **31**, 5099–5107 (2012).
222. Bryant, H. E. *et al.* PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *EMBO J.* **28**, 2601–2615 (2009).
223. Oza, A. M. *et al.* Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: A randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **16**, 87–97 (2015).
224. O’Shaughnessy, J. *et al.* Iniparib plus Chemotherapy in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **364**, (2011).
225. McCabe, N. *et al.* Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res.* **66**, 8109–8115 (2006).
226. Patel, A. G., Sarkaria, J. N. & Kaufmann, S. H. Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 3406–3411 (2011).
227. Hohegger, H. *et al.* Parp-1 protects homologous recombination from interference by Ku and Ligase IV in vertebrate cells. *EMBO J.* **25**, 1305–1314 (2006).
228. Aly, A. & Ganesan, S. BRCA1, PARP, and 53BP1: Conditional synthetic lethality and synthetic viability. *J. Mol. Cell Biol.* **3**, 66–74 (2011).
229. Murai, J. *et al.* Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. *Cancer Res.* **72**, 5588–5599 (2012).
230. Mirza, M. R. *et al.* Niraparib maintenance therapy in platinum-sensitive, recurrent ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* **375**, 2154–2164 (2016).

231. Ledermann, J. *et al.* Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 1382–1392 (2012).
232. Ledermann, J. A. *et al.* Overall survival in patients with platinum-sensitive recurrent serous ovarian cancer receiving olaparib maintenance monotherapy: an updated analysis from a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **17**, 1579–1589 (2016).
233. Robson, M. *et al.* Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation. *N. Engl. J. Med.* **377**, 523–533 (2017).
234. Clarke, N. *et al.* Olaparib combined with abiraterone in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **19**, 975–986 (2018).
235. Kaufman, B. *et al.* Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *J. Clin. Oncol.* **33**, 244–250 (2015).
236. del Campo, J. M. *et al.* Niraparib Maintenance Therapy in Patients With Recurrent Ovarian Cancer After a Partial Response to the Last Platinum-Based Chemotherapy in the ENGOT-OV16/NOVA Trial. *J. Clin. Oncol.* JCO.18.02238 (2019). doi:10.1200/jco.18.02238
237. Coleman, R. L. *et al.* Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* **390**, 1949–1961 (2017).
238. Litton, J. K. *et al.* Talazoparib in patients with advanced breast cancer and a germline BRCA mutation. *N. Engl. J. Med.* **379**, 753–763 (2018).
239. Shen, Y. *et al.* BMN 673, a Novel and Highly Potent PARP1/2 Inhibitor for the Treatment of Human Cancers with DNA Repair Deficiency. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5003–5015 (2013).
240. Lee, J. M., Ledermann, J. A. & Kohn, E. C. PARP inhibitors for BRCA1/2 mutation-associated and BRCA-like malignancies. *Ann. Oncol.* **25**, 32–40 (2014).
241. Owonikoko, T. K. *et al.* Randomized phase II trial of cisplatin and etoposide in combination with veliparib or placebo for extensive-stage small-cell lung cancer: ECOG-ACRIN 2511 study. *J. Clin. Oncol.* **37**, 222–229 (2019).
242. Liu, J. F. *et al.* Combination cediranib and olaparib versus olaparib alone for women with recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: A randomised phase 2 study. *Lancet Oncol.* **15**, 1207–1214 (2014).
243. Brown, J. S., O’Carrigan, B., Jackson, S. P. & Yap, T. A. Targeting DNA repair in cancer: Beyond PARP inhibitors. *Cancer Discov.* **7**, 20–37 (2017).
244. Lord, C. J. & Ashworth, A. BRCAness revisited. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 110–20 (2016).
245. Turner, N., Tutt, A. & Ashworth, A. Opinion: Hallmarks of ‘BRCAness’ in sporadic cancers. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 814–819 (2004).
246. Catteau, A., Harris, W. H., Xu, C. F. & Solomon, E. Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: Correlation with disease characteristics. *Oncogene* **18**, 1957–1965 (1999).
247. Bianco, T., Walsh, D. C. A., Cooper, J. E. & Dobrovic, A. Tumour-specific distribution of BRCA1 promoter region methylation supports a pathogenetic role in breast and ovarian cancer Germline mutations in the BRCA1 gene lead to a very high probability of a female developing breast or ovarian cancer.

