

*Les Jeudis de Fleurus - 12 Décembre 2013*

# Pharmacogénétique et Impact thérapeutique ?



**Centre de Technologies  
Moléculaires Appliquées (CTMA)**

**Prof. Jean Luc GALA**

**Directeur CTMA**

**tél 31.65 /fax: 31.66**

**Jean-luc.Gala@uclouvain.be**

**<http://ctma.be/>**

Université catholique de Louvain

CBRN Challenges



***HESD 2013-2014***



Center for Applied Molecular Technologies /  
Defence Laboratories Department-Biothreats  
UCL-Brussels, Belgium

**Pr. Dr. JL Gala**  
Med Colonel,  
Director BE Mil-Acad  
Biotech Platform CTMA/DLD-  
Bio

# Plan

- **Introduction**

- Qu'est-ce qu'un médicament idéal ?
- Conséquences des « posologies standards »
- Ampleur du problème
- Facteurs associés à la réponse thérapeutique

- **La pharmacogénétique**

- **Les buts de la pharmacogénétique**

- **Quelques applications cliniques constitutionnelles**

(UGT1A, TPMPT, VKORC1, DPYD)

- **Anomalies acquises: la voie de l'EGFR (EGFR, Kras, Nras, Braf)**

# Qu'est-ce qu'un médicament idéal ?

**Définition** : Un médicament idéal est celui qui, afin de prévenir une maladie, la traite de façon efficace et qui n'a pas d'effets indésirables

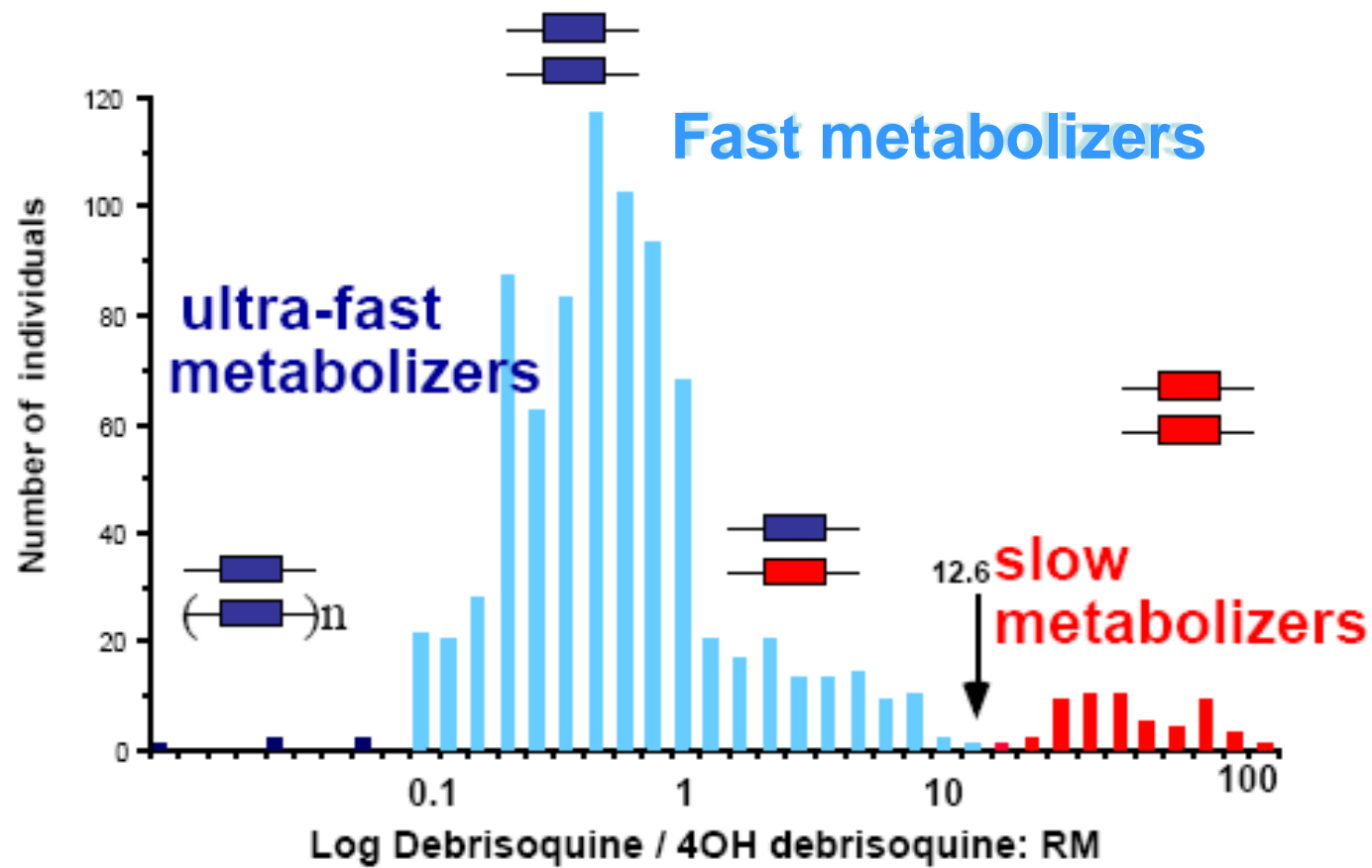
**Observation** : Un médicament à dose identique pour tous présente **rarement la même efficacité** et **les mêmes effets secondaires** pour l'ensemble des patients traités

