

Les projets Génome de génomique et de génétique

Thierry Frebourg, Pierre Laurent-Puig,
Robert Benamouzig, Sylviane Olschwang

► Le cancer colique de stade II, soit 7 700 nouveaux cas par an, évolue vers une maladie métastatique dans 21 % des cas. Alors que plusieurs voies de tumorigenèse ont été décrites, les gènes initiateurs du processus identifiés (ainsi plusieurs de ceux impliqués dans la transformation maligne), aucune altération génétique acquise n'a été associée à l'évolution pronostique, à l'exception de l'inactivation du gène *APC* dont l'explication biologique est peu documentée. Les syndromes de prédisposition majeure au cancer colorectal sont maintenant bien connus, et plusieurs milliers de tests prédictifs sont chaque année réalisés en France, qui permettent d'adapter les modalités de dépistage à chaque situation individuelle. Très récemment, des études nouvelles, appelées études d'association, ont de plus permis d'identifier plusieurs locus de susceptibilité mineure au cancer colorectal. L'utilisation de cette méthode et le développement de projets visant à caractériser les risques évolutifs dans leur ensemble nécessitent l'étude d'un nombre très important de patients, et quatre projets nationaux coordonnés sont sur le point de voir le jour en France, qui permettront d'aborder ce sujet de différentes manières complémentaires. ◀

QPPC, QMPSF based molecular prognostic portraits of stage II colorectal cancer Thierry Frebourg

► Le projet présenté au sein du cancéropôle Nord-Ouest est le développement d'outils d'exploration génétique utilisables dans des laboratoires de diagnostic. Ces projets rassemblent donc des chercheurs, des chirurgiens, des cliniciens et des pathologistes. Le projet, intitulé QPPC (*QMPSF based molecular Prognostic Portraits of stage II Colorectal cancer*), vise à identifier des profils moléculaires de valeur pronostique



basés sur des altérations ciblées du dosage génique. Jusqu'à cette année, la seule analyse génétique somatique, dont l'intérêt médical était validé dans le cancer colorectal, était la recherche d'une instabilité microsatellitaire (ou MSI) dans les cancers colorectaux diagnostiqués avant 60 ans, afin de ne pas méconnaître des patients présentant un syndrome de Lynch. La révolution en 2008 fut la validation de la valeur des mutations de *KRAS* comme marqueur prédictif de la résistance aux anticorps anti-EGFR. Dans le cancer colorectal, une des priorités est le développement de marqueurs pronostiques dans les tumeurs T3/4N0 puisque 20 % des patients vont développer des métastases et devraient donc bénéficier d'une chimiothérapie adjuvante. Notre projet consiste à développer une technique simple et robuste basée sur le principe du dosage génique, applicable en routine aux cancers colorectaux, et permettant de définir un profil pronostique des cancers colorectaux de stade II. Nous nous intéressons donc à l'ADN tumoral, dont la stabilité

T. Frebourg : Pôle Biologie, CHU de Rouen, 1, rue de Germont, 76031 Rouen Cedex, France. thierry.frebourg@univ-rouen.fr

Pierre Laurent-Puig : Inserm UMR-S775, Bases moléculaires de la réponse aux xénobiotiques, Laboratoire de Toxicologie Moléculaire, 45, rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France. pierre.laurent-puig@univ-paris5.fr

R. Benamouzig : Service d'Hépatogastroentérologie, Hôpital Avicenne, 125, rue de Stalingrad, 93009 Bobigny, France. robert.benamouzig@avc.ap-hop-paris.fr

S. Olschwang : UMR 891, Département d'Oncogénétique, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Institut Paoli-Calmettes, 27, boulevard Leï Roure, 13009 Marseille, France. sylviane.olschwang@inserm.fr



répond à cette exigence, le degré d'infiltration tumorale par les cellules stromales étant, de plus, aisément quantifiable.