- Carcinogenesis* **21**, 147–151 (2000).
248. Hughes-Davies, L. *et al.* EMSY Links the BRCA2 Pathway to Sporadic Breast and Ovarian Cancer. *Cell* **115**, 523–535 (2003).
249. Patch, A. M. *et al.* Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature* **521**, 489–494 (2015).
250. Koboldt, D. C. *et al.* Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61–70 (2012).
251. Robinson, D. *et al.* Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* **161**, 1215–1228 (2015).
252. Waddell, N. *et al.* Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* **518**, 495–501 (2015).
253. Zimmermann, M. *et al.* CRISPR screens identify genomic ribonucleotides as a source of PARP-trapping lesions. *Nature* (2018). doi:10.1038/s41586-018-0291-z
254. Jazaeri, A. A. *et al.* Gene expression profiles of BRCA1-linked, BRCA2-linked, and sporadic ovarian cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 990–1000 (2002).
255. Konstantinopoulos, P. A. *et al.* Gene expression profile of BRCAness that correlates with responsiveness to chemotherapy and with outcome in patients with epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3555–3561 (2010).
256. Helleday, T., Eshtad, S. & Nik-Zainal, S. Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 585–598 (2014).
257. Birkbak, N. J. *et al.* Tumor mutation burden forecasts outcome in ovarian cancer with BRCA1 or BRCA2 mutations. *PLoS One* **8**, 1–11 (2013).
258. Menghi, F. *et al.* The tandem duplicator phenotype as a distinct genomic configuration in cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E2373–E2382 (2016).
259. Willis, N. A. *et al.* Mechanism of tandem duplication formation in BRCA1-mutant cells. *Nature* (2017). doi:10.1038/nature24477
260. Alexandrov, L. B. *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415–421 (2013).
261. Polak, P. *et al.* A mutational signature reveals alterations underlying deficient homologous recombination repair in breast cancer. *Nat. Genet.* (2017). doi:10.1038/ng.3934
262. Davies, H. *et al.* HRDetect is a predictor of BRCA1 and BRCA2 deficiency based on mutational signatures. *Nat. Med.* **23**, 517–525 (2017).
263. Zheng, L. *et al.* Polyploid cells rewire DNA damage response networks to overcome replication stress-induced barriers for tumour progression. *Nat. Commun.* **3**, 1–12 (2012).
264. Popova, T. *et al.* Ploidy and large-scale genomic instability consistently identify basal-like breast carcinomas with BRCA1/2 inactivation. *Cancer Res.* **72**, 5454–5462 (2012).
265. Graeser, M. *et al.* A marker of homologous recombination predicts pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **16**, 6159–6168 (2010).
266. Lord, C. J. & Ashworth, A. Mechanisms of resistance to therapies targeting BRCA-mutant cancers. *Nat. Med.* **19**, 1381–1388 (2013).