# Conséquences d'un traitement basé sur des posologies identiques pour chaque patient

**Le problème:** importantes **différences inter-individuelles dans la réponse** (efficacité, réponse) aux médicaments

La diversité de effets des médicaments est donc problématique

- En médecine clinique
- Pour le développement des médicaments



Bertilsson and Dahl 1996

# L'ampleur du problème

## ✓ Efficacité

Un pourcentage élevé des patients résistants répond mal ou ne répond pas du tout au traitement

## ✓ Les effets secondaires

6,7 % - sévère réaction au médicament  
(0,32 % - fatal, 100 000 décès par année)

# Les facteurs associés à la réponse variable aux médicaments

## ✓ Facteurs environnementaux

Médicament(s) administré(s)

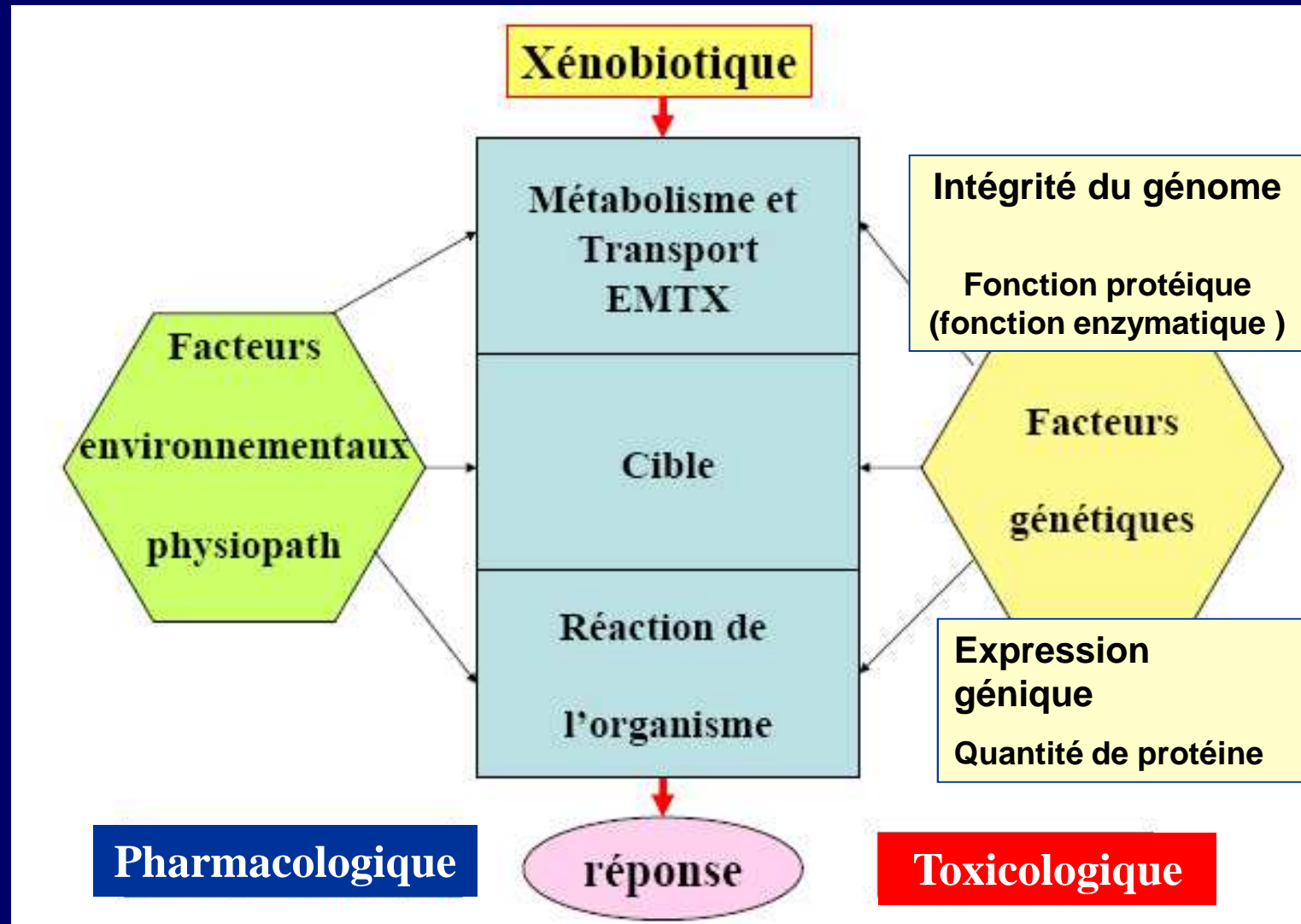
Maladie sous-jacente

Autres facteurs : nutrition, mode de vie, âge ,  
sexe, interactions médicamenteuses..)