La stratégie est d'abord basée sur une analyse comparative par hybridation génomique comparative (ou CGH) sur puces d'oligonucléotides selon la technique Agilent - le cancéropôle disposant d'une plateforme localisée à Lille - puis sur une analyse ciblée de certaines régions par technique QMPSF, largement éprouvée au laboratoire et diffusée au-delà. Pour ce projet, nous développons des versions somatiques de la QMPSF dans lesquelles, pour chaque patient, sont superposés le profil du tissu tumoral et le profil du tissu colique non tumoral, ce qui permet de détecter les altérations de dosage génique dans la tumeur : en effet, après migration sur séquenceur capillaire, chaque gène sera représenté par un pic fluorescent et la hauteur du pic sera proportionnel au dosage génique. Les profils générés à partir du tissu tumoral et non tumoral seront superposés. Une délétion génique dans la tumeur se traduira par une diminution du pic par rapport au tissu non tumoral ($< 0,8$, compte tenu de la présence de cellules stromales dans le tissu tumoral) et un gain de copie par une augmentation ($> 1,2$, compte tenu de la présence de cellules stromales dans le tissu tumoral).

Le premier matériel d'étude fut une série limitée de tumeurs T3N0 (20) réparties équivalamment selon l'évolution à 3 ans du diagnostic, appariées sur le sexe et l'âge. Nous souhaitons aujourd'hui étendre l'expérience à 200 tumeurs afin de réaliser une analyse comparative plus significative.

Les résultats préliminaires sont les suivants : après comparaison des profils génomiques normaux et tumoraux de chaque patient, nous avons sélectionné les régions chromosomiques altérées dans les tumeurs. La complexité des informations a ainsi été réduite, de même que les artéfacts d'interprétation au niveau des CNV. Nous avons ensuite comparé les profils spécifiques de 20 tumeurs, présentant pour moitié une évolution métastatique. Nous avons sélectionné 6 régions génomiques dont la fréquence d'altération était discriminante entre les tumeurs récidivantes et non récidivantes (Figure 1). Nous avons développé une QMPSF somatique permettant d'analyser simultanément et spécifiquement ces 6 régions et nous avons validé la valeur

discriminante de ce profil moléculaire sur une série de 42 tumeurs T3N0 avec ou sans récurrence (Figure 2). La concordance des observations de la QPPC et de la CGH a permis de valider la technique. Cette analyse nécessite maintenant d'être étendue à une étude prospective en aveugle, qui consistera à tester la robustesse de la classification et à l'affiner progressivement. ♦

Interstade 2 Pierre Laurent-Puig

> Comme le projet précédent, ce projet s'inscrit dans la recherche de paramètres d'évaluation pronostique des cancers colorectaux de stade II, pour lesquels aucun protocole de chimiothérapie adjuvante n'a fait la preuve de son bénéfice.

L'intitulé complet du projet est : « Détermination de facteurs pronostiques et prédictifs pathologiques et moléculaires dans le cancer colique de stade II chez des patients opérés à visée curative randomisés entre traitement adjuvant et observation ».

L'objet est d'identifier une combinaison de facteurs pronostiques prédictifs de la survie sans récurrence, afin d'étudier si un sous-groupe pourrait bénéficier d'une chimiothérapie adjuvante.

Les facteurs pronostiques connus, c'est-à-dire morphologiques, seront enregistrés : degré de différenciation, invasion vasculaire lymphatique et veineuse, invasion périnerveuse, dépôts tumoraux péricoliques, nécrose tumorale, degré d'infiltration par des cellules immunitaires. Nous y ajouterons les caractéristiques génomiques, profil MSI, pertes et amplifications, mutations, et, enfin, la caractérisation du transcriptome. L'objectif principal est de comparer les survies sans récurrence de groupes de

patients définis par des profils pronostiques, à partir d'un score élaboré avec les meilleures associations des différents paramètres enregistrés.