267. Noordermeer, S. M. & van Attikum, H. PARP Inhibitor Resistance: A Tug-of-War in BRCA-Mutated Cells. *Trends Cell Biol.* **29**, 820–834 (2019).
268. Rottenberg, S. *et al.* High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 17079–17084 (2008).
269. Christie, E. L. *et al.* Multiple ABCB1 transcriptional fusions in drug resistant high-grade serous ovarian and breast cancer. *Nat. Commun.* **10**, 5–14 (2019).
270. Norquist, B. *et al.* Secondary somatic mutations restoring BRCA1/2 predict chemotherapy resistance in hereditary ovarian carcinomas. *J. Clin. Oncol.* **29**, 3008–3015 (2011).
271. Edwards, S. L. *et al.* Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature* **451**, 1111–1115 (2008).
272. Lheureux, S. *et al.* Somatic BRCA1/2 recovery as a resistance mechanism after exceptional response to poly (ADP-ribose) polymerase inhibition. *J. Clin. Oncol.* **35**, 1240–1249 (2017).
273. Christie, E. L. *et al.* Reversion of BRCA1/2 germline mutations detected in circulating tumor DNA from patients with high-grade serous ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* **35**, 1274–1280 (2017).
274. Quigley, D. *et al.* Analysis of circulating cell-free DnA identifies multiclonal heterogeneity of BRCA2 reversion mutations associated with resistance to PARP inhibitors. *Cancer Discov.* **7**, 999–1005 (2017).
275. Ter Brugge, P. *et al.* Mechanisms of therapy resistance in patient-derived xenograft models of brca1-deficient breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **108**, 1–12 (2016).
276. Johnson, N. *et al.* Stabilization of mutant BRCA1 protein confers PARP inhibitor and platinum resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 17041–6 (2013).
277. Bouwman, P. *et al.* 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 688–695 (2010).
278. Xu, G. *et al.* REV7 counteracts DNA double-strand break resection and affects PARP inhibition. *Nature* **521**, 541–544 (2015).
279. Chapman, J. R. *et al.* RIF1 Is Essential for 53BP1-Dependent Nonhomologous End Joining and Suppression of DNA Double-Strand Break Resection. *Mol. Cell* **49**, 858–871 (2013).
280. Dev, H. *et al.* Shieldin complex promotes DNA end-joining and counters homologous recombination in BRCA1-null cells. *Nat. Cell Biol.* **20**, 954–965 (2018).
281. Noordermeer, S. M. *et al.* The shieldin complex mediates 53BP1-dependent DNA repair. *Nature* **560**, 117–121 (2018).
282. Nacson, J. *et al.* BRCA1 Mutation-Specific Responses to 53BP1 Loss-Induced Homologous Recombination and PARP Inhibitor Resistance. *Cell Rep.* **24**, 3513–3527.e7 (2018).
283. He, Y. J. *et al.* DYNLL1 binds to MRE11 to limit DNA end resection in BRCA1-deficient cells. *Nature* **563**, 522–526 (2018).
284. Gilibert, M. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) overexpression in human breast cancer stem cells and resistance to olaparib. *PLoS One* **9**, e104302 (2014).
285. Makvandi, M. *et al.* A Radiotracer Strategy to Quantify PARP-1 Expression In Vivo Provides a Biomarker That Can Enable Patient Selection for PARP Inhibitor Therapy. *Cancer Res.* **76**, 4516–4524 (2016).
286. Hjortkjaer, M. *et al.* The Prognostic Value of BRCA1 and PARP Expression in Epithelial Ovarian

- Carcinoma: Immunohistochemical Detection. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **36**, 180–189 (2017).
287. Pettitt, S. J. *et al.* Genome-wide and high-density CRISPR-Cas9 screens identify point mutations in PARP1 causing PARP inhibitor resistance. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
 288. Gogola, E. *et al.* Selective Loss of PARG Restores PARylation and Counteracts PARP Inhibitor-Mediated Synthetic Lethality. *Cancer Cell* **33**, 1078-1093.e12 (2018).
 289. Chaudhuri, A. R. *et al.* Replication fork stability confers chemoresistance in BRCA-deficient cells. *Nature* **535**, 382–7 (2016).
 290. Rondinelli, B. *et al.* EZH2 promotes degradation of stalled replication forks by recruiting MUS81 through histone H3 trimethylation. *Nat. Cell Biol.* **19**, 1371–1378 (2017).
 291. Murai, J. *et al.* Resistance to PARP inhibitors by SLFN11 inactivation can be overcome by ATR inhibition. *Oncotarget* **7**, 76534–76550 (2016).
 292. Yazinski, S. A. *et al.* ATR inhibition disrupts rewired homologous recombination and fork protection pathways in PARP inhibitor-resistant BRCA-deficient cancer cells. *Genes Dev.* **31**, 318–332 (2017).
 293. Robson, M. E. *et al.* American Society of Clinical Oncology Policy Statement Update: Genetic and Genomic Testing for Cancer Susceptibility. *J. Clin. Oncol.* **33**, (2015).
 294. Liu, Y. *et al.* Targeting tumor suppressor genes for cancer therapy. *BioEssays* **37**, 1277–1286 (2015).
 295. Richards, S. *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **17**, 405–424 (2015).
 296. Yang, C. *et al.* Characterization of a novel germline BRCA1 splice variant, c. 5332 + 4delA. *Breast Cancer Res. Treat.* **168**, 543–550 (2018).
 297. Fraile-Bethencourt, E. *et al.* Functional classification of DNA variants by hybrid minigenes: Identification of 30 spliceogenic variants of BRCA2 exons 17 and 18. *PLoS Genet.* **13**, 1–21 (2017).
 298. Baralle, D. & Baralle, M. Splicing in action: Assessing disease causing sequence changes. *Journal of Medical Genetics* **42**, 737–748 (2005).
 299. Hogervorst, F. B. L. *et al.* Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. *Nat. Genet.* **10**, 208–212 (1995).
 300. Jinek, M. *et al.* A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science (80-.)*. **337**, 816–822 (2012).
 301. Zhang, X.-H., Tee, L. Y., Wang, X.-G., Huang, Q.-S. & Yang, S.-H. Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Mol. Ther. Acids* **4**, e264 (2015).
 302. Rivera-Torres, N., Banas, K., Bialk, P., Bloh, K. M. & Kmiec, E. B. Insertional mutagenesis by CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein gene editing in cells targeted for point mutation repair directed by short single-stranded DNA oligonucleotides. *PLoS One* **12**, 1–18 (2017).
 303. Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281–2308 (2013).
 304. Koonin, E. V. & Makarova, K. S. Anti-CRISPRs on the march. *Science (80-.)*. **362**, 156 (2018).
 305. Makarova, K. S. *et al.* Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 467–477 (2011).
 306. Makarova, K. S. *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nat. Rev.*

