



**HAL**  
open science

## American Association for Cancer Research - AACR Congress, 2016

C. Vicier, E. de Guillebon, A. Kieffer, A. Turpin, C. Dumont, A. Bellesoeur,  
D. G. Soares, J. P. Lotz

► **To cite this version:**

C. Vicier, E. de Guillebon, A. Kieffer, A. Turpin, C. Dumont, et al.. American Association for Cancer Research - AACR Congress, 2016. *Oncologie*, 2016, 18 (7), pp.433 - 449. 10.1007/s10269-016-2647-z . hal-01386716

**HAL Id: hal-01386716**

<https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-01386716v1>

Submitted on 24 Oct 2016

**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.

## **Congrès de l'Association Américaine de Recherche contre le Cancer — AACR 2016**

### **American Association for Cancer Research — AACR Congress, 2016**

C. Vicier, E. De Guillebon, A. Kieffer, A. Turpin, C. Dumont, A. Bellesoeur, D.G. Soares, J.P. Lotz

#### **Affiliations :**

C. Vicier, E. De Guillebon, A. Kieffer, A. Turpin, C. Dumont, A. Bellesoeur : AERIO, 149 avenue du Maine, F-75014 Paris, France. E-mail : [cecile.vicier@gmail.com](mailto:cecile.vicier@gmail.com), [eleonore04@gmail.com](mailto:eleonore04@gmail.com), [a.kieffer1986@gmail.com](mailto:a.kieffer1986@gmail.com), [Turpin.anth@yahoo.fr](mailto:Turpin.anth@yahoo.fr), [clementadumont@gmail.com](mailto:clementadumont@gmail.com), [audreybellesoeur@gmail.com](mailto:audreybellesoeur@gmail.com)

D.G. Soares : Alliance pour la recherche en cancérologie – APREC, Service d'Oncologie Médicale–Hôpital Tenon, Hôpitaux Universitaires de l'Est-parisien (AP–HP), 4, rue de la Chine, F-75970 Paris, France. E-mail : [daniele.grazz@cancer-aprec.com](mailto:daniele.grazz@cancer-aprec.com)

J.P. Lotz : Service d'Oncologie Médicale et de Thérapie Cellulaire–Hôpital Tenon, Hôpitaux Universitaires de l'Est-parisien (AP–HP), Alliance pour la recherche en cancérologie – APREC, Institut Universitaire de Cancérologie, Université Pierre-et-Marie Curie, 4, rue de la Chine, F-75970 Paris, France. E-mail : [jean-pierre.lotz@aphp.fr](mailto:jean-pierre.lotz@aphp.fr)

#### **Abstract :**

This year, the theme of the AACR conference that stood from the 16th to the 20th of April was “Delivering cures through cancer science”. Its objective was to reinforce the link existing

between research and advances in patients care. As usually, the multidisciplinary program covered all the areas of cancer science. Beyond the plenary sessions and symposiums, the program of the meeting included didactic educational workshops on specific areas of research offering a good opportunity to learn or to extend knowledge on particular issues. The meeting also permitted active discussion and exchanges with colleagues through the poster sessions. In this issue of *Oncologie*, and for the third year in a row, mentoring medical doctors of the French association AERIO (Association d'Enseignement et de Recherche des Internes d'Oncologie) focus on presentations that, to our opinion, warranted a particular attention. The aim of this exciting and informative project is to provide details to researchers, physicians but also to the general public who could not attend to the conference. This year, genetic and epigenetic cancer heterogeneity as well as the tumor immunology received a particular and still increasing attention by the AACR steering committee. However, we also report here the most recent advances on the tumor metabolism and its signaling pathways, a rapidly growing research field that should allow, in a near future, to identify potential drug targets and to develop compounds capable of starving and inhibiting tumor progression.

**Key words :** AACR, Cancer, Personalized Medicine, Heterogeneity, Immunotherapy, Targeted Therapy, Genomic, Stem cells, Metabolism.

## **Résumé**

Le thème de l'AACR de cette année était «Delivering cures through cancer science». Le sujet vise à renforcer le lien entre la recherche et les progrès réalisés dans le domaine du soin des patients. Un programme multidisciplinaire présenté en cinq jours (du 16 au 20 Avril) couvrait tous les domaines de la science du cancer. Au-delà de la session plénière et des colloques, des ateliers éducatifs avec des présentations plus didactiques dans des domaines ciblés de

recherche ont donné une bonne occasion d'apprendre et d'approfondir nos connaissances sur des sujets spécifiques. En outre, la réunion nous a permis de participer activement à des discussions entre collègues au cours des séances-posters. Dans ce numéro de la revue Oncologie nous présentons les conférences qui ont mérité une attention particulière. C'est la troisième année que de jeunes médecins de l'association française AERIO (Association d'Enseignement et de Recherche des Internes d'Oncologie), supervisés par des médecins-chercheurs, participent à ce projet passionnant et instructif. Notre objectif est de fournir des détails sur les présentations les plus pertinentes de la réunion à toute personne dans l'incapacité d'y assister, collègues, médecins et grand public. Cette année, l'accent a été mis sur l'hétérogénéité génétique et épigénétique, l'immunologie ainsi que le métabolisme de la tumeur et ses voies de signalisation. Le métabolisme de la tumeur est un domaine de recherche en pleine expansion. Il devrait permettre, dans un avenir proche, l'identification et le développement des cibles potentielles de médicaments pour diminuer les ressources énergétiques de la tumeur et inhiber sa progression.

**Mots clés :** AACR, Cancer, Médecine personnalisée, Hétérogénéité, Immunothérapie Thérapie ciblée, Génomique, Cellules souches, Métabolisme.

### **Hétérogénéité intratumorale : les enjeux actuels, Cécile Vicier**

Les avancées technologiques récentes dans l'analyse des tumeurs a permis de révéler que celles ci sont composées de sous clones complexes avec la présence d'une hétérogénéité intratumorale (HIT) génétique [1] et épigénétique changeante au cours du temps et au sein d'un même espace. Actuellement, l'évaluation de l'HIT se fait par séquençage de différents sites de biopsie et pourrait être à terme réalisée via l'ADN tumoral circulant [2] (ADNct). Lors de la séance plénière consacrée à l'hétérogénéité, les conférenciers ont abordé les

progrès récents dans la compréhension de l'hétérogénéité tumorale en onco-hématologie au niveau cellulaire ainsi que la dépendance des sous-clones tumoraux, leur impact sur la réponse thérapeutique et leur association éventuelle à un mauvais pronostic [3, 4].

Dans un premier temps le Dr C. Swanton (The Francis Crick Institute and UCL Cancer Institute, London, United Kingdom) a présenté les résultats préliminaires de l'essai TRACERx (TRACKing Non-small Cell Lung Cancer Evolution Through Therapy (Rx)) une étude prospective débutée en 2014, de patients atteints de carcinomes bronchiques non à petites cellules du poumon (CBNPC) éligibles à une chirurgie première. Cette étude observationnelle vise à définir les trajectoires d'évolution du cancer du poumon dans l'espace et le temps à travers l'analyse de multiples régions. En suivant les cancers du diagnostic à la rechute métastatique, est réalisé un suivi des tumeurs intégrant les traitements reçus afin de déterminer l'impact de l'hétérogénéité clonale sur les résultats cliniques. TRACERx a été conçu afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour le CBNPC et pourra également servir de modèle applicable à d'autres types de cancer (ClinicalTrials.gov: NCT01888601). Ainsi l'analyse des 100 premiers patients a permis de montrer d'une part que les mutations « drivers » comme EGFR ou BRAF sont clonales (ou tronculaires) et que des mutations touchant NF1, KRAS, NRAS ou RB1 peuvent être sous clonales (ou issues de certaines branches). Ces mutations peuvent être détectées via analyse de l'ADNct et sont des cibles thérapeutiques traitées de façon unique : l'idée que ces travaux dégagent est qu'il faut peut être cibler plusieurs clones et sous clones afin de ne pas sélectionner de résistances. D'autres part des signatures génomiques particulières ont été retrouvées chez les patients fumeurs avec présence de néoantigènes connus pour leur intérêt dans l'utilisation à l'immunothérapie. Cette étude prometteuse est suivie de PEACE : une étude post mortem permettant des prélèvements métastatiques multiples.

Par la suite le Dr TJ Ley (Washington University School of Medicine, St. Louis, MO) a présenté le cas des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) se manifestant par un trouble clonal de cellules souches hématopoïétiques. Ces cellules accumulent des mutations aléatoires en fonction du temps. Cependant, certaines de ces mutations sont non-aléatoires et peuvent provoquer l'expansion des cellules souches, créant un état bénin « préleucémique ». Ces clones acquièrent des mutations supplémentaires donnant un « clone fondateur » qui génère des sous-clones avec des propriétés uniques. Ces sous-clones déterminent les réponses des patients atteints de LAM aux traitements, et contribuent souvent à une rechute [5]. Grâce au TCGA (The Cancer Genome Atlas), certaines mutations ont été mises en évidence telles que PML-RARA, CBFβ-MYH11, des translocations MLL, BCR-ABL et permettent de choisir des traitements ciblés. Malgré ces thérapies adaptées, certains patients vont rechuter précocement. Le Dr JT Ley a exposé 4 points majeurs à intégrer pour améliorer le traitement des LAM: la complexité mutationnelle (qui peut dépendre de l'âge du patient [6], présence de mutations type DNMT3A plutôt clonale et FLT3 sous clonale), la complexité clonale (hétérogénéité des clones et sous clones), l'évolution clonale sous traitement (post chimiothérapie [7]) et la complexité épigénétique.

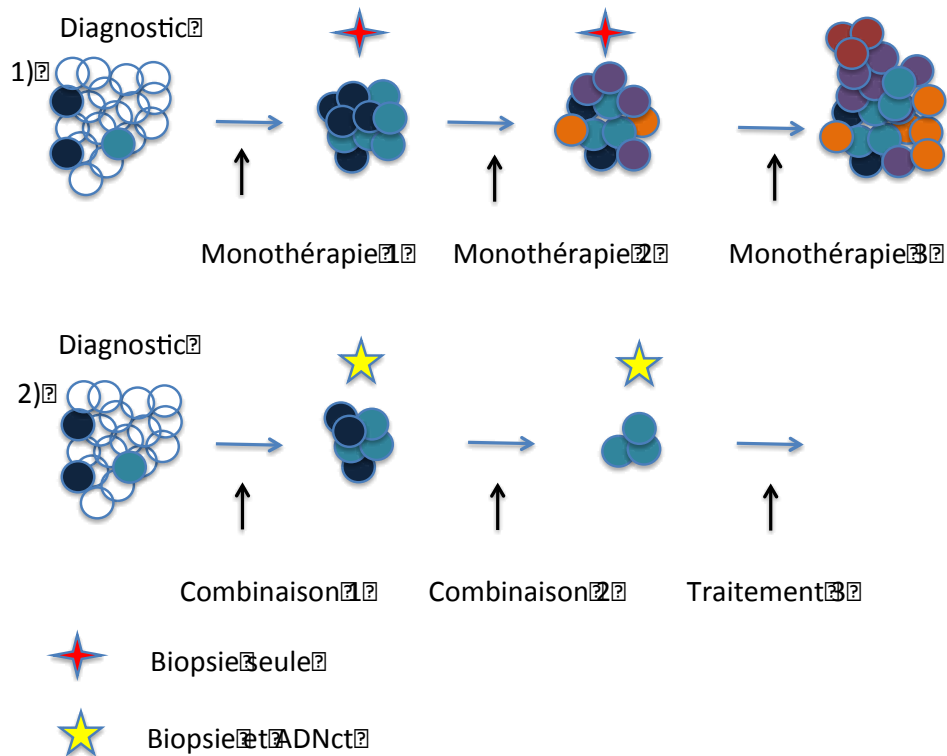
Par ailleurs dans le cadre d'une approche beaucoup plus infime, le Dr A. Regev (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA) a présenté les travaux de son équipe portant sur « l'écosystème » des tumeurs et l'évaluation de l'HIT via l'analyse de cellules individuelles par RNA-Sequencing (RNA-Seq). Ces travaux ont donné lieu à 2 publications : d'une part, Patel et al ont montré sur 430 cellules de cinq glioblastomes primaires analysés par RNA-Seq des différences en termes de transcription liées à la signalisation oncogénique, la prolifération, le complément, la réponse immunitaire et l'hypoxie [8]. D'autre part, Tirosh et al ont analysé des mélanomes par RNA-seq : 4645 cellules individuelles isolées à partir de 19 patients (cellules stromales, endothéliales,

immunitaires et malignes). Les cellules malignes au sein de la même tumeur affichent une hétérogénéité dans leur transcription associée au cycle cellulaire, au contexte spatial [9]... L'écosystème tumoral est ainsi décrypté afin de mieux comprendre les interactions cellules-cellules, son influence sur les cellules malignes et son implication dans l'HIT.