## ✓ Facteurs génétiques



# Les facteurs associés à la réponse variable aux médicaments

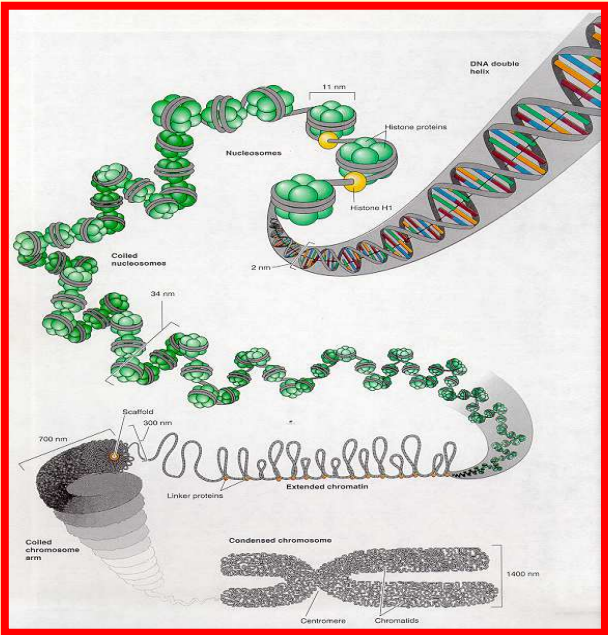
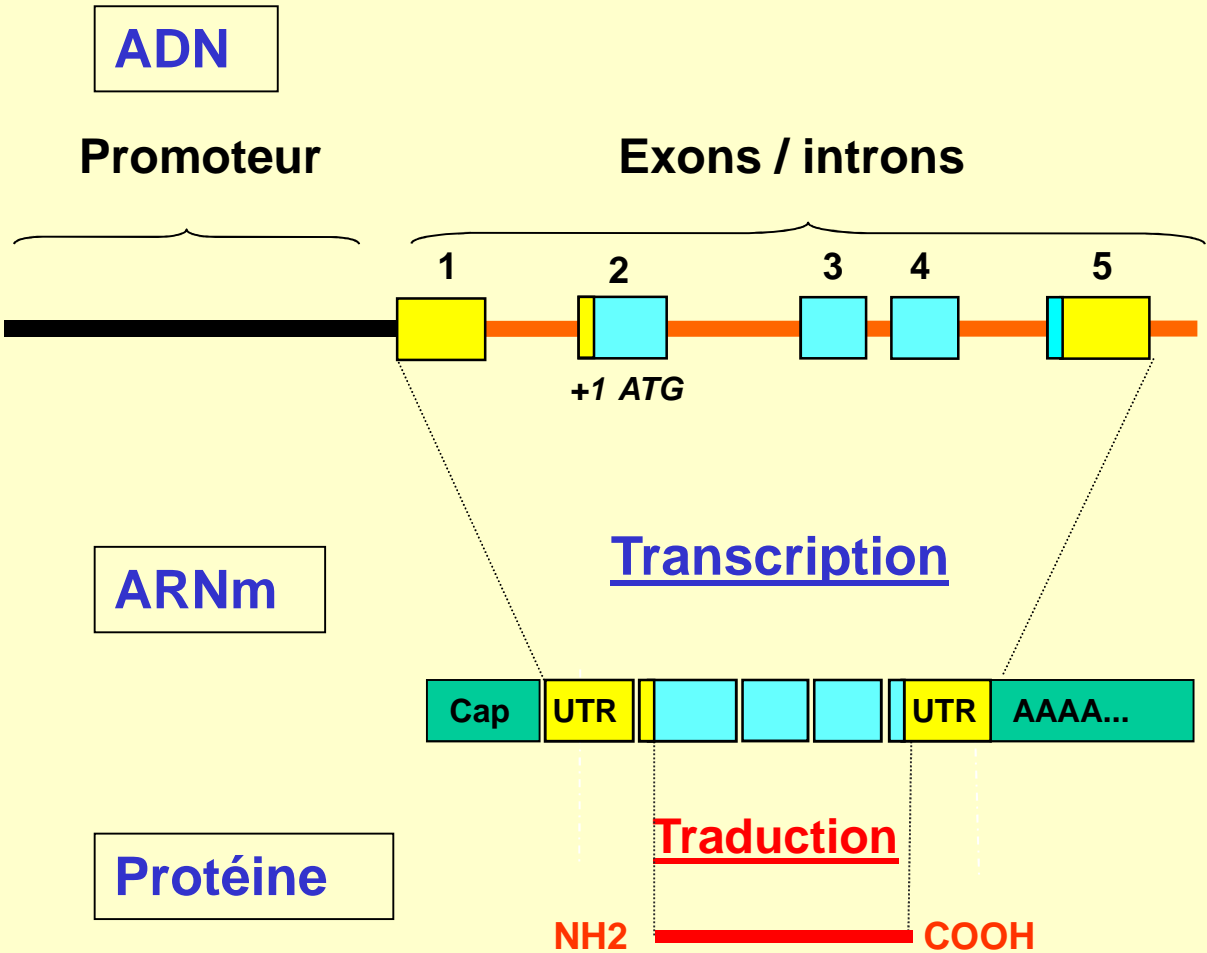


# La pharmacogénétique

Un lien entre la constitution génétique individuelle et la réponse thérapeutique

- Modification de gènes intervenant dans la cinétique du médicament (absorption, distribution, métabolisme, activation, inactivation, élimination, ...)
- Modifications de gènes codant pour une cible moléculaire (récepteur-cible, enzyme...)
- Modification de gènes responsables de la maladie (mutations oncogéniques...)

# Du chromosome à la protéine



- EXONS : séquences transcrites et traduites
- EXONS : séquences transcrites et non traduites
- INTRONS: séquences non transcrites en ARN

# Impact d'une mutation ADN sur la protéine correspondante

Protein Products

Gene A from Person 1

GCA	AGA	GAT	AAT	TGT	
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	...
1	2	3	4	5	

Gene A from Person 2

Codon change made  
*no difference in amino acid sequence*

GCG	AGA	GAT	AAT	TGT	
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	...
1	2	3	4	5	