- Microbiol.* **13**, 722–736 (2015).
307. Makarova, K. S., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here? *Cris. J.* **1**, 325–336 (2018).
 308. Zetsche, B. *et al.* Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell* **163**, 759–771 (2015).
 309. Strecker, J. *et al.* Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
 310. Doench, J. G. Am I ready for CRISPR? A user's guide to genetic screens. *Nat. Rev. Genet.* **19**, 67–80 (2017).
 311. Gaudelli, N. M. *et al.* Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* **551**, 464–471 (2017).
 312. Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A. & Liu, D. R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* **533**, 420–424 (2016).
 313. Paquet, D. *et al.* Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature* **533**, 125–129 (2016).
 314. Rosell, R. *et al.* Screening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *N Engl J Med* **361**, 958–67 (2009).
 315. Blumenthal, G. M. *et al.* Osimertinib for the Treatment of Metastatic EGFR T790M Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **23**, 2131–2135 (2016).
 316. Mok, T. S. *et al.* Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **376**, 629–640 (2017).
 317. Schwarzenbach, H., Hoon, D. S. B. & Pantel, K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 426–437 (2011).
 318. Heitzer, E., Ulz, P. & Geigl, J. B. Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy for Cancer. *Clin. Chem.* **61**, 112–123 (2015).
 319. Amirouchene-Angelozzi, N., Swanton, C. & Bardelli, A. Tumor evolution as a therapeutic target. *Cancer Discov.* **7**, 805–817 (2017).
 320. Oxnard, G. R. *et al.* Association between plasma genotyping and outcomes of treatment with osimertinib (AZD9291) in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **34**, 3375–3382 (2016).
 321. Luo, J., Shen, L. & Zheng, D. Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of EGFR mutation status in NSCLC: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **4**, 1–7 (2014).
 322. Jovelet, C. *et al.* Circulating cell-free tumor DNA analysis of 50 genes by next-generation sequencing in the prospective MOSCATO trial. *Clin. Cancer Res.* **22**, 2960–2968 (2016).
 323. Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Olson-Sand, A. & Anker, P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin. Chim. Acta.* **313**, 139–142 (2001).
 324. Jahr, S. *et al.* DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* **61**, 1659–1665 (2001).
 325. Peng, M., Chen, C., Hulbert, A., Brock, M. V & Yu, F. Non-blood circulating tumor DNA detection in cancer. *Oncotarget* **8**, 69162–69173 (2017).
 326. Castiglia, M. *et al.* The diagnostic accuracy of circulating tumor DNA for the detection of EGFR-T790M