La moitié des patients sera traitée de manière randomisée avec une drogue orale. L'objectif secondaire est de comparer les survies globales et sans maladie entre les deux groupes, d'estimer l'efficacité de la chimiothérapie adjuvante selon le profil pronostique des patients. Des études pharmacogénétiques permettront d'analyser les capacités de prédire à la fois efficacité et toxicité.

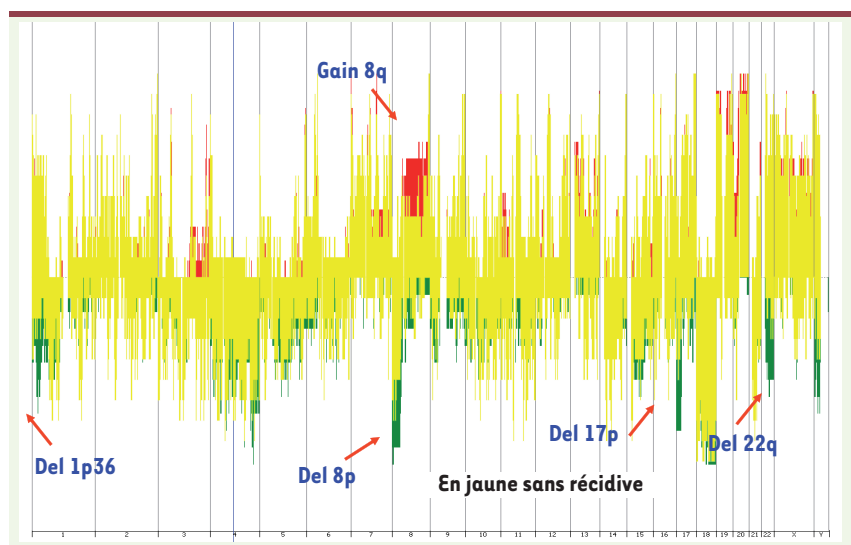


Figure 1. Analyse comparative par CGH array des tumeurs T3N0 avec et sans récurrence.

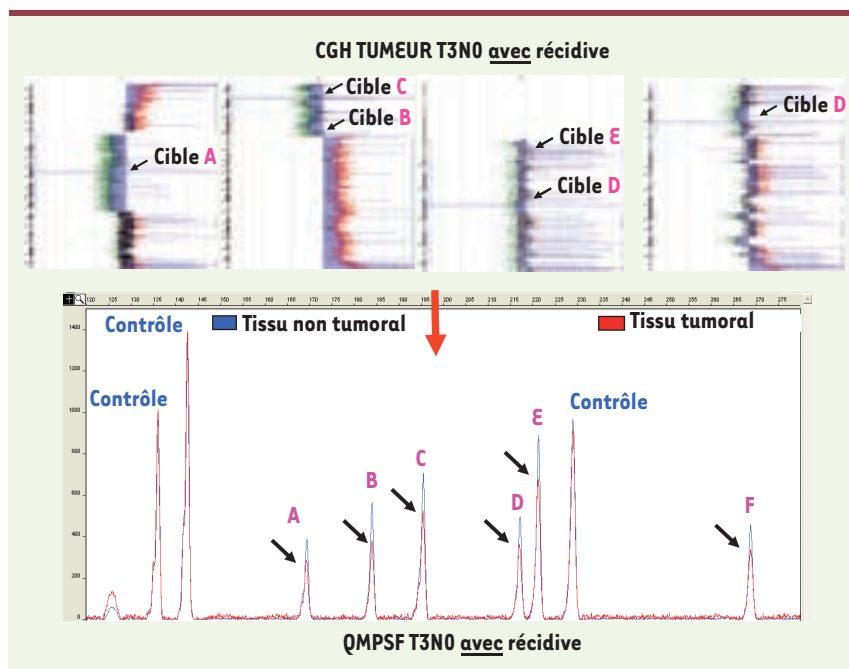


Figure 2. Tumeurs T3N0 avec récurrence.

compte dans la démarche de prévention. Il existe également des caractéristiques génétiques qui modulent le risque de cancer colorectal, mais aucune étude systématique n'a encore porté sur l'interaction des facteurs génétiques et environnementaux. Nous proposons de rechercher de telles interactions chez les personnes ayant un risque intrinsèque de développer un cancer colorectal du fait de la présence d'adénome(s).