Gene A from Person 3

Codon change resulted in a  
*different amino acid at position 2*

GCA	AAA	GAT	AAT	TGT	
Ala	Lys	Asp	Asn	Cys	...
1	2	3	4	5	



Or



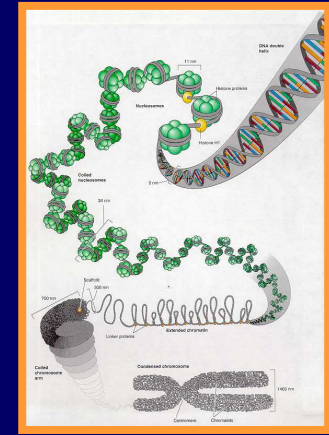
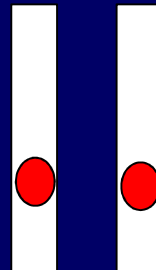
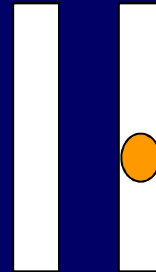
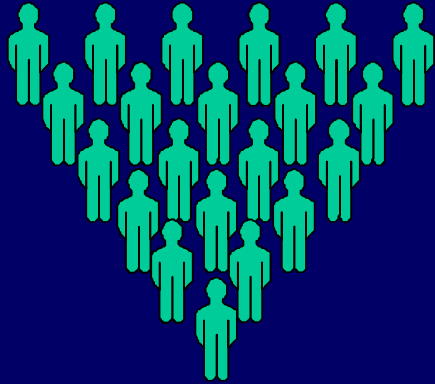
# Les buts de la pharmacogénétique ?

1. Identifier les **variations génétiquement déterminées** de la réponse aux médicaments et recherche des anomalies moléculaires de ces variations
2. Identifier **l'importance clinique** de ces différences
3. Développer des **méthodes diagnostiques** permettant de reconnaître les individus **sensibles** ou **résistants** à un médicament **avant** son administration

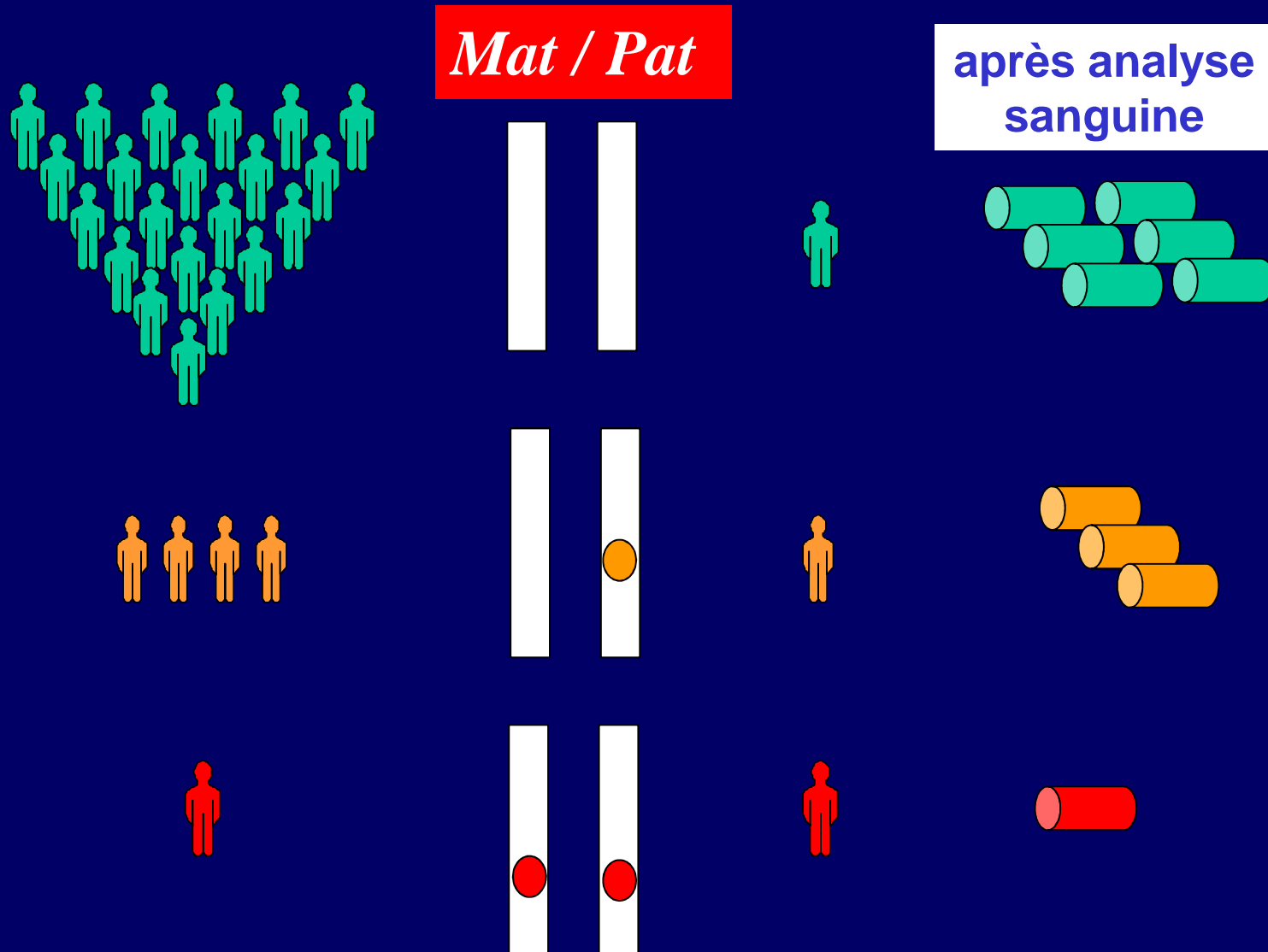
**Permettre un traitement individualisé !**