- mutation in NSCLC: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **8**, 1–10 (2018).
327. Nagai, Y. *et al.* Genetic heterogeneity of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cell lines revealed by a rapid and sensitive detection system, the peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp. *Cancer Res.* **65**, 7276–7282 (2005).
 328. Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H. & Buchardt, O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* **254**, 1497–1500 (1991).
 329. Miyazawa, H. *et al.* Peptide nucleic acid-locked nucleic acid polymerase chain reaction clamp-based detection test for gefitinib-refractory T790M epidermal growth factor receptor mutation. *Cancer Sci.* **29**, 595–600 (2008).
 330. Cohen, J. Weighted kappa: nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychol. Bull.* **70**, 213–220 (1968).
 331. Zhang, W. *et al.* Mutation and polymorphism in the EGFR-TK domain associated with lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **1**, 635–647 (2006).
 332. Koh, Y. W. *et al.* Q787Q EGFR Polymorphism as a Prognostic Factor for Lung Squamous Cell Carcinoma. *Oncol.* **90**, 289–298 (2016).
 333. Bonin, S. *et al.* A synonymous EGFR polymorphism predicting responsiveness to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer patients. *Tumor Biol.* **37**, 7295–7303 (2016).
 334. Sasaki, H. *et al.* EGFR Polymorphism of the Kinase Domain in Japanese Lung Cancer. *J. Surg. Res.* **148**, 260–263 (2008).
 335. Leichsenring, J. *et al.* Synonymous EGFR variant p.Q787Q is neither prognostic nor predictive in patients with lung adenocarcinoma. *Genes, Chromosom. Cancer* **56**, 214–220 (2017).
 336. Tan, D. S. W. *et al.* Long noncoding RNA EGFR-AS1 mediates epidermal growth factor receptor addiction and modulates treatment response in squamous cell carcinoma. *Nat. Med.* **23**, 1167–1175 (2017).
 337. Aggoune, D. *et al.* Modeling the influence of stromal microenvironment in the selection of ENU-induced BCR-ABL1 mutants by tyrosine kinase inhibitors ABSTRACT : *Oncoscience* **1**, 57–68 (2014).
 338. Bradeen, H. a. *et al.* Comparison of imatinib mesylate, dasatinib (BMS-354825), and nilotinib (AMN107) in an N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-based mutagenesis screen: High efficacy of drug combinations. *Blood* **108**, 2332–2338 (2006).
 339. Bronstein, S. M., Cochrane, J. E., Craft, T. R., Swenberg, J. A. & Skopek, T. R. Toxicity, mutagenicity, and mutational spectra of N-ethyl-N-nitrosourea in human cell lines with different DNA repair phenotypes. *Cancer Res.* **51**, 5188–97 (1991).
 340. Op het Veld, C. W., van Hees-Stuivenberg, S., van Zeeland, a a & Jansen, J. G. Effect of nucleotide excision repair on hprt gene mutations in rodent cells exposed to DNA ethylating agents. *Mutagenesis* **12**, 417–24 (1997).
 341. Richardson, K. K., Richardson, F. C., Crosby, R. M., Swenberg, J. A. & Skopek, T. R. DNA base changes and alkylation following in vivo exposure of Escherichia coli to N-methyl-N-nitrosourea or N-ethyl-N-nitrosourea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 344–348 (1987).
 342. Arena, S. *et al.* Emergence of multiple EGFR extracellular mutations during cetuximab treatment in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 2157–2167 (2015). doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2821
 343. Muvaffak, A. *et al.* Evaluating TBK1 as a therapeutic target in cancers with activated IRF3. *Mol. Cancer*