Pour finir le Dr JA. Engelman (Massachusetts General Hospital, Boston, USA) a évoqué l'évolution tumorale après utilisation de thérapies ciblées dans les cancers du poumon non à petites cellules (CBNPC). Actuellement les patients présentant une mutation somatique d'EGFR ou un réarrangement d'ALK bénéficient d'inhibiteurs spécifiques qui entraînent des réponses objectives ensuite suivies de progression. En effet les cellules tumorales deviennent résistantes via 3 mécanismes : 1) en développant de nouvelles mutations qui peuvent pré-exister [10] (T790M pour EGFR) ou amplifications (ALK L1196M, G1269A, G1206Y) qu'il faut cibler par un inhibiteurs de seconde génération ou autre, 2) par contournement des voies de signalisation et activation en aval de l'EGFR (via PI3K, MET...) entraînant l'utilisation d'une combinaison d'inhibiteurs de tyrosine kinase pour bloquer la prolifération, 3) par transformation de l'histologie tumorale (changement d'un adénocarcinome en carcinome à petite cellule) qu'il faut traiter différemment [11]. Les traitements actuels proposent une succession d'inhibiteurs en monothérapie mais la solution pourrait être une combinaison afin de sélectionner le moins possible des clones résistants en s'adaptant le plus rapidement possible à l'évolution de la tumeur par exemple par des prélèvements simples d'ADNct (**Figure 1**).

Ainsi ces 4 présentations en plénière abordent toutes différentes stratégies afin de mieux comprendre l'HIT et l'intégrer à la pratique clinique.

## Utilisation des thérapies ciblées: 1) Actuellement 2) dans un futur proche



**Figure 1.** Actuellement nous traitons les patients en fonction d'une anomalie moléculaire, à l'avenir les combinaisons sont probablement la clé du succès avec analyses régulières de la tumeur (D'après la présentation du Dr JA. Engelman).

## L'Immunologie poursuit son combat contre le cancer, Eleonore de Guillebon

### Sur le versant clinique :

De nouvelles indications se profilent pour les anti-PD-1. Publiés parallèlement dans le *New England Journal of Medicine* par Nghiem *et al.*, les résultats de l'étude de phase 2 multicentrique, non contrôlée, du pembrolizumab dans les carcinomes à cellules de Merkel avancés montraient un taux de réponse de 56% (IC95%(35-76)), après évaluation de l'efficacité du traitement chez 25 patients sur 26 inclus [12]. La survie sans progression à 6



mois était de 67% (IC95%(49-86)). Il y avait un rationnel fort à une approche immunothérapeutique dans ce type tumoral. Il présente, tout d'abord, deux mécanismes d'oncogenèse lui conférant une haute probabilité de répertoire neo-antigénique riche. Cette tumeur est, en effet, dans une grande majorité des cas viro-induite, après infection par le *Merkel Cell Polyomavirus* (MCPV), ce qui rend probable la présence d'antigènes viraux intra-tumoraux. Elle peut également être induite par une exposition prolongée et répétée aux rayons ultra-violet. Elle présente alors une charge mutationnelle très élevée. Enfin 50% des carcinomes à cellules de Merkel expriment PD-L1 dans les études.

Le virus a été retrouvé dans cette série dans 65% des tumeurs. Et les taux de réponse varient selon le mode d'oncogenèse, avec un taux de réponse de 62% parmi les tumeurs MCPV positives et 44% en l'absence d'expression du virus. Les réponses n'étaient par ailleurs, pas corrélées à l'expression de PD-L1, qu'elles soient retrouvées sur les cellules tumorales ou sur les cellules immunitaires du stroma.

Le nivolumab a lui fait preuve de son efficacité dans les carcinomes épidermoïdes ORL en récurrence ou métastatiques, après progression sous un doublet de chimiothérapie à base de platine (Abstract CT099). Maura Gillison *et al.* a présenté les résultats de l'analyse intermédiaire de l'étude de phase III, *CheckMate* 141, randomisée selon un ratio 2 :1 contre un traitement laissé au choix du clinicien (docetaxel, méthotrexate ou cetuximab). Il y avait un bénéfice en survie globale, objectif principal de l'étude en faveur du nivolumab (HR=0,70; p=0,01). La survie globale médiane était en effet de 7,5 mois dans le bras nivolumab contre 5,1 mois dans le bras contrôle. Ce bénéfice était plus marqué dans le sous-groupe de tumeurs HPV induite avec un bénéfice de 4,7 mois en survie globale médiane (9,1 contre 4,4 mois). Ce bénéfice semblait également plus important en cas d'expression de PD-L1.

Enfin en ce qui concerne les anti PD-L1, l'atezolizumab a été étudié en association au bevacizumab et à une chimiothérapie par FOLFOX dans une étude de phase Ib, chez des patients atteints de cancers colorectaux, dont les résultats ont été présentés par Wallin *et al.* Ils montraient un taux de réponse objective de 52% sur les 23 patients évaluable, avec une PFS médiane de 14,1 mois et une durée de réponse estimée à 11,4 mois. Il n'y a pas eu de toxicité inattendue et cette association semble donc une option prometteuse à étudier.

### **La recherche et l'étude des biomarqueurs continuent:**

#### **- PD-L1**

De nombreuses méthodes différentes sont aujourd'hui utilisées pour étudier l'expression de PD-L1, avec non seulement des anticorps différents, mais une méthode d'analyse des lames différente également (étude des cellules tumorales ou des cellules immunitaires du stroma et multiples seuils de positivité). Janis Taube a présenté une comparaison faite entre les différents anticorps et ils semblent, de façon rassurante, permettre d'obtenir des résultats très homogènes.

#### **- PD-L2 suscite à nouveau l'intérêt des chercheurs**

Etant donné le coût et les toxicités non négligeables des innovations thérapeutiques, la recherche de biomarqueurs fiables et universels de réponse à ces traitements est un enjeu de santé publique. Si les controverses sur l'impact de l'expression de PD-L1 sont à présent bien connues de tous, on parle moins souvent du second ligand de PD-1 (*Program Death 1*) : PD-L2 (*Program Death Ligand 2*). Or plusieurs données font penser que PD-L2 pourrait également avoir un rôle prédictif sur la réponse aux anti PD-1 et anti PD-L1. J. Taube nous a présenté des données associant de façon aussi significative l'expression de PD-L2 que celle de PD-L1, à la présence d'une réponse immunitaire adaptative intra-tumorale (identifiée par la présence d'une signature génomique IFN $\gamma$ /TH1).

Trois études retrouvent, par ailleurs, une corrélation entre l'expression de PD-L2 et la réponse

- au Nivolumab (Abstract CT133) : Rodig *et al.* ont présenté les résultats d'une étude ancillaire rétrospective à partir des données de la *CheckMate 064*, qui évaluait l'efficacité de l'association du nivolumab à l'ipilimumab dans les mélanomes avancés. Une expression forte de PD-L2 (seuil de positivité >70% cellules tumorales et/ou immunitaires marquées) était associée à une réponse clinique sous nivolumab, que l'expression de PD-L1 soit forte ou non. Il existait toujours des patients présentant des tumeurs PD-L1 et PD-L2 négatives qui répondaient au traitement.
- à l'Atezolizumab: Dans le bras atezolizumab de l'essai de phase II, étudiant cet anti-PD-L1 dans les carcinomes urothéliaux, il y avait une tendance à un bénéfice en survie globale en cas de forte expression de PD-L2 [13]. Dans POPLAR, étude de phase II de l'Atezolizumab dans les cancers bronchiques non à petites cellules, seul le sous groupe de tumeurs avec une forte expression de PD-L2 semblait bénéficier de l'immunothérapie par rapport au docetaxel [14]. Il y avait en effet un croisement des courbes de Kaplan Meier dans le sous-groupe des tumeurs ayant une expression faible de PD-L2.

#### **- La charge mutationnelle**

L'impact prédictif de réponse aux anti PD-1/PD-L1 de la présence d'une forte charge mutationnelle, déjà mise en évidence dans les cancers du poumon non à petites cellules [15], dans les cancers de vessie [13], dans les cancers du colon avec instabilité des microsatellites [16] et dans les mélanomes [17] se confirme d'une part avec les résultats de l'étude du pembrolizumab dans les carcinomes à cellules de Merkel [12] et d'autre part grâce à des données non publiées, présentées par Taube *et al.* montrant une corrélation entre la réponse au traitement par immunothérapie et la présence d'un haut taux mutationnel au sein des mélanomes.

### **- L'importance d'une combinaison de biomarqueurs**

Il est peu probable qu'un biomarqueur prédictif de réponse unique, telle que la mutation de l'EGFR pour la réponse à l'erlotinib dans les adénocarcinomes bronchiques, puisse être identifié. Et il sera probablement indispensable d'utiliser des combinaisons de biomarqueurs. PD-L1 peut être, par exemple, surexprimé par les cellules tumorales par deux biais. Cette expression peut être intrinsèque à la tumeur et ne témoigne alors plus de la présence d'une réponse immunitaire anti-tumorale pre-existante. Cette expression peut aussi être induite suite à la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T (LT) effecteurs et signer alors l'existence d'une immunité adaptative spécifique de la tumeur. Or les anti PD-1/PD-L1 visent à réveiller le système immunitaire (SI), il est donc fondamental pour leur efficacité qu'une reconnaissance de la tumeur par le SI ait bien eu lieu. L'utilisation d'une association de biomarqueurs, avec en particulier un marqueur des LT effecteurs tel que le CD8, la recherche de l'expression de PD-1 sur ces LT CD8<sup>+</sup> et l'expression de PD-L1, permet de différencier ces deux situations, qui peuvent également co-exister.

### **- Le concept de tumeurs enflammées et de tumeurs froides**

Mis en exergue par plusieurs auteurs, cette dualité tient un rôle prédominant quand à l'étude du profil de sensibilité des tumeurs aux différentes approches d'immunothérapie.

Une tumeur dite « enflammée » va présenter des témoins d'une immunité anti-tumorale préexistante : une infiltration lymphocytaire importante, avec la présence notamment de lymphocytes T CD8 effecteurs et une expression de PD-L1 sur ses cellules tumorales et/ou stromales.

Une tumeur dite « froide » ne présentera aucun infiltrat lymphocytaire et sera en règle PD-L1 négative.