La faisabilité du projet a été estimée avec l'objectif d'identifier un risque de 1,6 à partir de l'enregistrement de 14 paramètres nutritionnels et d'un génotypage systématique de l'ADN constitutionnel. L'effectif nécessaire est de 3 500 personnes porteuses d'adénome, dont 750 « avancé », et 3 500 personnes indem-

nes. Les effectifs nécessaires sont de taille importante. Ils ont été estimés selon les hypothèses suivantes : le pronostic est souvent bon ou mauvais (95 % et 72 % de patients sont respectivement vivants sans récurrence 3 ans après le diagnostic), mais il existe une 3^e catégorie de tumeurs, dite de pronostic intermédiaire, dont le risque de récurrence est estimé à 15 %. La proportion de chaque groupe n'est pas équivalente, et si l'on souhaite mettre en évidence un *hazard ratio* susceptible de modifier la prise en charge thérapeutique des groupes de pronostic mauvais et intermédiaire, l'effectif des patients avec récurrence doit être au minimum de 220, et l'effectif total de 750, sans compter les patients qui sont perdus de vue (environ 10 %). L'étude initiale sera menée sur les deux tiers de l'effectif et les observations seront validées sur le dernier tiers. La durée prévue totale pour l'étude est de 7 ans. Une étude comparable est parallèlement mise en place en Allemagne, ce qui permettra de doubler les effectifs. ♦

Adenomax Robert Benamouzig

► Le projet présenté se place dans un contexte de prévention primaire, et pourrait à ce titre prolonger les efforts français pour développer la prévention secondaire. Il existe en effet des facteurs de risque démontrés, degré d'activité physique, facteurs nutritionnels, consommation d'aspirine ou de calcium par exemple, mais, à ce jour, aucun d'entre eux n'est pris en

compte dans la démarche de prévention. Il existe également des caractéristiques génétiques qui modulent le risque de cancer colorectal, mais aucune étude systématique n'a encore porté sur l'interaction des facteurs génétiques et environnementaux. Nous proposons de rechercher de telles interactions chez les personnes ayant un risque intrinsèque de développer un cancer colorectal du fait de la présence d'adénome(s).

La faisabilité du projet a été estimée avec l'objectif d'identifier un risque de 1,6 à partir de l'enregistrement de 14 paramètres nutritionnels et d'un génotypage systématique de l'ADN constitutionnel. L'effectif nécessaire est de 3 500 personnes porteuses d'adénome, dont 750 « avancé », et 3 500 personnes indem-

nes. Pour recruter la population des « cas », en comptant ceux qui ne souhaiteraient pas participer, il serait nécessaire d'avoir accès à 24 000 résultats endoscopiques. Sachant, qu'un centre endoscopique de taille importante réalise entre 1 000 et 2 000 coloscopies par an, il faudrait intéresser 10 à 20 centres en France pendant 2 ans. Ce projet nécessite le recueil de prélèvements sanguins, mais également de fragments d'adénomes et le suivi diététique standardisé, sous forme de trois contacts pendant l'étude. La faisabilité est assurée car beaucoup des centres pressentis ont déjà contribué à des études de chimio-prévention, qui sont plus difficiles à mener, dans la mesure où il faut également contrôler la bonne prise des médicaments.

L'objectif secondaire du projet, par l'existence de deux catégories d'adénomes, selon leur risque de dégénérescence, serait de rechercher des facteurs discriminants de progression vers le cancer.