# Prédiction de la toxicité ?

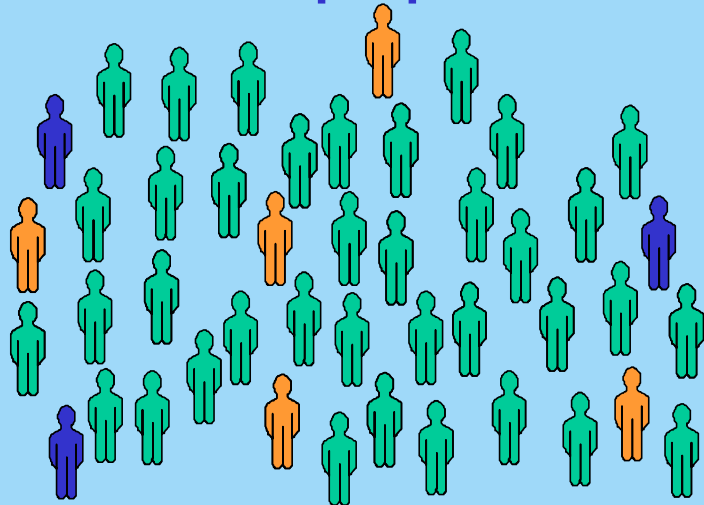
*Mat / Pat*



# Prédiction de la toxicité ?

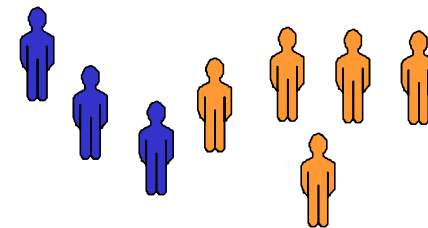


**Diagnostic identique pour  
chaque patient**

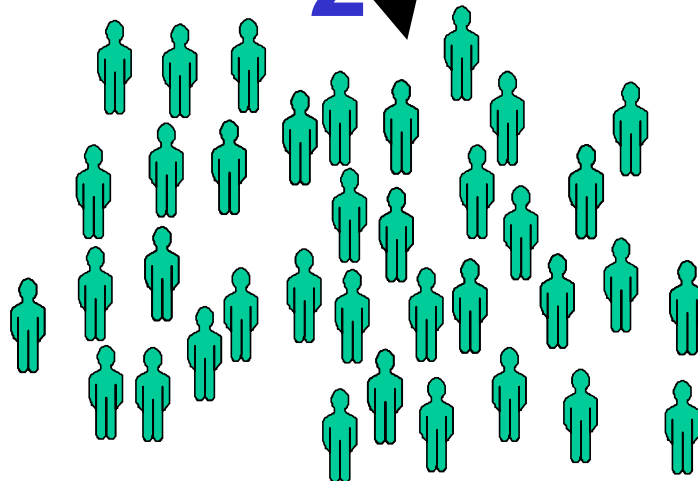


**1 Enlever**

**Les non-répondeurs  
Et les répondeurs toxiques**



**2**



**Traiter**

**Les répondeurs et les patients  
non prédisposés aux effets  
secondaires**



## Clinical Applications

### Anticancer drugs:

5FU, Irinotecan, Oxaliplatin

UGT1A1  
DPD  
TS  
GST

### Immunosuppressors :

azathioprine, ciclosporine,  
tacrolimus

TPMT  
CYP3A4/5  
MDR-1

### Anticoagulants :

warfarine,  
acenocoumarol

CYP2C9  
VKORC1

### Psychotropes

CYP2D6

Pharmacogenetics  
Molecular oncology  
Clinical chemistry  
HEGP

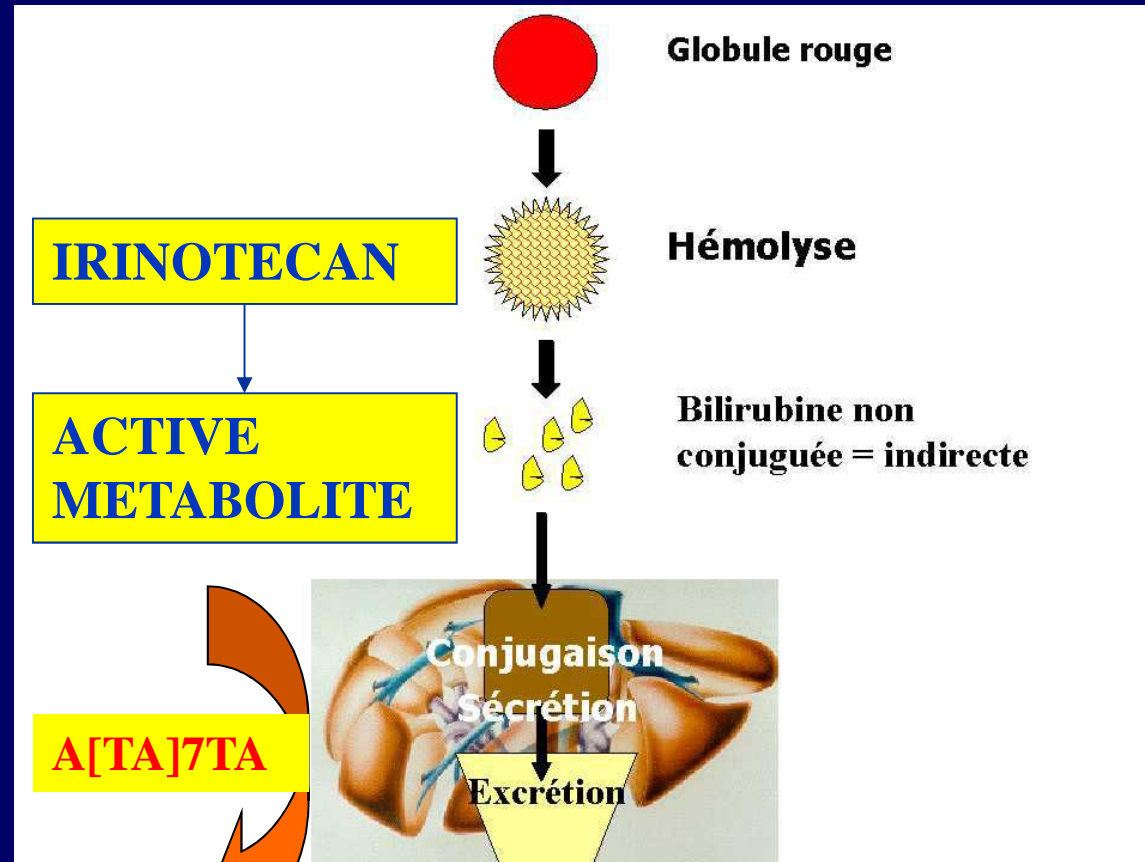
# Most Common Cancer PGx Biomarkers

Tumor Type	Biomarker	Drug (Brand)
Breast	ER	Fulvestrant (Faslodex), tamoxifen (Nolvadex)