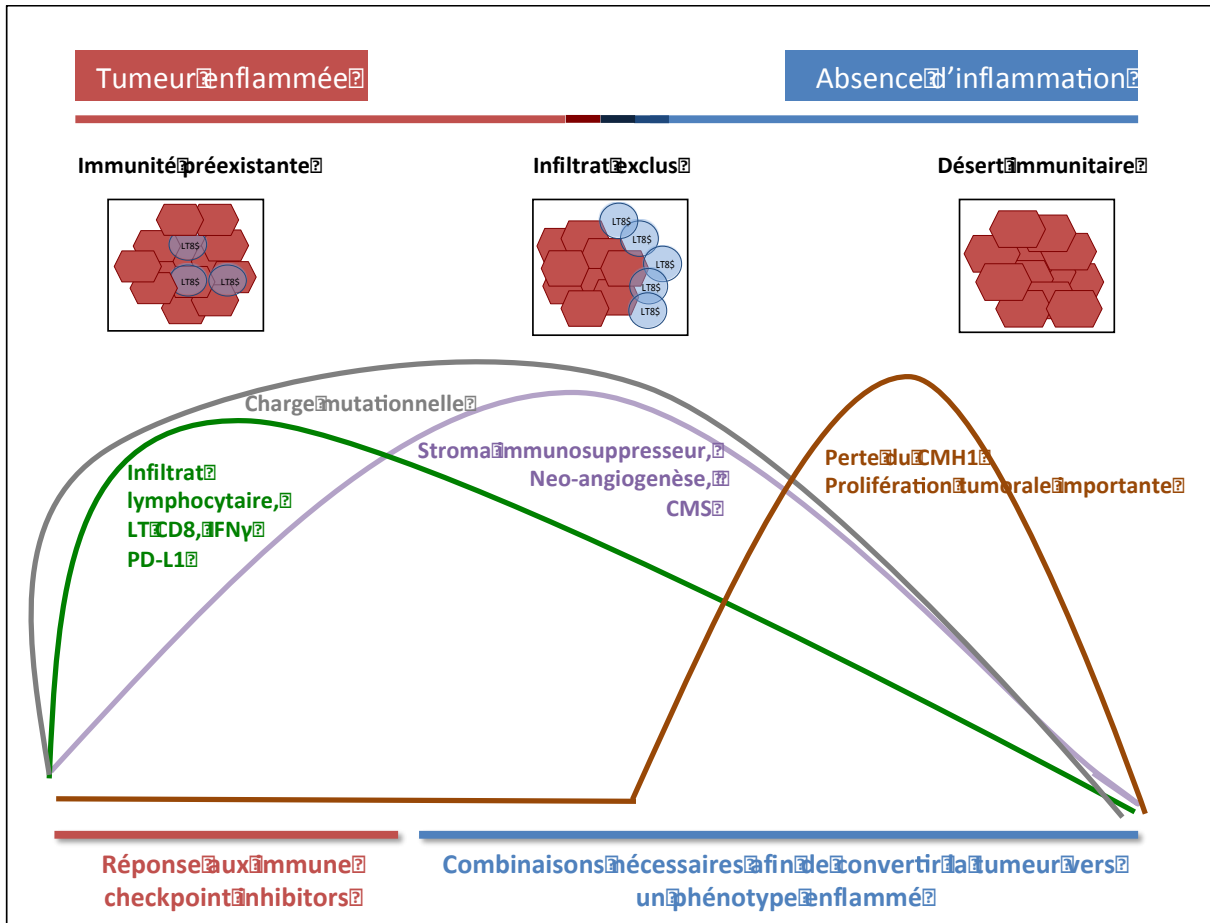
- **Les différentes stratégies immunothérapeutiques** : D'après les présentations de P. Hegde et A. Ribas.

Le pouvoir des LT effecteurs repose sur l'activation d'une réponse immunitaire adaptative. Les tumeurs mettent en jeu divers mécanismes afin d'échapper secondairement à cette forme d'immunité et se protéger des attaques cellulaires T. C'est ainsi que l'on explique qu'un cancer pourtant immunogénique puisse se développer chez un patient immunocompétent.

On différencie 3 types de tumeurs selon l'absence d'infiltrat lymphocytaire (désert immunologique) ou sa présence, et le fait qu'il se localise alors exclusivement en périphérie de la tumeur (infiltrat exclus) ou également en intra-tumoral (tumeurs enflammées).

- Les tumeurs enflammées sont les candidates optimales à un traitement par ICI.
- En cas de désert immunitaire, deux approches semblent prometteuses : Les thérapies inductrices de réponse immunitaire (ex : vaccin thérapeutique, transfert adoptif de cellules T) et les thérapies pourvoyeuses de mort cellulaire immunogénique. Des données ont été présentées notamment avec une chimiothérapie par FOLFOX et bevacizumab, qui permettent d'augmenter l'infiltrat CD8 intra-tumoral sous traitement (Wallin et al. Abstract 2651) et l'expression de PD-L1. Des résultats similaires ont été retrouvés avec les thérapies ciblées anti-BRAF et anti-MEK dans le mélanome, permettant une majoration de l'infiltrat LT CD8 intra-tumoral, que ce soit in vivo ou sur étude de biopsies avant et après traitement [18, 19]). L'objectif étant, par une approche si nécessaire combinatoire, d'induire une réponse immunitaire et de permettre une conversion d'un phénotype tumoral « froid » à « enflammé ».
- En cas d'infiltrat exclus, il faut alors cibler les barrières induites par la tumeur (traitement anti-angiogéniques, chimiokines...) afin de permettre au système immunitaire d'accéder à sa cible.

La compréhension des mécanismes de résistance aux immunothérapies permettra d'autant mieux guider et rationaliser les futures combinaisons thérapeutiques (**Figure 2**). Et le meilleur outil permettant de les étudier sont les biopsies itératives : avant, pendant et après traitement.



**Figure 2.** Le continuum entre les phénotypes immunitaires tumoraux (D'après Hegde et al[9]).

*Sur la gauche :* Les tumeurs où une immunité préexistante existe, sont représentées par une charge mutationnelle en général importante, la présence de lymphocytes T (LT) CD8 intra-tumoraux, d'interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) et/ou l'expression de molécules de co-stimulation inhibitrices, telles que PD-L1. On parle de tumeurs avec un phénotype enflammé.

***Sur la droite :** Les tumeurs dites « non inflammées » sont en général stables sur le plan génomique et très proliférantes. Elles ont perdu l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMHI) et ne sont donc plus reconnues par les LT. On ne visualise aucun infiltrat lymphocytaire.*

***Au milieu :** Les tumeurs de phénotype intermédiaire peuvent présenter un fort taux mutationnel, mais présentent un infiltrat immunitaire « exclus » (en périphérie de la tumeur). Elles sont marquées par un stroma immunosuppresseur (avec en particulier la présence de cellules myéloïdes suppressives (CMS)) et une importante neo-angiogenèse, inhibant les LT ou en gênant l'accès à la tumeur.*

#### **Pour les immunologistes :**

##### **- La signature mésenchymateuse**

Un nouveau concept a été présenté par P. Hegde. Il a été récemment mis en évidence une association entre la présence de marqueurs tumoraux d'un phénotype mésenchymateux et l'exclusion de l'infiltrat immunitaire de la tumeur.

Diverses données dans le mélanome [21] et dans les cancers de vessie [13] sont concordantes pour montrer une inefficacité des ICI en cas de sous type mésenchymateux.

##### **- Le répertoire neo-antigénique des cancers.**

Ton Schumacher a présenté en séance plénière, le résultat de ses recherches sur le répertoire neo-antigénique des cancers, permettant leur reconnaissance par les LT.

Il a en effet été démontré la présence fréquente de neo-antigènes tumoraux chez les patients atteints, par exemple, de mélanome [22, 23] et une relation a été démontrée entre la charge

mutationnelle tumorale et la réponse aux anti PD-1 [15, 16]. Mais peu de réponses cellulaires T sont effectivement observées chez les patients atteints de mélanome et la plupart de ces antigènes dérivent de mutations ayant une faible probabilité d'impact sur le fonctionnement cellulaire.

Trois conclusions sont à retenir : La reconnaissance cellulaire T de neo-antigène est fréquente dans les tumeurs présentant une haute charge mutationnelle et de nombreuses tumeurs présentent un nombre suffisamment important de neo-antigènes pour les envisager comme cible thérapeutique. Les réponses T spontanées observées sont loin de couvrir tous les neo-antigènes possibles, certains neo-antigènes semblant « négligés » par le système immunitaire de l'hôte. La majorité des neo-antigènes retrouvés dans les tumeurs considérées comme immunogéniques (telles que les mélanomes et les carcinomes bronchiques non à petites cellules) ne semblent pas correspondre à des éléments impliqués dans le fonctionnement optimal de la cellule et on observe parfois une modification induite de ces neo-antigènes sous pression thérapeutique.

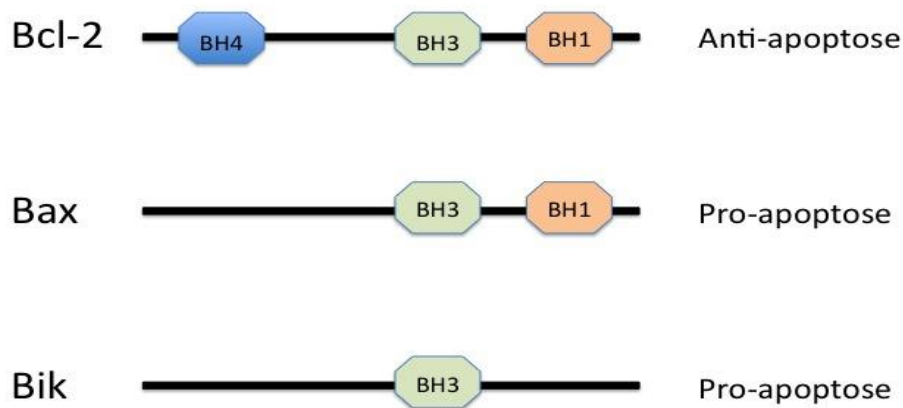
*« The cytotoxic T cell is the actual drug » A. Ribas*

**Essais précoces, voies de signalisation et thérapies ciblées, Anne Kieffer**

### **Cibler la famille Bcl-2 dans la leucémie lymphoïde chronique**

La famille des protéines BCL-2 est fréquemment surexprimée dans les LLC, et stimule la croissance de cellules tumorales (**Figure 3**).





**Figure 3.** Structures de la famille des protéines Bcl-2. Selon leurs domaines BH, ces protéines peuvent être classées en 3 catégories. La catégorie Bcl-2 ayant un domaine BH4 (comme Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1(BFL-1) et Boo) ont un rôle anti-apoptotique.

Le Venetoclax est un antagoniste sélectif de BCL-2 qui a récemment démontré une efficacité dans les LLC en cas de délétion 17p [24]. Il s'agit d'une thérapie orale administrée à la dose de 200mg/j, approuvée par la FDA en avril 2016. Les patients porteurs de la délétion 17p obtenaient une réponse tumorale objective dans 80% des cas, de longue durée. Des études sont en cours sur l'association du Venetoclax avec divers agents anti-tumoraux, en particulier le rituximab dans une phase Ib dont les résultats préliminaires ont été présentés à l'ASH 2015 (23 réponses complètes et 10 réponses partielles sur les 49 patients inclus initialement). De même, l'association avec l'Ibrutinib favoriserait la sensibilité des cellules de la LLC au Venetoclax [25].