- Res.* **12**, 1055–1066 (2014).
344. Shen, R. R. & Hahn, W. C. Emerging roles for the non-canonical IKKs in cancer. *Oncogene* **30**, 631–641 (2011).
345. Liu, S. *et al.* The kinases IKKε and TBK1 regulate MYC-dependent survival pathways through YB-1 in AML and are targets for therapy. *Blood Adv.* **2**, 3428–3442 (2018).
346. Clark, K., Plater, L., Pegg, M. & Cohen, P. Use of the pharmacological inhibitor BX795 to study the regulation and physiological roles of TBK1 and IκB Kinase ε: A distinct upstream kinase mediates ser-172 phosphorylation and activation. *J. Biol. Chem.* **284**, 14136–14146 (2009).
347. Deng, T. *et al.* ShRNA kinome screen identifies TBK1 as a therapeutic target for HER2 + breast cancer. *Cancer Res.* **74**, 2119–2130 (2014).
348. Peng, M. *et al.* MIER3 suppresses colorectal cancer progression by down-regulating Sp1, inhibiting epithelial-mesenchymal transition. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
349. Burikhanov, R. *et al.* Novel mechanism of apoptosis resistance in cancer mediated by extracellular PAR-4. *Cancer Res.* **73**, 1011–1019 (2013).
350. Chakraborty, S. *et al.* Constitutive and ligand-induced EGFR signalling triggers distinct and mutually exclusive downstream signalling networks. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
351. Cartegni, L., Chew, S. L. & Krainer, A. R. Listening to silence and understanding nonsense: Exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics* **3**, 285–298 (2002).
352. Wang, G. S. & Cooper, T. A. Splicing in disease: Disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature Reviews Genetics* **8**, 749–761 (2007).
353. de la Hoya, M. *et al.* Combined genetic and splicing analysis of BRCA1 c.[594-2A>C; 641A>G] highlights the relevance of naturally occurring in-frame transcripts for developing disease gene variant classification algorithms. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 2256–2268 (2016).
354. Blomen, V. *et al.* Gene essentiality and synthetic lethality in haploid human cells. *Science (80-.).* **350**, 1092 (2015).
355. Findlay, G. M., Boyle, E. A., Hause, R. J., Klein, J. C. & Shendure, J. Saturation editing of genomic regions by multiplex homology-directed repair. *Nature* **513**, 120–123 (2014).
356. Findlay, G. M. *et al.* Accurate functional classification of thousands of BRCA1 variants with saturation genome editing. *Nature* 294520 (2018). doi:10.1101/294520
357. Chu, V. T. *et al.* Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **33**, 543–548 (2015).
358. Valle, L. *et al.* New insights into POLE and POLD1 germline mutations in familial colorectal cancer and polyposis. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 3506–3512 (2014).
359. Spier, I. *et al.* Frequency and phenotypic spectrum of germline mutations in POLE and seven other polymerase genes in 266 patients with colorectal adenomas and carcinomas. *Int. J. Cancer* **137**, 320–331 (2015).
360. Palles, C. *et al.* Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat. Genet.* **45**, 136–143 (2013).
361. Leenay, R. T. *et al.* Identifying and visualizing functional PAM diversity across CRISPR-Cas systems. *Mol. Cell* **62**, 137–147 (2016).

362. Anzalone, A. V. *et al.* Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* **576**, (2019).

Table des figures

Figure 1 : Principaux supresseurs de tumeur et oncogènes identifiés dans les cancers solides métastatiques. ²⁶	11
Figure 2 : Différents niveaux d'hétérogénéités tumorales démontrant la diversité génétique en oncologie solide. ³⁷	14
Figure 3 : Schéma reprenant les concepts d'addiction oncogénique et de létalité synthétique sur lesquels sont basées les thérapies ciblées.....	17
Figure 4 : Représentation schématique des différents drivers oncogéniques dans les CBNPC ainsi que les thérapies ciblées disponibles correspondantes.....	22
Figure 5 : Représentation schématique de la structure de l'EGFR lors de sa dimérisation et voies de signalisation associées à son activation. ⁹²	25
Figure 6 : Représentation schématique des proportions des différents mécanismes de résistance acquise aux ITK-EGFR de première génération dans les CBNPC.	32
Figure 7 : Altérations génétiques intervenant simultanément lors de la résistance acquise aux ITK-EGFR dans les CBNPC en fonction de la présence ou non de la mutation p.Thr790Met de l'EGFR ¹⁵⁹	35
Figure 8 : Représentation schématique des différents sous-types de cancers ovariens d'origines épithéliales associés à leurs principaux biomarqueurs et signatures moléculaires. ⁵⁷	40
Figure 9 : Schéma reprenant les caractéristiques principales des HGSOC.....	41
Figure 10 : Représentation schématique de la recombinaison homologue intervenant suite à des cassures doubles brins de l'ADN. Modifié depuis Scully et al, 2019 ¹⁹³	45
Figure 11 : Représentation schématique de la structure protéique de BRCA1 et visualisation des différents domaines ainsi que des partenaires protéiques qui y sont associés. Modifié depuis Roy et al, 2011. ¹⁷⁸	47
Figure 12 : Représentation schématique de la structure protéique de BRCA2 et visualisation des différents domaines ainsi que des partenaires protéiques qui y sont associés. Modifié depuis Roy et al, 2011. ¹⁷⁸	48
Figure 13 : Représentation schématique des différents mécanismes impliqués dans la résistance acquise aux inhibiteurs de PARP.	60
Figure 14 : Représentation schématique de la fonctionnalité de l'outil CRISPR-Cas pour la défense immunitaire bactérienne contre les infections virales.....	66
Figure 15 - Résultats complémentaires 1 : Etude du polymorphisme Q787Q dans la cohorte de patients présentant des CBNPC ayant rechutés sous ITK-EGFR de première génération.	106
Figure 16 - Résultats complémentaires 2 : Effets de la co-inhibition EGFR-TBK1 sur d'autres lignées cellulaires.	126
Figure 17 : Représentation graphique résumant les différents éléments abordés dans cette étude des limites des ITK-EGFR dans les CBNPC.	127
Figure 18 - Résultats complémentaires 3 : Sensibilité des cellules MCF10A KO BRCA1 à l'Olaparib.....	151
Figure 19 - Résultats complémentaires 4 : Sensibilité à l'Olaparib des clones hétérozygotes p.Gln1586X de BRCA1.	153