	HER2	Lapatinib (Tykerb), trastuzumab (Herceptin)
Colorectal	DPD	Capecitabine (Xeloda), fluorouracil (5-FU)
	EGFR	Cetuximab (Erbix), panitumumab (Vectibix)
	K-RAS	Cetuximab (Erbix), panitumumab (Vectibix)
	UGT1A1	Irinotecan (Camptosar), nilotinib (Tasigna),
	DPD	Capecitabine (Xeloda), fluorouracil (5-FU)
GIST	c-Kit	Imatinib (Gleevec)
Leukemia and lymphoma	G6PD	Rasburicase (Elitek)
	Philadelphia chromosome	Imatinib (Gleevec), nilotinib (Tasigna)
	PML-RAR- $\alpha$ translocation	Arsenic trioxide (Trisenox)
	TPMT	6-mercaptopurine (6-MP)
	UGT1A1	Nilotinib (Tasigna)
Lung	EGFR	Erlotinib (Tarceva), gefitinib (Iressa)
	K-RAS	Panitumumab (Vectibix)
Pancreatic	EGFR	Erlotinib (Tarceva)
Head and neck	EGFR	Cetuximab (Erbix)

*c-Kit: stem cell growth factor receptor; DPD: dihydropyrimidine dehydrogenase; EGFR: epidermal growth factor receptor; ER: estrogen receptor; GIST: gastrointestinal stromal tumor; G6PD: glucose-6-phosphate dehydrogenase; HER2: human epidermal growth factor