### **BGB-283 dans les tumeurs mutées B-RAF, K-RAS et N-RAS**

Les résultats d'un essai de phase I ont été présentés par l'équipe de l'Hôpital Royal Melbourne, étudiant un nouvel agent ciblant la famille RAF : le BGB-283, dans des tumeurs solides présentant des mutations BRAF, KRAS et NRAS. Des inhibiteurs spécifiques de la protéine mutante V600E BRAF sont d'ores et déjà utilisés dans le traitement de patients atteints de mélanome avec des mutations du gène BRAF de V600E. Le BGB-283 fonctionne différemment de ces inhibiteurs de BRAF V600E, en inhibant l'activité de toutes les protéines de la famille RAF et la protéine mutante BRAF V600E. L'hypothèse initiale de l'équipe du Dr Desai était que le BGB-283 pourrait avoir une activité anti-tumorale contre les tumeurs porteuses de mutations non-BRAF V600E. Les effets des mutations RAS étant canalisés par des protéines de la famille BRAF, il pourrait ainsi avoir une activité anti-tumorale contre les tumeurs RAS mutées. Au 31 octobre 2015, 31 patients étaient inclus, présentant un cancer avec des mutations BRAF, KRAS, ou NRAS. Les patients étaient assignés à une des sept doses de BGB-283, allant de 5 mg par voie orale une fois par jour à 60 milligrammes une fois par jour. La dose maximale tolérée a été déterminée à 40 milligrammes de BGB-283 une fois par jour. Parmi les 29 patients traités par BGB-283 avec une réponse évaluable, 3 étaient en réponse partielle, et 14 avaient une maladie stable. Les 3 patients en réponse partielle confirmée étaient suivis respectivement pour un mélanome muté BRAF V600E, un cancer de l'endomètre KRAS muté et un cancer de la thyroïde avec une mutation BRAF V600E. La durée de réponse était non atteinte, supérieure à 200 jours au moment du recueil des données. La patiente porteuse d'un cancer de l'endomètre avait une durée de réponse de 411 jours et une survie sans progression de 455 jours. La toxicité limitante était la thrombopénie. Les événements indésirables les plus courants étaient la fatigue, l'anorexie, la constipation, la thrombopénie, les nausées et vomissements, et les rashes acnéiformes. Les événements indésirables de grade 3 rapportés étaient la thrombopénie, la fatigue et la cytolyse hépatique.

## **Crizotinib et carcinome rénal papillaire de type 1**

Dr P. Schoffski (Louvain, Belgique) a présenté les résultats préliminaires de l'essai de l'EORTC « CREATE » dans la sous-population des carcinomes rénaux papillaires à cellules claires de type I (PRCC 1). L'essai CREATE est une phase II prospective non randomisée en cours, étudiant l'activité anti-tumorale et la tolérance du crizotinib dans 6 types de tumeurs avancées porteuses de la mutation ALK et/ou MET, incluant des lymphomes anaplasiques à grandes cellules, des tumeurs myofibroblastiques inflammatoires, des carcinomes papillaires rénaux de type 1, des sarcomes alvéolaires des parties molles, des sarcomes à cellules claires et des rhabdomyosarcomes alvéolaires. Le crizotinib est administré per os à la dose de 250mg 2 fois par jour. Le PRCC 1 est une forme rare de cancer du rein, présentant une mutation germinale de MET au niveau des exons 16-19 dans environ 50% des cas, et somatique dans 13 à 17% des cas. Une première phase II s'était intéressée au PRCC de type 1, étudiant un autre inhibiteur des tyrosine kinases : le foretinib [26]. Parmi les 41 patients, 23 étaient suivis pour un PRCC 1 dont 4 présentaient une mutation MET. Dans le sous-groupe des patients mutés MET, la durée du traitement était 2 fois plus longue que dans le sous-groupe non muté. 2 patients MET+ ont eu une réponse partielle très précoce et durable : un patient continue toujours le crizotinib, le deuxième a arrêté après 40 cycles mais était toujours répondeur. Il n'y a eu aucune réponse complète objectivée dans le groupe des PRCC 1.

## **Entrectinib, inhibiteur pan-Trk, ROS1 et ALK**

Deux phases I (STARTRK-1 [27] et ALKA 372-001) ont étudié l'Entrectinib chez des patients n'ayant jamais été traités par inhibiteur de tyrosine kinase et suivis pour un cancer avancé présentant un réarrangement des gènes NTRK1, NTRK2, NTRK3, ROS1 et ALK. 119 patients ont été inclus, 24 étaient répondeurs, dont 19 avec une réponse supérieure à 6 mois. Une mise à jour de ses résultats, déjà présentés à l'ESMO en 2015, a été faite par le Dr A. Drillon, de l'équipe médicale du Memorial Sloan Kettering Cancer Center, de New York.

L'Entrectinib est un inhibiteur de ROS, ALK et pan-Trk [28], administré per os à la posologie de 600mg/j en une prise. Parmi les 19 patients répondeurs en septembre 2015, on retrouvait des cancers bronchiques non à petites cellules, des cancers colorectaux, des mélanomes et des tumeurs du système nerveux central. Après 11 mois de médiane de survie, 11 de ces patients étaient toujours répondeurs, et poursuivaient le traitement par Entrectinib. Dans le sous-groupe des tumeurs présentant un réarrangement ROS1 (n=14), le taux de réponse objective était de 86%, dont 2 réponses complètes. Un patient suivi pour un CBNPC avec réarrangement ROS1 était toujours en réponse complète depuis 27 mois. Dans le sous-groupe des réarrangements NTRK (n=5), 100% des patients étaient répondeurs, dont 3 réponses spectaculaires chez des patients suivis pour des tumeurs du système nerveux central. Sur le plan de la tolérance, les principaux effets secondaires rapportés étaient la fatigue (47%), une dysgueisie, des myalgies et arthralgies, des paresthésies, ainsi que des cas de diarrhées. L'Entrectinib semble donc être avoir un bon profil de tolérance, avec un passage intéressant de la barrière hémato encéphalique, ainsi qu'une activité anti-tumorale rapide et durable dans les tumeurs présentant des réarrangements NTRK 1/2/3, ROS1 et/ou ALK. Une phase II (STARTRK-2) est en cours d'inclusion pour confirmer ces résultats.

### **LOXO-101, inhibiteur sélectif de Trk A/B/C**

L'équipe du Dr D. Hong (Houston) a présenté une mise à jour des résultats d'une phase I étudiant LOXO-101 [29], un TKI ciblant la famille des protéines NTRK (Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptors). Sur les 30 patients inclus, 7 présentaient un réarrangement NTRK. 5 de ces 7 patients ont obtenu une réponse partielle selon les critères RECIST, et 6 de ces patients poursuivaient toujours le traitement après au moins 7 cycles. Cet essai incluait également des tumeurs ne présentant pas de réarrangement NTRK, mais ceux-ci n'ont pas montré de résultats en terme de réponse tumorale. LOXO-101 avait un bon profil de

tolérance, avec principalement une fatigue et une constipation. L'étude a utilisé un schéma d'escalade de doses (50mg/j, 100mg/j, 200mg/j, 100mg x 2/j, 150mg x 2/j), la dose maximale tolérée n'a pas été atteinte. Un essai de phase II est prévu, étudiant LOXO-101 à la dose de 100mg x 2/j et incluant uniquement des patients porteurs de tumeurs présentant un réarrangement NTRK.

**Génomique, Anthony Turpin**

**Cancer genomics : a translational future par Elaine Mardis** (Washington University school of medicine, Saint Louis, MO)

En session plénière, Elaine Mardis a mis en relief la thématique principale du congrès qui est l'utilisation de la génomique comme outils translationnels pour identifier des patients répondeurs aux immunothérapies.

Depuis les travaux précoces de Thierry Boon et Hans Schreiber [30] suggérant que des mutations peuvent parfois s'exprimer fonctionnellement sous forme d'antigènes tumoraux spécifiques, James Allison et Bert Vogelstein [31] ont prédit que certaines tumeurs peuvent exprimer des antigènes issus du répertoire génomique et de l'existence de certains variants codants. Auparavant, l'identification du paysage mutationnel tumoral et de ses peptides les plus immunogènes était soumise à des difficultés technique, affranchies de nos jours par le séquençage haut débit (NGS) et des approches bio-informatiques.

Les données soumises à des algorithmes modélisent le portage des peptides au CMH, calculent les énergies de liaison, produisent une liste d'antigènes spécifiques mutés tumoraux ou néoantigènes. La charge néoantigénique tumorale, une fois décrite, peut être utilisée pour

la création d'un vaccin destiné à induire une réponse immunitaire contre des antigènes spécifiques.

**Genome editing using CRISPR-Cas9 systems par Feng Zhang** (Massachusetts institute of technology, Cambridge, MA)

Les sessions génomiques de l'AACR 2016 ont aussi été largement consacrées au système CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats )-Caspase9 qui a fait l'objet d'une présentation en séance plénière par Feng Zhang, l'un des pères de CRISPR avec la française Emmanuelle Charpentier.

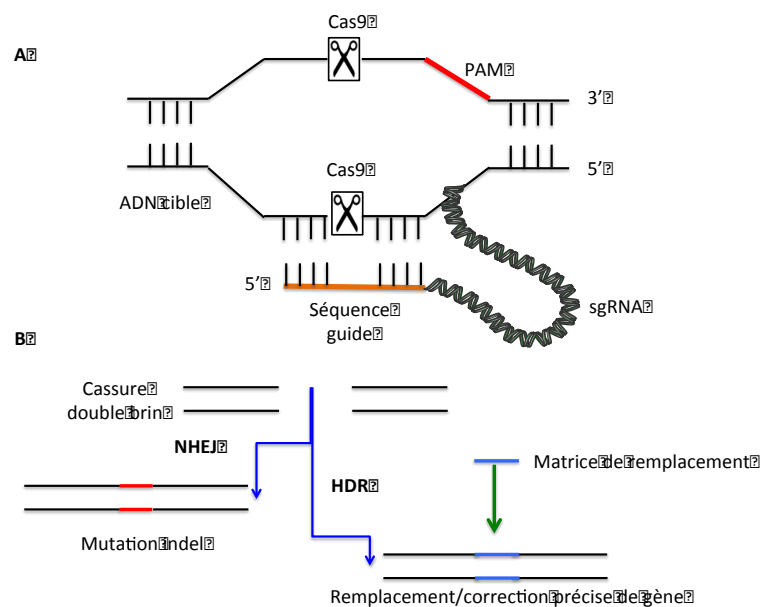
Revenons en quelques mots d'abord sur la description puis la genèse de cet outil d'édition site-spécifique du génome et de modulation de l'épigénome pour mieux comprendre son caractère révolutionnaire et les enjeux scientifiques qui en découlent.

Le système CRISPR-Cas9 a de prime abord été identifié comme un système de défense antiviral entraînant une immunité adaptative des bactéries contre les bactériophages [32] (PMID 26432244). Les loci CRISPR, constitués de courtes séquences (30 à 40 paires de bases) répétitives et partiellement palindromique espacées par de courtes séquences dites « d'espacement » ou « d'écartement » sont transcrits en ARN, qui sont associés à des protéines de clivages Cas.

Le système CRISPR-Cas9, le plus décrit, même s'il existe de nombreux variants, comporte donc une endonucléase appelées Cas 9 et un ARN simple guide (« single guide RNA » ou sgRNA) qui est un hybride de l'ARN CRISPR crRNA et de l'activation transcriptionnelle crRNA (tracrRNA) [33] (PMID: 26044706). Lorsque la séquence PAM (protospacer adjacent motif) est au niveau du brin d'ADN adjacent, le sgRNA se lie avec la séquence cible par appariement de bases et guide Cas9 pour couper la séquence d'ADN site-spécifique, générant des cassures doubles brins d'ADN. Ensuite, les mécanismes de réparation de l'ADN de type

recombinaison non homologue et recombinaison homologue entrent en jeu et sont complémentaires. Le premier peut entraîner des mutations indels, le second est plus précis aboutissant à un remplacement du gène.