Les aspects pratiques ne sont pas résolus car il s'agit d'une étude ambitieuse et donc coûteuse. ♦

iCOMET Sylviane Olschwang

► Ce dernier projet, comme les trois autres, est à la recherche d'un financement pour débiter, et il est donc pour l'instant théorique. Ce projet est en étroite interaction avec les deux premiers. Il s'intéresse aux mêmes questions de prise en charge et s'adresse à la même catégorie de patients. La nature des interactions n'est donc pas purement intellectuelle, mais concerne également le matériel biologique et les informations médicales.

Le but du projet iCOMET est d'identifier des gènes de prédisposition au développement de métastases chez les patients porteurs d'un cancer colique sporadique MSS localement avancé sans extension

ganglionnaire au diagnostic. Les facteurs de risque environnementaux sont abondamment étudiés, et actuellement peu sont bien documentés. Il s'agit du mode d'alimentation (régimes pauvres en fibres, riches en graisses et protéines d'origine animale), et de la présence de maladies inflammatoires chroniques (associées à une modification profonde de la flore intestinale). L'existence d'une prédisposition monogénique est en elle-même un facteur de risque majeur. Cependant, plusieurs gènes sont maintenant répertoriés comme conférant un risque, certes moindre, mais significativement supérieur au risque « normal », qui, combiné à des facteurs de risque environnementaux, atteint 0,35 en moyenne dans des études de jumeaux. Le polymorphisme p.Ile1307Lys du gène APC, la mutation *BLM*^{As^h}, le variant c.1100del du gène *CHK2*, un polymorphisme fréquent dans l'exon 4 du gène *CCND1*, les mutations hétérozygotes du gène *MYH* sont autant d'exemples de prédispositions qualifiées de mineures. Les anomalies de méthylation de l'ADN et un déséquilibre dans le métabolisme des folates ont également été évoqués comme des facteurs de risque de cancer colorectal. Récemment, des analyses non paramétriques de génotypes de SNP à l'issue d'une caractérisation pan-génome (GWAS, *Genome Wide Association Study*) auxquelles nous avons participé ont permis d'identifier, sur le chromosome 8, le premier allèle de susceptibilité à faible pénétrance fréquent dans la population générale, qui augmente le risque de cancer colorectal. Depuis, 6 nouveaux locus ont été publiés (Figure 3).

Ces nouvelles données sont de nature à modifier les stratégies de dépistage de masse, s'il est démontré qu'une stratification sur le risque génétique est médicalement utile. Sur le plan thérapeutique, plusieurs études récentes ont mis en évidence le caractère pronostique indépendant de certaines altérations génétiques, dont l'intérêt pourrait être déterminant dans la prise en charge des malades atteints de cancer colique, en permettant une sélection plus fine des patients à risque élevé de récurrence. En 2007, plusieurs observations ont été faites quant à l'association de polymorphismes fonctionnels et le risque de récurrence de plusieurs types de tumeurs : haplotypes

des *MMP* avec récurrence des cancers du poumon, de la vessie, *MMP* et *PAI1* avec progression des cancers du côlon, *HIF1alpha* et *PSA* avec récurrence des cancers de la prostate, *SMYD3* et métastases des hépatocarcinomes, *EGF* et caractère invasif des cancers du col utérin, *p27* et envahissement ganglionnaire des cancers du sein. Plusieurs théories ont été avancées pour expliquer l'origine du processus métastatique, aucune n'ayant été clairement documentée. Sachant que 90 % des décès par cancer sont dus à leur extension métastatique, une meilleure compréhension de ce processus permettrait de réduire de manière conséquente cette mortalité. Des expériences simples de croisements de modèles murins ayant montré que des polymorphismes constitutionnels contrôlaient de manière significative le risque de métastase en cas de cancer, nous faisons ici l'hypothèse qu'il existe chez l'homme des gènes de susceptibilité au développement de métastases et proposons d'examiner cette hypothèse chez les patients atteints de cancer colique, en utilisant les méthodes de génotypage à haut débit.