Figure 20 - Résultats complémentaires 5 : Extension des possibilités de la méthode de caractérisation fonctionnelle des VSI.....	181
Figure 21 : Proposition de protocole pouvant être appliqué lors de la caractérisation par séquençage NGS de VSI de BRCA1/2.	183
Figure 22 : Schéma-bilan résumant les différents travaux et résultats obtenus lors de ces travaux de thèse.	188

Table des tableaux

Tableau 1 : Principaux mécanismes de réparation de l'ADN associés aux localisation tumorales dans lesquels ils sont majoritairement impliqués. ¹⁸	9
Tableau 2 : Tableau répertoriant les différents ITK-EGFR associés à des essais cliniques de phase 2 ou plus avancés, ayant déjà publiés leurs résultats dans les CBNPC.	23
Tableau 3 : Mécanismes de résistance acquise à l'Osimertinib, ITK-EGFR de troisième génération, administré en première ou deuxième ligne. ¹⁶⁶	38
Tableau 4 : Principaux iPARP disponibles en cliniques associés aux localisations tumorales dans lesquels ils sont administrés.	53

RÉSUMÉ

Malgré les bénéfices cliniques considérables de la prise en considération du contexte moléculaire tumoral, les thérapies ciblées présentent certaines limitations majeures. La première partie de ces travaux se concentre sur l'étude des inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant l'EGFR dans les cancers bronchiques non à petites cellules. L'amélioration des méthodes de détection des biomarqueurs a été complétée par la caractérisation *in vitro* d'un mécanisme de résistance acquise non précédemment identifié. L'exposition de cellules pulmonaires à un agent mutagène puis une pression de sélection a ainsi mis en évidence la signature TBK1 et l'effet synergique de la co-inhibition s'est révélé intéressant.

Le deuxième aspect concernant les inhibiteurs de PARP, incontournables dans la prise en charge des cancers de la sphère gynécologique. Ces thérapies reposant sur le principe de létalité synthétique, la présence de mutations pathogènes de BRCA1/2 est un pré-requis, illustrant la problématique des variants de signification inconnue. Face à la nécessité de leur caractérisation fonctionnelle, une étude transcriptionnelle des variants d'épissage par extraction de l'ARNm depuis les prélèvements FFPE a d'abord été réalisée. Puis, afin d'évaluer tous les variants, l'édition génomique a été développée comparant les efficacités d'édition d'un variant d'intérêt et d'un variant silencieux dans un contexte haploïde où ces gènes sont essentiels. La signification biologique de variants de BRCA1/2, et la généralisation de notre approche à l'ensemble des gènes suppresseurs de tumeur essentiels de nos cellules, peut ainsi être évaluée en 3 semaines, délai compatible avec les impératifs cliniques.

mots-clés : thérapies ciblées, BRCA1/2, EGFR, VSi, impact fonctionnel, résistance acquise

ABSTRACT

Despite significant clinical benefit from the consideration of molecular context, targeted therapies are still challenging. First part of this work focused on tyrosine kinase inhibitors targeting EGFR in non small cell lung cancers. Thus, improvement of biomarkers detection methods was completed by *in vitro* characterization of an unreported mechanism of acquired resistance. Briefly, pulmonary cells were exposed to a mutagen agent and a selection pressure was applied with EGFR inhibitors allowing the detection of TBK1 signature. Finally, synergic effect of that co-inhibition was highlighted.