Les applications dans le domaine de la cancérologie sont nombreuses comme l'a précisé Feng Zhang. Le système CRISPR-Cas9 est capable d'induire des mutations perte de fonction, gain de fonction et des réarrangements chromosomiques *in vitro* et *in vivo*. Le système est simple à définir, facile d'utilisation, capable de générer des modèles d'étude en modélisant des mutations oncogéniques *in vitro*, de recréer des modèles tumoraux animaux de manière simplifiée comme par exemple celui de Maddalo et coll [34] qui ont administré de manière intratrachéale des vecteurs Cas9/sgRNA ciblant EML4 et ALK dans des modèles murins. Les cassures double brins résultants dans l'intron 19 du gène ALK et l'intron 14 de EML4 ont stimulé les processus de réparation de l'ADN aboutissant à un réarrangement de EML4-ALK et à des tumeurs pulmonaires avec des caractéristiques similaires à ceux des adénocarcinomes ALK humains (Figure 4).



**Figure 4.**

A : Le système

Cas 9 utilise une stratégie de reconnaissance ARN-ADN. Lorsque le PAM (protospacer adjacent motif) se situe au niveau du brin d'ADN opposé, le sgRNA guide la caspase 9 pour couper la séquence d'ADN de manière site-spécifique, entraînant des cassures double brin

B : les cassures double brin sont ensuite soumises aux systèmes de réparation de l'ADN homologue (HDR : homologous directed repair) et NHEJ (nonhomologous end-joining). Le NHEJ est générateur d'erreurs de réparation sous forme de mutations indel tandis que l'HDR complète la correction précise du gène.

Feng Zhang lors de la plénière a présenté une nouvelle application d'un complexe CRISPR-Cas9 sous forme de machinerie structuro-guidée pouvant induire une activation transcriptionnelle efficace à des loci géniques endogènes. Ce complexe d'activation de Cas9 via l'ingénierie créé permet de mieux comprendre le ciblage du sgRNA pour aboutir à une transactivation efficace, de démontrer une activation multiplexée simultanée de 10 gènes et de surexprimer des transcrits d'un long ARN non codant intergénique (lincRNA).

L'équipe a également créé une librairie composée de 70290 gènes guides via un système lentiviral, ciblant toutes les isoformes codantes des RefSeq humains pour mettre en avant les gènes qui une fois activés confèrent une résistance à des inhibiteurs de BRAF.

Il existe des applications potentielles de CRISPR-Cas 9 dans la thérapie des cancers non limitées aux manipulations thérapeutiques du génome, comme la lutte contre les infections oncogéniques ou encore le développement de médicaments anticancéreux.

### **Vers un modèle statistique de description des signatures mutationnelles des cancers ?**

L.Alexandrov (Los Alamos national laboratory, Los Alamos, NM)

Les processus mutationnels successifs (par carcinogènes, par le jeu du hasard) survenant lors de l'évolution entre le moment de la fécondation (zygote) et le développement de la cellule cancéreuse sont peu étudiés.



Dans un article de janvier 2013, paru dans Cell Reports [35], les auteurs mettent en avant des approches computationnelles à partir de catalogues mutationnels issus de génomes de cancers, qui fournissent une base pour déchiffrer les signatures mutationnelles des cancers. L'un des algorithmes utilisés, jugé suffisant pour extraire des composants biologiquement significatifs à partir de données biologiques complexes est la factorisation par matrice non négative (NMF) [36].

L'idée, grâce à ces approches computationnelles est la mise en évidence d'un mécanisme pathogénique sous-jacent commun à tous les cancers pouvant être prédictible avec des algorithmes statistiques.

### **Vers un modèle statistique de description de l'évolution naturelle des cancers ?**

A.Sottoriva (The Institute of cancer Research London, London, UK)

Dans la continuité de l'article de Ludmil Alexandrov, l'équipe d'Andrea Sottoriva [37] a montré dans un article paru dans Nature Genetics en mars 2016, qu'une loi de puissance neutre est vérifiée dans 323/904 cancers issus de 14 types tumoraux et de différentes cohortes séquencées en NGS. Dans les tumeurs identifiées comme évoluant de façon neutre, la sélection clonale a eu lieu avant le début de la croissance tumorale et non dans les sous-clones tardifs responsables de l'hétérogénéité intratumorale.

La propagation de mutations est donc théoriquement prévisible à partir de lois naturelles, tout comme nous pouvons prédire le mouvement des corps célestes ou encore le temps. Les cliniciens pourraient donc à terme utiliser la génomique et notamment le séquençage de biopsies tumorales, pour baser leurs décisions thérapeutiques à partir sur la façon « prévisible » dont le cancer d'un patient va évoluer selon des modèles mathématiques pour déterminer les meilleures armes thérapeutiques à utiliser.

## **Cellules souches cancéreuses, processus métastatique et résistance aux traitements,**

Clément Dumont

Durant la session plénière d'ouverture du 17/04 le Dr Fuchs (Howard Hugues Medical Institute, New York) est revenue sur les travaux menés dans son laboratoire à l'aide de modèles murins sur les cellules souches de follicules pileux, comme moyen d'étude de la transition cyclique entre un état cellulaire quiescent et un état prolifératif dépendante du micro-environnement, et les cellules initiatrices de tumeurs (CIT) de carcinomes épidermoïdes issus de la transformation maligne de ces cellules souches [38]. Elle a premièrement expliqué que, tandis que l'état quiescent des cellules souches normales est sous la dépendance de la signalisation BMP/SMAD/FOXO1 (un KO conditionnel de FOXO1 provoquant une accélération des cycles pileux mais également une attrition des cellules souches avec l'âge), à l'inverse les différents rythmes de prolifération observés parmi les CIT de carcinomes épidermoïdes sont liés aux variations de sécrétion de TGF- $\beta$  dans leur micro-environnement, elles-mêmes associées aux conditions de microvascularisation : les CIT proches des vaisseaux, plus exposées au TGF- $\beta$ , présentent un cycle cellulaire plus lent et des propriétés d'invasion supérieures ; la signalisation TGF- $\beta$  est également responsable au niveau de l'interface tumeur/stroma d'une perte de cohésion des cellules tumorales et de ruptures de la membrane basale ; l'ensemble de ces phénomènes favorise la dissémination hématogène [39]. Par ailleurs l'exposition au TGF- $\beta$  est associée à la résistance au cisplatine des CIT qui seront ensuite responsable de la repopulation tumorale, comme démontré par des études de lignage *in vivo*. Dans un deuxième temps, le Dr Fuchs a rapporté les résultats d'études de *ChIP-sequencing in vivo* qui révèlent que les facteurs de transcriptions associés au phénotype des cellules souches pileuses normales s'associent collectivement à l'ADN sur environ 400 régions régulatrices *super-enhancers* [40], avec un profil variable en fonction du micro-environnement et/ou des conditions de culture. Dans leur modèle de carcinome

épidermoïde issu de la transformation maligne de cellules souches de follicule pileux dépendante de HRas, les CIT de la jonction tumeur/stroma présentent en comparaison un profil chromatinien unique, reflétant les conditions particulières du micro-environnement tumoral ; des gènes favorisant la tumorigénèse, par exemple *Src* et *Myc* sont ainsi transcrits sous la dépendance de *super-enhancers*. Les facteurs de transcriptions associés à ces *super-enhancers* régulateur des CIT sont majoritairement différents de ceux important pour les cellules souches normales ; en particulier la plupart des *super-enhancers* présentent des sites de fixation pour les facteurs de transcription de la famille ETS/ELK, dont l'activité est contrôlée par la voie des MAP-kinases. Etant donné que la présence d'une forme phosphorylée d'ETS2 suffit elle-même à induire un profil chromatinien typique de CIT, ETS2 peut donc être considéré comme un facteur de transcription « pionnier » dans le remodelage chromatinien des CIT.

Plusieurs travaux notables récemment publiés par des équipes étudiant les cellules souches cancéreuses (CSC) ou CIT ont par ailleurs été présentés au cours du congrès.

Le Dr Parada (MSKCC, New York) a présenté les résultats d'études menées sur un modèle murin transgénique de glioblastome spontané induit par la perte de *Nf1*, *Pten* et *Trp53* [41]. Son équipe a pu démontrer que deux types de cellules progénitrices peuvent être à l'origine de tumeurs : des progéniteurs neuraux de la zone subventriculaire et des progéniteurs oligodendrocytaires. Bien que les tumeurs arborent les mêmes anomalies génétiques ces origines cellulaires distinctes sont associées à des profils transcriptionnels différents, reflétant des sous-types de glioblastomes humains déjà décrits à partir de données issues du TCGA.

Le Dr Chan (Baylor College of Medicine, Houston) est revenu sur les travaux menés par son équipe [42] sur des xénogreffes dérivées de patients (PDX) atteints de cancer de vessie non-répondeurs à la chimiothérapie néo-adjuvante : ils ont tout d'abord identifié les cellules

tumorales de phénotype basal (CK14+) comme des cellules souches cancéreuses fonctionnelles capables d'initier une croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*, présentant une résistance accrue et, paradoxalement, une prolifération accélérée après exposition à la chimiothérapie. Ils ont démontré que l'apoptose des cellules tumorales prolifératives induite par la chimiothérapie est responsable d'un relargage de prostaglandine E2 (PGE2), qui favorise secondairement la prolifération des cellules CK14+, créant un phénomène de repopulation [43] entre plusieurs expositions successives à la chimiothérapie. Des analyses d'expression génique révèlent en effet que les cellules CK14+ présentent un profil de réponse à la PGE2 similaire à celui arboré par des cellules souches adultes normales en cas de dommage tissulaire. Dans leur modèle l'inhibition de la synthèse de PGE2 par l'adjonction séquentielle de Celecoxib inhibe le phénomène de repopulation et amplifie l'efficacité de la chimiothérapie.

Un symposium a par ailleurs été dédié aux mécanismes de plasticité cellulaire non-génétique associés à la résistance aux traitements antitumoraux.

Le Dr Ramaswamy (Harvard, Boston) a tout d'abord décrit un état d'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 précoce observé dans une fraction cellulaire minoritaire de multiples lignées *in vitro* et caractérisé par une sous-expression d'AKT1 en réponse à une diminution de la signalisation médiée par l'intégrine  $\beta 1$  ; ces cellules  $AKT^{low}$ , intrinsèquement résistantes à diverses conditions de stress, relarguent par ailleurs des exosomes qui peuvent créer des niches favorisant extrinsèquement la résistance des cellules proliférantes ; enfin les cellules  $AKT^{low}$  de plusieurs lignées peuvent acquérir un phénotype de cellules initiatrices de tumeurs *in vivo*, phénomène réversible par l'interférence avec JARID1B. Dans un modèle *in vivo* le ciblage de l'intégrine- $\beta 1$  permet une éradication des cellules  $AKT^{low}$  et une sensibilité accrue aux taxanes.

Le Dr Hangauer (UCSF, San Francisco) a ensuite rapporté des résultats inédits issus de l'analyse génomique fonctionnelle de lignées cellulaires de cancer bronchique EGFR muté et de cancer du sein surexprimant HER2 résistantes à l'Erlotinib et au Lapatinib, respectivement ; l'étude par RNAseq a mis en évidence, parmi d'autres voies de signalisation activées, l'importance de la détoxification des peroxides lipidiques par l'enzyme Gluthation peroxidase 4 (GPX4). Le ciblage de la GPX4 par le RSL3, un inhibiteur compétitif, déclenche dans ces cellules « persistantes » un phénomène de mort cellulaire programmée non-apoptotique appelé ferroptose [44], caractérisé par une importante production fer-dépendante de radicaux libres.