La collecte se focalisera sur les patients atteints d'un cancer colique. Seront exclus les patients dont le cancer colorectal : (1) compliquera une maladie prédisposante, inflammatoire ou génétique ; (2) sera extrapéritonéal (dont l'évolution se fait préférentiellement par extension loco-régionale, 35 % des cas) ; (3) sera accompagné d'un envahissement ganglionnaire (65 % des cas). Seront donc inclus les patients porteurs d'un cancer colique sans risque *a priori* élevé de métastase (T3/4N0M0 selon la classification TNM). Ces patients seront suivis au moins 3,5 ans après la résection chirurgicale en l'absence de métastase, 91 % des événements survenant dans cette période de temps. Seront également inclus les patients métastatiques au diagnostic, dont la tumeur ne comportera pas de métastase ganglionnaire (TxNOM+).

Le nombre annuel maximal prévisible de cas éligibles pour ces critères en France est - sachant que 21,6 % des T3/4N0 vont développer des métastases dans les 3,5 ans suivant le diagnostic - 5 150 sans métastase à 3,5 ans et 2 550 avec métastase synchrone ou métachrone. L'effectif nécessaire à l'étude complète est de 8 000 cas, dont le tiers avec développement de métastases. En appariant 1:2, sous l'hypothèse d'un modèle

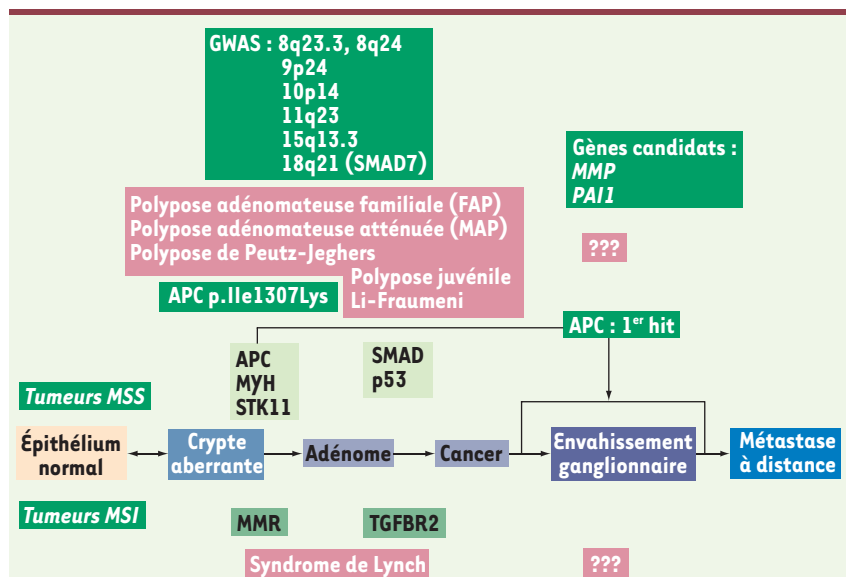


Figure 3. Voies de tumorigenèse colorectale et prédispositions associées.



génétique additif, avec une fréquence de l'allèle à risque pouvant aller de 0,10 à 0,40 dans la population générale, un déséquilibre de liaison avec l'allèle fonctionnel avec $r^2 = 0,8$, et un risque relatif de 1,25 à 1,50, l'effectif nécessaire à l'identification, s'ils existent, des allèles prédisposant avec un seuil de signification statistique à 10^{-7} , est de 2 600 patients avec métastase et 5 200 sans métastase.