Now essentials in gynaecological cancers management, PARP inhibitors represent the second part of that work. Those targeted therapies are based on synthetic lethality. Consequently, BRCA1/2 pathogenic mutations are required for their administration, illustrating the issue of variants of uncertain significance. Toward their functional characterization necessity, a transcriptional analysis of splicing variant was first conducted on mRNA extracted from FFPE samples. Then, to evaluate functional signification of all types of variants, genomic edition was developed. Editing efficiencies of the unknown variant and a silent control one were compared in a haploid model where those genes are essentials. Functional signification of BRCA1/2 variants, and thereby mutations from all essential tumor suppressor genes in our model, can be evaluated in three weeks which is compatible with clinical management.

keywords: targeted therapies, BRCA1/2, EGFR, VUS, functional impact, acquired resistance

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) **BILLAUD Amandine**
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **14 / 01 / 2020**

**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



Titre : Analyse moléculaire, enjeux et limites des thérapies ciblées en oncologie : extension des sensibilités aux anti-PARP dans les cancers ovariens par caractérisation de variants non annotés et nouveaux mécanismes de résistance dans les cancers bronchiques.

Mots clés : thérapies ciblées, BRCA1/2, EGFR, VSI, impact fonctionnel, résistance acquise

Résumé : Malgré les bénéfices cliniques considérables de la prise en considération du contexte moléculaire tumoral, les thérapies ciblées présentent certaines limitations majeures. La première partie de ces travaux se concentre sur l'étude des inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant l'EGFR dans les cancers bronchiques non à petites cellules. L'amélioration des méthodes de détection des biomarqueurs a été complétée par la caractérisation *in vitro* d'un mécanisme de résistance acquise non précédemment identifié. L'exposition de cellules pulmonaires à un agent mutagène puis une pression de sélection a ainsi mis en évidence la signature TBK1 et l'effet synergique de la co-inhibition s'est révélé intéressant.

Ces thérapies reposant sur le principe de létalité synthétique, la présence de mutations pathogènes de BRCA1/2 est un pré-requis, illustrant la problématique des variants de signification inconnue. Face à la nécessité de leur caractérisation fonctionnelle, une étude transcriptionnelle des variants d'épissage par extraction de l'ARNm depuis les prélèvements FFPE a d'abord été réalisée. Puis, afin d'évaluer tous les variants, l'édition génomique a été développée comparant les efficacités d'édition d'un variant d'intérêt et d'un variant silencieux dans un contexte haploïde où ces gènes sont essentiels. La signification biologique de variants de BRCA1/2, et la généralisation de notre approche à l'ensemble des gènes suppresseurs de tumeur essentiels de nos cellules, peut ainsi être évaluée en 3 semaines, délai compatible avec les impératifs cliniques.

Le deuxième aspect concernent les inhibiteurs de PARP, incontournables dans la prise en charge des cancers de la sphère gynécologique.

Title: Molecular analysis, advantages and challenges of targeted therapies in oncology: increasing sensitivity to PARP inhibitors in ovarian cancer by characterization of unknown variants and new acquired resistance mechanism in lung cancers.

Keywords: targeted therapies, BRCA1/2, EGFR, VUS, functional impact, acquired resistance

Abstract: Despite significant clinical benefit from the consideration of molecular context, targeted therapies are still challenging. First part of this work focused on tyrosine kinase inhibitors targeting EGFR in non small cell lung cancers. Thus, improvement of biomarkers detection methods was completed by *in vitro* characterization of an unreported mechanism of acquired resistance. Briefly, pulmonary cells were exposed to a mutagen agent and a selection pressure was applied with EGFR inhibitors allowing the detection of TBK1 signature. Finally, synergic effect of that co-inhibition was highlighted.

Those targeted therapies are based on synthetic lethality. Consequently, BRCA1/2 pathogenic mutations are required for their administration, illustrating the issue of variants of uncertain significance. Toward their functional characterization necessity, a transcriptional analysis of splicing variant was first conducted on mRNA extracted from FFPE samples. Then, to evaluate functional signification of all types of variants, genomic edition was developed. Editing efficiencies of the unknown variant and a silent control one were compared in a haploid model where those genes are essentials. Functional signification of BRCA1/2 variants, and thereby mutations from all essential tumor suppressor genes in our model, can be evaluated in three weeks which is compatible with clinical management.

Now essentials in gynaecological cancers management, PARP inhibitors represent the second part of that work.