Enfin le Dr Sordella (Cold Spring Harbor Laboratory) a rappelé, également dans le contexte de la résistance aux inhibiteurs d'EGFR de première génération dans les cancers bronchiques, l'importance des cellules CD44<sup>high</sup>/AXL<sup>+</sup> présentes avant traitement [45], qui subissent de manière stochastique un phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse favorisée par le TGF- $\beta$ . Selon ses travaux récents ces cellules AXL<sup>+</sup> présenteraient une sous-expression des gènes de réparation de l'ADN par homologie de séquences (HDR), secondairement responsable d'une diversification génétique favorisant l'émergence de résistances. Le caractère réversible de ce phénomène par l'inhibition pharmacologique de la signalisation TGF- $\beta$  offre une perspective thérapeutique dans la prévention de ce type de résistance.

Les bases biologiques du processus métastatique ont également fait l'objet de plusieurs présentations orales.

Le Dr Malanchi (Francis Crick Institute, Londres) est revenue sur ses travaux récemment publiés [46] démontrant, dans un modèle murin de cancer du sein, l'importance de l'infiltration préalable des organes cibles par les polynucléaires neutrophiles dans l'initiation du processus métastatique, par un mécanisme lié à une sécrétion locale de leucotriènes ; dans

ce modèle l'inhibition pharmacologique de la 5-lipo-oxygénase (Alox5, enzyme productrice de leucotriènes) par le Zileuton, un médicament commercialisé pour le traitement de l'asthme, est efficace pour diminuer la progression métastatique.

Le Dr Werb (UCSF, San Francisco) a rapporté les résultats d'études d'expression génique sur cellules individuelles menées sur des PDX de cancer du sein, qui identifient à l'aide d'une signature comportant 49 gènes un profil d'expression *basal-like* ou *stem-like* propre aux cellules issues de métastases de faible volume [47] ; les cellules présentant ce profil présentent un potentiel métastatique plus de 100 fois supérieur à des cellules provenant des transplants primitifs et sont capables de reconstituer des tumeurs d'architecture luminale, ce qui les caractérise comme cellules initiatrices de métastases ; dans ce modèle la sortie de ces cellules de l'état quiescent, associée à une normalisation de l'expression de *Myc* diminuée dans cet état, les rend sensibles au Dinaciclib, un inhibiteur de CDK4/6, avec un effet spécifique de ce traitement sur la dissémination métastatique, sans effet sur la croissance du transplant primitif.

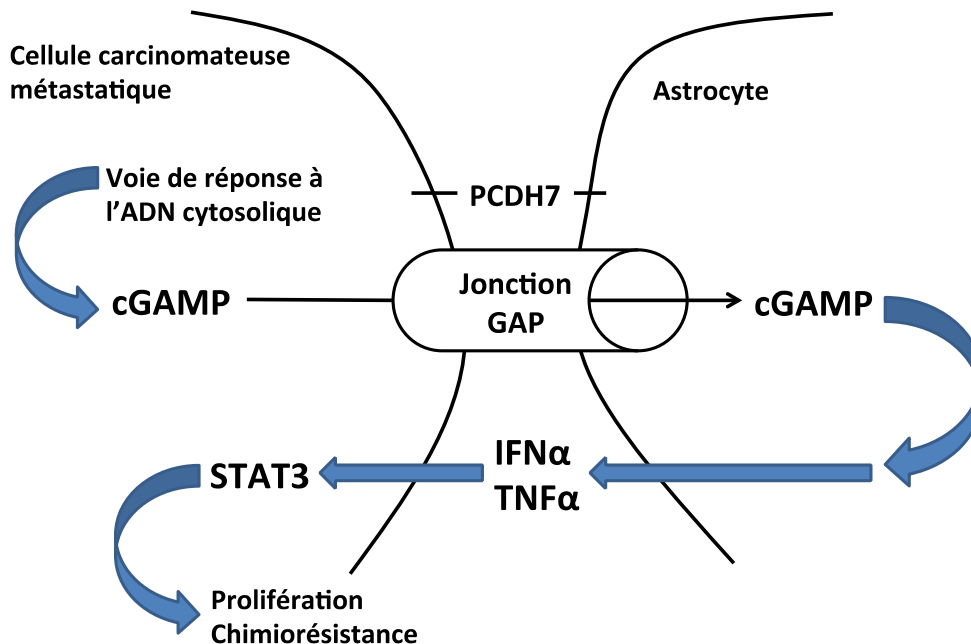
Se basant également sur des études d'expression génique sur cellules individuelles le Dr Battle (IRB, Barcelone) a rapporté que le profil d'expression spécifique du sous-groupe moléculaire consensuel (CMS) de cancers colorectaux (CCR) localisés dit « mésenchymateux » (CMS4 [48]) était lié à un enrichissement du stroma en fibroblastes associés au cancer (CAF) porteurs de cette signature induite par le TGF- $\beta$  ; celle-ci, présente dans 60% des CCR, constitue un facteur prédictif de rechute métastatique indépendant du groupe CMS [49]. A partir de ces observations son équipe a pu démontrer, dans des modèles de PDX, l'interdépendance entre cellules cancéreuses productrices de TGF- $\beta$  et fibroblastes ainsi qu'une association entre sécrétion tumorale de TGF- $\beta$  et fréquence de cellules initiatrices de métastases ; par ailleurs, dans des modèles d'organoïdes, ils ont confirmé l'effet suppresseur de tumeur de la signalisation TGF- $\beta$  sur les lignées cellulaires de CCR conservant

une voie de signalisation canonique TGF- $\beta$ R/SMAD fonctionnelle. Ces observations suggèrent un intérêt des inhibiteurs des récepteurs du TGF- $\beta$  dans les CCR métastatiques, en premier lieu ceux arborant des anomalies inactivatrices de cette voie, par un effet indirect sur les cellules stromales, ce que confirment leurs expériences menées sur des PDX avec le Galunisertib.

Le Dr Massagué (MSKCC, New-York) a résumé les travaux récemment publiés par son équipe [50] portant sur le phénomène de latence métastatique et menés des modèles de souris *nude* transplantées avec des lignées cellulaires de cancer bronchique EGFR muté et de cancer du sein surexprimant HER2 : en absence de métastases macroscopiques ils ont pu identifier dans différents organes des cellules capables de latence (LCC), majoritairement quiescentes *in vivo*, et particulièrement aptes à disséminer, toujours sous forme de LCC, après purification et réinjection à la souris *nude*. Le profil transcriptionnel de ces LCC approche celui des cellules souches adultes et/ou des cellules progénitrices normales de l'épithélium d'origine (sein ou poumon, respectivement) et est caractérisé par une importante expression des facteurs de transcription Sox9 et (dans le cas du cancer bronchique) Sox2, dont dépend leur capacité à s'implanter dans les organes distants. Ayant observé que ces LCC sont à l'origine de métastases macroscopiques après réinjection dans des souris NSG (massivement immunodéprimées) cette équipe a démontré que les lymphocytes NK sont capables de les détruire lors de leur sortie de l'état quiescent. Le mécanisme, démontré à l'aide de PDX, par lequel ces LCC maintiennent leur état quiescent et échappent ainsi à l'immunosurveillance est une sécrétion autocrine de DKK1, un inhibiteur de la voie Wnt, induite par Sox2.

Le Dr Massagué a également décrit des travaux récents (à paraître dans *Nature*) portant sur la voie de réponse à l'ADN cytosolique (voie cGAS-cGAMP-STING [51]) dans les métastases cérébrales : l'activation de cette voie dans les cellules carcinomateuses est transmise aux astrocytes à travers des jonctions GAP laissant circuler le cGAMP, entraînant une sécrétion

astrocytaire d'IFN- $\alpha$  favorisant, *via* STAT3, la croissance et la résistance aux traitements des cellules métastatiques. Dans un modèle murin l'association de Carboplatine à un inhibiteur de jonctions GAP permet d'améliorer la chimiosensitivité des métastases cérébrales (**Figure 5**).



**Figure 5.** Rôle de la diffusion transcellulaire par les jonctions GAP entre les cellules carcinomateuses métastatiques et les astrocytes de la voie de signalisation de la réponse à l'ADN cytosolique comme élément favorisant la prolifération et la résistance de cellules carcinomateuses (D'après la présentation de J. Massagué, AACR 2016. PCDH7 : protocadhérine-H7. cGMAP : Cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate).

### Actualités Métabolisme et Cancer, Audrey Bellesoeur

Un des sujets d'actualité largement au cœur de l'AACR cette année, concernait l'immunité, l'un des piliers de l'oncogénèse décrit par Hanahan et al (**Figure 6**) [52]. Un autre de ces piliers, en rapport cette fois avec le métabolisme, a aussi fait l'objet de différentes communications.



Thompson, a déjà décrit que les modifications du métabolisme cellulaire sont un élément clé de l'oncogenèse [53].

#### Assurer les apports en nutriments des cellules tumorales :

Parmi ces modifications, un des enjeux est d'assurer les apports nécessaires à la cellule à la fois pour la survie et la croissance tumorale, malgré un environnement parfois pauvre en nutriments. Thompson a présenté (AACR 2016 abstract PL02-01) 2 mécanismes majeurs permettant aux cellules tumorales d'assurer cet apport en nutriments et leur conférant ainsi un avantage par rapport aux cellules normales. Ces mécanismes sont en relation avec certaines voies de signalisation et certaines cibles oncogéniques que nous connaissons déjà.

Ainsi, le premier mécanisme permet l'augmentation de la capture du glucose et des acides aminés grâce à des transporteurs sélectifs, et implique de façon centrale la voie PI3K-AKT-mTOR. L'activation de cette voie permet de réguler l'apport en acides aminés pour la synthèse protéique d'une part, et l'apport en glucose pour le métabolisme énergétique d'autre part. On observe par exemple une reprogrammation du métabolisme du glucose, avec une augmentation de la captation du glucose au niveau de la membrane cellulaire, ce dernier étant ensuite dirigé vers des voies métaboliques telles que le cycle de Krebs ou la glycolyse pour produire de l'énergie, nécessaire notamment à la croissance tumorale.

Le deuxième mécanisme implique une autre cible oncogénique: Ras, qui active le facteur de transcription MYC, contrôlant notamment la transcription du transporteur membranaire de la glutamine. La glutamine est un acide aminé, présent dans le plasma, qui constitue une source d'énergie importante pour les cellules en division, en particulier quand les voies métaboliques liées au glucose sont peu fonctionnelles.

Quand la tumeur grossit, son environnement peut devenir pauvre en nutriments, surtout pour les cellules au centre de la tumeur. Thompson et al ont observé que, dans un milieu pauvre en acides aminés essentiels, l'activation d'AKT confère un avantage aux cellules, qui restent

capables de proliférer, en exploitant les voies du glucose. Inversement, en présence d'une mutation activatrice de Ras, le manque d'acides aminés empêche la prolifération cellulaire. Ces 2 voies métaboliques n'ont donc pas le même effet sur la cellule tumorale exposée à un microenvironnement restrictif. Pour explorer ces différences, des expériences ont été conduites en exposant les cellules à un milieu pauvre en acides aminés essentiels mais supplémenté en albumine. La supplémentation en albumine permet de restaurer la prolifération des cellules Ras-activées, mais ne modifie pas les capacités de prolifération en cas d'activation d'AKT. En fait l'activation de Ras favorise les mécanismes de pinocytose et donc l'internalisation de composants extracellulaires tels que l'albumine, qui est ensuite dégradée dans les lysosomes pour générer des acides aminés, tels que la glutamine qui pourra alors être exploitée par la cellule comme source d'énergie.