Le travail sera réalisé en 3 étapes. La première sera réalisée sur le quart des patients, soit 1 950 cas, répartis en 650 ayant développé des métastases et 1 300 sans métastases dans les 3,5 ans qui suivent le diagnostic en intégrant ceux recrutés rétrospectivement ; elle consistera en génotypage non ciblé (550 000 SNP dont le MAF est d'au moins 0,05) et son analyse. Cette étape permettra de sélectionner les locus présentant une association au sens statistique ($p < 0,05$), qu'il est prévu, dans la seconde étape, de répliquer sur une série équivalente de patients. Dans la troisième étape, il est prévu de tester sur une série équivalente aux 2 premières, recrutée de manière prospective, d'établir précisément le risque conféré par les allèles dont l'association sera validée avec une valeur $p < 10^{-7}$.

Les deux premières phases du projet permettront également de répondre aux questions ne nécessitant pas le suivi des patients, à savoir : existe-t-il des caractéristiques génétiques constitutionnelles associées aux paramètres déterminant actuellement le pronostic (stade T4, associé au non à une perforation, faible différenciation, invasion vasculaire) et au sous-type génétique (MSI ou MSS) ?

Le projet, présenté à l'ensemble des associations et sociétés savantes de praticiens français impliqués dans la prise en charge du cancer colique, a été accueilli très favorablement, et un engagement écrit de participation active est venu appuyer cet accueil : FFCD et GERCOR

pour les oncologues digestifs, SNFGE, ANGH, SFED, CREGG pour les gastroentérologues, FRENCH et AFC pour la Chirurgie digestive, et SFP pour les pathologistes. L'association de Chirurgie belge s'est également jointe à l'équipe, de même qu'une région de Chine et l'Algérie. Des discussions sont en cours avec la Tunisie, une région d'Italie et une région d'Allemagne. Guy Zeitoun et Laurent Bedenne, pour la FFCD, sont en contacts avec ces équipes. L'étude se conformera strictement à la réglementation. Les patients éligibles auront signé un consentement lors de la consultation post-chirurgicale (lorsque le compte rendu histologique est disponible et le traitement complémentaire discuté). Un prélèvement sanguin sera alors réalisé et envoyé au Centre de Ressources Biologiques (le CEPH est pressenti), ainsi qu'une copie des comptes rendus opératoire et histologique, selon un procédé d'acheminement national (international) rapide contractuel. L'enregistrement des données et le suivi des patients seront assurés par une société spécialisée (CRO) au moyen d'un dossier électronique (eCRF) compatible avec ceux des études menées par la FFCD. Des sociétés spécialisées certifiées ont été contactées, qui auront aussi la responsabilité de transférer un bloc histologique tumoral pour les patients inclus. Les analyses statistiques seront basées sur le principe d'association et seront réalisées au sein de l'équipe, en collaboration avec les équipes impliquées dans l'identification d'allèles de faible pénétrance ayant déjà une expérience dans le cancer colique (NCI, États-Unis ; Richard Houlston, Royaume-Uni).

Un comité scientifique est constitué pour piloter les différentes étapes et se porter garant de l'utilisation de cette ressource en termes de matériel biologique et de base de données expérimentales, afin de faciliter l'accès à des projets futurs et/ou dérivés. ♦

Genomics and genetics genome projects

TIRÉS À PART

T. Frebourg
P. Laurent-Puig
R. Benamouzig
S. Olschwang

Toutes les forces de la vie



Sanofi-aventis recherche et développe des médicaments et des vaccins, accessibles au plus grand nombre, pour améliorer la vie.

- La R&D multiplie les approches innovantes à travers les domaines d'expertise du Groupe : Thrombose, Maladies cardiovasculaires, Diabète, Vaccins, Oncologie, Système nerveux central et Médecine interne.
- La croissance de sanofi-aventis est bâtie sur une approche régionale et sur une offre complète : médicaments innovants, médicaments classiques, OTC, génériques et vaccins.
- Par nature, sanofi-aventis adapte son modèle de développement aux enjeux humains et économiques du monde.



sanofi aventis

L'essentiel c'est la santé.