En présence d'un inhibiteur de mTOR, le même phénomène est observé. Ceci s'explique par le fait que mTOR régule le taux de fusion des vésicules de pinocytose aux lysosomes. Ainsi, l'inhibition de mTOR favorise l'internalisation des protéines extracellulaires par pinocytose, augmente le taux de fusion des vésicules de pinocytose aux lysosomes et la protéolyse lysosomale. Ces observations ont été confirmées sur un modèle murin de tumeur du pancréas : Thompson et al ont montré que l'inhibition de mTOR (par de la rapamycine) pouvait rétablir la croissance de cellules tumorales dans un milieu pauvre en nutriments.

Cela conduit donc à envisager 2 rôles potentiels de la sérine-thréonine kinase mTOR: un rôle oncogénique connu, favorisant la croissance et la survie cellulaire dans des conditions standards de microenvironnement, mais aussi un rôle suppresseur de tumeur quand la cellule est dans un environnement restrictif, pauvre en nutriments essentiels.

Au total, les tumeurs sont capables d'exploiter des voies d'apport en nutriments différentes, et de passer d'une voie à l'autre en fonction des conditions extracellulaires. Cela participe à l'hétérogénéité tumorale et influence la réponse éventuelle aux traitements. Ces

mécanismes métaboliques nécessitent donc d'être mieux compris et pris en compte pour optimiser les prises en charges thérapeutiques.

#### Régulation du métabolisme lors de la tumorigenèse, les protéines du réseau MYC:

Carroll et al (AACR 2016 abstract PL02-02) ont présenté des données sur le rôle des protéines de la famille MYC. MYC est une protéine impliquée dans des phénomènes tels que la croissance, la prolifération et la différenciation. Lorsqu'elle est dérégulée, elle favorise la prolifération, la perte de différenciation, la reprogrammation du métabolisme et la tumorigenèse. De telles anomalies de MYC sont retrouvées dans de nombreux cancers : 70% des cancers coliques, 35% des cancers de l'ovaire, 30 % des neuroblastomes... MYC est un facteur de transcription qui se lie à la protéine MAX pour former un hétérodimère capable de se fixer sur l'ADN et de réguler la transcription de nombreux gènes impliqués dans ces phénomènes (croissance, prolifération, différenciation, métabolisme) [54]. En fait, MYC et MAX, qui appartiennent à la même superfamille MAX-MLX de facteurs de transcription, font probablement partie d'un vaste réseau beaucoup plus complexe [54-56]. Parmi ce réseau, on peut citer notamment : MYC qui se lie à MAX favorisant la prolifération, MAX qui se lie aussi à MXD inhibant cette fois des gènes impliqués dans la différenciation, et enfin d'autres protéines de la même famille, MLX et MONDO qui interviennent dans la réponse au stress métabolique. En outre, il existe des interconnexions entre ces différents facteurs. Par exemple, 30 % des neuroblastomes ont une amplification de MYC, et sont alors de plus mauvais pronostic en raison d'une progression plus rapide. L'amplification de MYC favorise la prolifération des cellules de neuroblastome, mais cet effet se perd en l'absence de Mondo-A [55]. Cette influence de MYC sur la progression tumorale n'est donc pas seulement l'effet de MYC lui-même, mais de MYC et de son réseau de protéines, et le complexe Mondo-A/MLX semble indispensable.

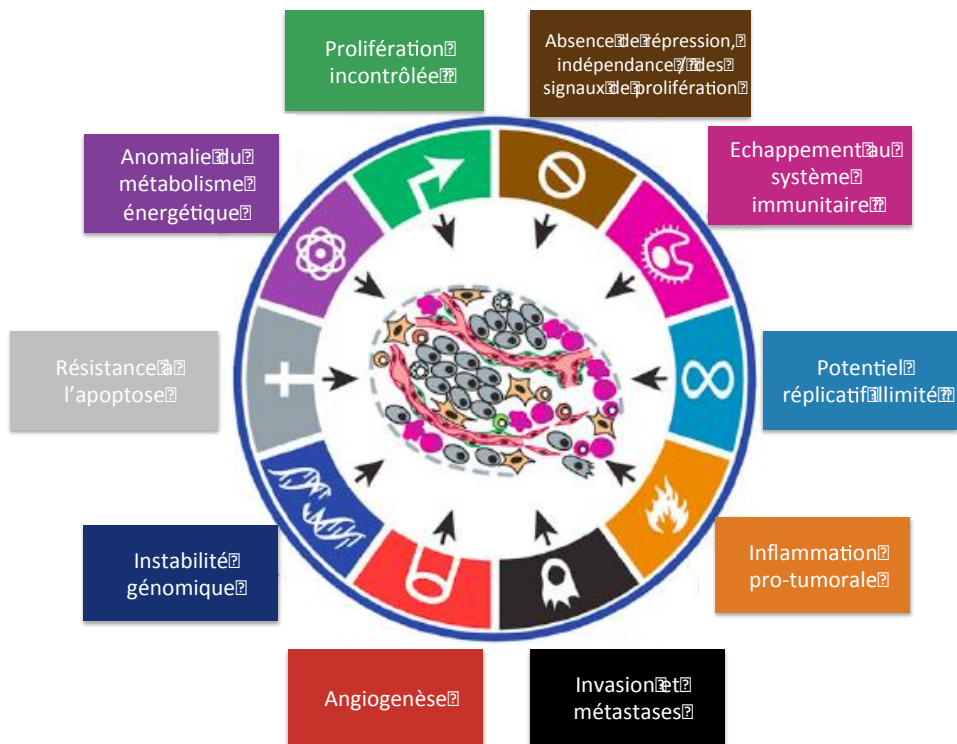
Ces protéines MONDO sont aussi des facteurs de transcription, avec une sensibilité particulière au glucose : c'est-à-dire que leur effet de régulation de la transcription est influencé par le taux de glucose extracellulaire [57]. Mondo-A est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de différentes voies métaboliques activées par MYC, notamment concernant la synthèse des acides gras. En effet, la dérégulation de MYC est à l'origine d'une reprogrammation métabolique avec augmentation de la lipogenèse, qui participe à la promotion de la croissance tumorale. Mais en l'absence de Mondo-A, cet effet conduit à une accumulation de métabolites, un excès de stress cellulaire et à l'apoptose.

La caractéristique de MYC et de son réseau de protéines MAX-MLX, est leur capacité à être sensibles à la fois aux signaux mitogéniques et à la disponibilité en nutriments. En effet, les protéines du réseau MYC sont impliquées dans les capacités d'adaptation métaboliques de la cellule tumorale : cibler certaines de ces protéines ou même plusieurs éléments de ces voies métaboliques simultanément, pourrait priver la cellule tumorale de ses apports, et soulève donc des pistes thérapeutiques pour l'avenir. Ainsi, Mondo-A et MLX, qui sont par exemple surexprimés dans les leucémies aiguës lymphoblastiques, les tumeurs germinales ou les neuroblastomes pourraient être des cibles intéressantes à inhiber.

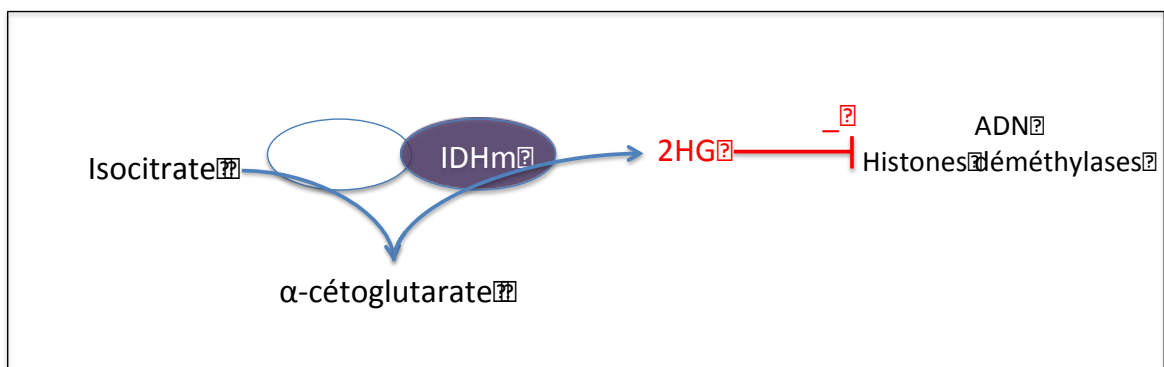
#### Cibler IDHm : Où en est-on ?

Après ces présentations précliniques qui ouvrent des perspectives thérapeutiques, des applications cliniques cette fois du lien métabolisme et cancer ont été évoquées. L'isocitrate déshydrogénase, est une enzyme dont il existe 3 isoformes (IDH1, IDH2 et IDH3), impliquée dans le métabolisme de l'isocitrate, qu'elle transforme en alpha-cétoglutarate, avec production parallèle de NADPH. Des mutations d'IDH1 surtout, et moins fréquemment d'IDH2 ont été décrites d'abord dans les tumeurs cérébrales [58], puis dans d'autres cancers récemment : chondrosarcome, leucémie aiguë, cholangiocarcinome... [58, 60]. Ces enzymes mutées (IDHm) ont une moindre capacité à métaboliser l'isocitrate et réalisent une réaction inverse

où elles consomment ensuite le NADPH et produisent un métabolite, le 2HG [61] (**Figure 7**). Ce 2HG, qui est retrouvé au niveau tissulaire et circulant, pourrait être un surrogate marqueur pour évaluer l'efficacité d'un traitement ciblant IDHm. Dans les leucémies aigues myéloïdes (LAM), des mutations d'IDH1 sont retrouvées dans 7,5% des cas, et d'IDH2 dans 15% des cas. Dans les modèles précliniques, ces mutations augmentent la prolifération cellulaire et bloquent la différenciation, du fait de modifications épigénétiques provoquées par le 2HG. Un inhibiteur sélectif d'IDH2 mutée (mutation R140Q) a été développé, qui reverse l'hyperméthylation des histones observée avec IDH2m, rétablit la différenciation des cellules myéloïdes et diminue le nombre de blastes. La réponse est associée à une diminution de la concentration de 2HG. Katherine Yen a présenté les résultats cliniques des inhibiteurs d'IDH actuellement évalués chez l'homme, dans les hémopathies malignes avec IDHm (LAM ou myélodysplasies) : l'AG221, pour IDH2m et l'AG-120 pour IDH1m. Leurs effets indésirables les plus fréquents sont la fatigue, les nausées et les diarrhées (20 à 30% des patients). Avec l'AG-221, le taux de réponse objective était de 38%, et pour l'AG-120 de 35%, avec respectivement 18% et 15% de réponses complètes, et par ailleurs, 45% de maladie stable. La durée médiane de réponse était de 7 mois, et pouvait atteindre plus de 12 mois chez certains patients. Le profil de réponse est totalement différent de celui observé avec la chimiothérapie : avec un rétablissement de la maturation des cellules myéloïdes et une amélioration des paramètres hématologiques. Ces molécules sont actuellement évaluées dans différents essais en monothérapie et dans le cadre de combinaisons, et illustrent le succès du ciblage des anomalies métaboliques en oncologie.



**Figure 6.** Mécanismes fondamentaux de la cancérogenèse : d'après Hanahan et al [52].



**Figure 7.** Mécanismes d'action d'IDH et IDHm.

**Remerciements :**

Remerciements « Je tiens pour cette troisième année à exprimer mes sincères remerciements pour leur soutien aux Laboratoires Astra-Zeneca, Pfizer, Pierre-Fabre Oncologie et Roche ainsi qu'aux Laboratoires Bristol-Myers Squibb et PharmaMar qui nous ont rejoint cette année. Il nous aurait été impossible sans chacun de nos partenaires de concrétiser cette nouvelle action. Grâce à ce soutien, de jeunes internes et chefs de clinique ont découvert le congrès de l'AACR. La diffusion du savoir est ici assurée par les équipes de la revue Oncologie, pour celles et ceux qui n'ont pu se rendre, pour quelque raison que ce soit, à ce congrès. Diffuser notre savoir est notre métier. La Collégiale des Oncologues de l'Assistance Publique – Hôpitaux Paris, que j'ai l'honneur de présider, apporte ici son soutien à nos internes. Vivement 2017 !

**Liens d'intérêts:**

Soutien financier de la Revue Oncologie accordé à Daniele G. Soares; d'Astra-Zeneca à Cécile Vicier et Eléonore de Guillebon; de Pfizer à Clément Dumont; de Pierre-Fabre Oncologie à Anthony Turpin; de PharmaMar à Audrey Bellesoeur; de Bristol-Myers Squibb à Anne Kieffer et de Roche à Jean-Pierre Lotz pour leur participation au congrès AACR 2016.

**Références :**

- [1] Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S et al. (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*;366(10):883-92. doi: 10.1056/NEJMoa1113205.
- [2] De Mattos-Arruda L, Weigelt B, Cortes J, Won HH. (2014) Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle. *Ann Oncol*;25(9):1729-35. doi: 10.1093/annonc/mdu239.
- [3] Landau DA, Carter SL, (2013) Stojanov P. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*;152(4):714-26. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.019.
- [4] Yap TA, Gerlinger M, Futreal PA, Pusztai L, Swanton C. (2012) Intratumor heterogeneity: seeing the wood for the trees. *Sci Transl Med*: 4(127):127ps10. doi: 10.1126/scitranslmed.3003854.
- [5] Nowell PC. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*;194(4260):23-8.
- [6] Xie M, Lu C, Wang J et al. (2014) Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med*;20(12):1472-8. doi: 10.1038/nm.3733.
- [7] Griffith M, Miller CA, Griffith OL et al. (2015) Optimizing cancer genome sequencing and analysis. *Cell Syst*;1(3):210-223.
- [8] Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ et al. (2014) Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*;344(6190):1396-401. doi: 10.1126/science.1254257.



- [9] Tirosh I, Izar B, Prakadan SM et al. (2016) Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science*;352(6282):189-96. doi: 10.1126/science.aad0501.
- [10] Hata AN, Niederst MJ, Archibald HL et al. (2016) Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition. *Nat Med*;22(3):262-9. doi: 10.1038/nm.4040.
- [11] Oser MG, Niederst MJ, Sequist LV, Engelman JA. (2015) Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin. *Lancet Oncol*;16(4):e165-72. doi: 10.1016/S1470-2045(14)71180-5.
- [12] Nghiem PT, Bhatia S, Lipson EJ et al (2016) PD-1 Blockade with Pembrolizumab in Advanced Merkel-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*.
- [13] Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T et al (2016) Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*. 2016 May 7;387(10031):1909-1920. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00561-4.
- [14] Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M et al (2016) Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet*. 2016 Apr 30;387(10030):1837-1846. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00587-0.
- [15] Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A et al (2015) Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 348:124–128. doi: 10.1126/science.aaa1348.

- [16] Le DT, Uram JN, Wang H et al (2015) PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 372:2509–2520. doi: 10.1056/NEJMoa1500596.
- [17] McGranahan N, Furness AJS, Rosenthal R, et al (2016) Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* 351:1463–1469. doi: 10.1126/science.aaf1490.
- [18] Ebert PJR, Cheung J, Yang Y et al (2016) MAP Kinase Inhibition Promotes T Cell and Anti-tumor Activity in Combination with PD-L1 Checkpoint Blockade. *Immunity* 44:609–621. doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.024.
- [19] Frederick DT, Piris A, Cogdill AP et al (2013) BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 19:1225–1231.
- [20] Hegde PS, Karanikas V, Evers S (2016) The Where, the When, and the How of Immune Monitoring for Cancer Immunotherapies in the Era of Checkpoint Inhibition. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 22:1865–1874.
- [21] Hugo W, Zaretsky JM, Sun L et al (2016) Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell* 165:35–44. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.065.
- [22] Van Rooij N, van Buuren MM, Philips D et al (2013) Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *J Clin Oncol* 31:e439-442. doi: 10.1200/JCO.2012.47.7521.

- [23] Linnemann C, van Buuren MM, Bies L et al (2015) High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma. *Nat Med* 21:81–85. doi: 10.1038/nm.3773.
- [24] Levenson JD. Abstract IA34: Clinical proof of concept for the first-in-class BCL-2-selective inhibitor venetoclax (ABT-199/GDC-0199). *Cancer Res.* 2016 Feb 1;76(3 Supplement):IA34–IA34.
- [25] Deng J, Isik E, Fernandes SM, et al. (2015) Ibrutinib Therapy Increases BCL-2 Dependence and Enhances Sensitivity to Venetoclax in CLL. *Blood*;126(23):490–490.
- [26] Choueiri TK, Vaishampayan U, Rosenberg JE et al. (2013) Phase II and Biomarker Study of the Dual MET/VEGFR2 Inhibitor Foretinib in Patients With Papillary Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*;31(2):181–6. doi: 10.1200/JCO.2012.43.3383.
- [27] Patel MR, Bauer TM, Liu SV et al. (2015) STARTRK-1: Phase 1/2a study of entrectinib, an oral Pan-Trk, ROS1, and ALK inhibitor, in patients with advanced solid tumors with relevant molecular alterations. *ASCO Meet Abstr*;33(15\_suppl):2596.
- [28] Ardini E, Menichincheri M, Banfi P et al. (2016) Entrectinib, a Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor with Activity in Multiple Molecularly Defined Cancer Indications. *Mol Cancer Ther*; 15(4):628-39. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0758.
- [29] Hong DS, Brose MS, Doebele RC et al. (2015) Abstract PR13: Clinical safety and activity from a phase 1 study of LOXO-101, a selective TRKA/B/C inhibitor, in solid-tumor patients with NTRK gene fusions. *Mol Cancer Ther*;14(12 Supplement 2):PR13–PR13.

- [30] Hans Schreiber. (1989) In *Fundamental Immunology* 2nd Edition, Ed by William E. Paul, Raven Press, Ltd., N.Y., pp. 924-955.
- [31] Segal NH, Parsons DW, Peggs KS et al. (2008) Epitope landscape in breast and colorectal cancer. *Cancer Res.*;68(3):889–92. doi: 10.1158/0008-5472.
- [32] Marraffini LA. (2015) CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*;526(7571):55–61. doi: 10.1038/nature15386.
- [33] Wen W-S, Yuan Z-M, Ma S-J et al. (2016) CRISPR-Cas9 systems: versatile cancer modelling platforms and promising therapeutic strategies. *Int J Cancer.*;138(6):1328–36. doi: 10.1002/ijc.29626. doi: 10.1038/nature13902.
- [34] Maddalo D, Manchado E, Concepcion CP et al. (2014) In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature*;516(7531):423–7. doi: 10.1038/nature13902.
- [35] Lee DD, Seung HS. (1999) Learning the parts of objects by non-negative matrix factorization. *Nature*;401(6755):788–91.
- [36] Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC et al. (2013) Deciphering signatures of mutational processes operative in human cancer. *Cell Rep*;3(1):246–59. doi: 10.1016/j.celrep.2012.12.008.
- [37] Williams MJ, Werner B, Barnes CP et al. (2016) Identification of neutral tumor evolution across cancer types. *Nat Genet.*;48(3):238–44. doi: 10.1038/ng.3489.
- [38] White AC, Tran K, Khuu J et al. (2011) Defining the Origins of Ras/p53-Mediated Squamous Cell Carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 108: 7425-30. doi: 10.1073/pnas.1012670108

- [39] Oshimori N, Oristian D, Fuchs E. (2015) TGF- $\beta$  Promotes Heterogeneity and Drug Resistance in Squamous Cell Carcinoma. *Cell* 160: 963-76. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.043.
- [40] Adam RC, Hang Y, Rockowitz S et al. (2015) Pioneer Factors Govern Super-Enhancer Dynamics in Stem Cell Plasticity and Lineage Choice. *Nature* 521: 366-70. doi: 10.1038/nature14289
- [41] Alcantara Llaguno SR, Wang Z, Sund D et al. (2015) Adult Lineage-Restricted CNS Progenitors Specify Distinct Glioblastoma Subtypes. *Cancer Cell* 28: 429-40. doi: 10.1016/j.ccell.2015.09.007.
- [42] Kurtova AV, Xiao J, Mo Q et al. (2015) Blocking PGE2-Induced Tumour Repopulation Abrogates Bladder Cancer Chemoresistance. *Nature* 517: 209-13. doi: 10.1038/nature14034
- [43] Chan KS. (2016) Molecular Pathways: Targeting Cancer Stem Cells Awakened by Chemotherapy to Abrogate Tumor Repopulation. *Clin Cancer Res.* 22: 802-6. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0183
- [44] Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME et al. (2014) Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4. *Cell* 156: 317-31. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.010.
- [45] Sato K, Suda K, Shimizu S et al. (2016) Clinical, Pathological, and Molecular Features of Lung Adenocarcinomas with AXL Expression. *PloS One* 11: e0154186. doi: 10.1371/journal.pone.0154186.
- [46] Wculek SK, Malanchi I (2015) Neutrophils Support Lung Colonization of Metastasis-Initiating Breast Cancer Cells. *Nature* 528: 413-7. doi: 10.1038/nature16140
- [47] Lawson DA, Bhakta NR, Kessenbrock K et al. (2015) Single-Cell Analysis Reveals a Stem-Cell Program in Human Metastatic Breast Cancer Cells. *Nature* 526: 131-5. doi: 10.1038/nature15260.

- [48] Guinney J, Dienstmann R, Wang X et al. (2015) The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer . *Nat Med* 21: 1350-6. doi: 10.1038/nm.3967.
- [49] Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llergo A et al. (2015) Stromal Gene Expression Defines Poor-Prognosis Subtypes in Colorectal Cancer. *Nat Genet* 47: 320-9. doi: 10.1038/ng.3225
- [50] Malladi S, Macalinao DG, Jin X et al. (2016) Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT. *Cell* 165: 45-60. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.025.
- [51] Cai X, Chiu YH, Chen ZJ (2014) The cGAS-cGAMP-STING Pathway of Cytosolic DNA Sensing and Signaling. *Mol Cell* 54: 289-96. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.040
- [52] Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5):646- 74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [53] Pavlova NN, Thompson CB. (2016) The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*. 23(1):27- 47. doi: 10.1016/j.cmet.2015.12.006.
- [54] Conacci-Sorrell M, McFerrin L, Eisenman RN. (2014) An overview of MYC and its interactome. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 4(1):a014357. doi: 10.1101/cshperspect.a014357.
- [55] Carroll PA, Diolaiti D, McFerrin L, et al. (2015) Deregulated Myc requires MondoA/Mlx for metabolic reprogramming and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 27(2):271 - 85. doi: 10.1016/j.ccell.2014.11.024.
- [56] Dang CV. (2015) Web of the extended Myc network captures metabolism for tumorigenesis. *Cancer Cell*. 27(2):160- 2. doi: 10.1016/j.ccell.2015.01.004.
- [57] Stoltzman CA, Peterson CW, Breen KT et al. (2008) Glucose sensing by MondoA:Myx complexes: a role for hexokinases and direct regulation of thioredoxin-interacting protein expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(19):6912- 7.

- [58] Yan H, Parsons DW, Jin G et al. (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.* 360(8):765- 73. doi: 10.1056/NEJMoa0808710.
- [59] Borger DR, Tanabe KK, Fan KC et al. (2012) Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping. *The Oncologist.* 17(1):72- 9.
- [60]. Amary MF, Bacsi K, Maggiani F et al. (2011) IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *J Pathol.* 224(3):334- 43.
- [61] Dang L, White DW, Gross S et al. (2009) Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature.* 462(7274):739- 44. doi: 10.1038/nature08617.