receptor-2; K-RAS: v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; PGx: pharmacogenomics; PML-RAR- $\alpha$ : promyelocytic leukemia protein-retinoic acid receptor-alpha; TPMT: thiopurine S-methyltransferase; UGT1A1: UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1.*

*Source: Reference 9, FDA drug package inserts, Lexi-Comp drug monographs.*

# Impact de UGT1A1

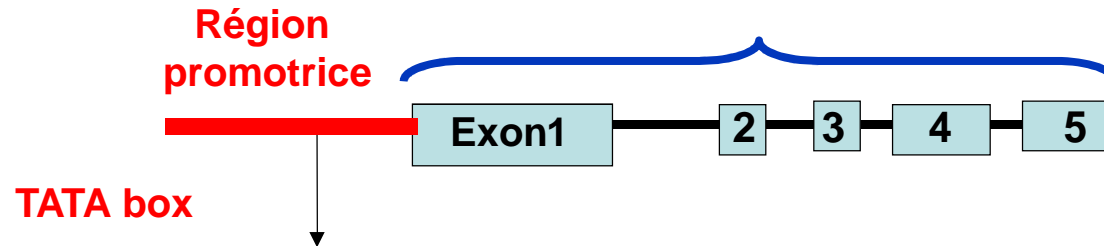


**Diminution de la glucuronidation**

**Toxicité de l'irinotecan**

# UGT1A1

Gène localisé en 2q37



5 exons

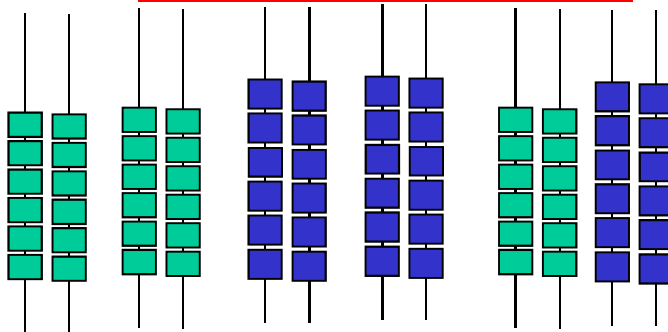
UGT1A1 \*28  
A[TA]<sub>7</sub> TAA

Mutation exonique

UGT1A1\*6, UGT1A1\*63....

**Maladie de Gilbert**

**Crigler-Najjar Type I & type II**



# Impact de UGT1A1

## Maladie de Gilbert

Bilur bine indirecte = ~ 1 to 6 mg / dl

## Maladie de Crigler-Najjar

Jaunisse familiale congénitale non-hémolytique

Type 1: Bilirubin indirecte = ~ 20 to 45 mg/ dl

Déficienc e Totale

Décès rapide

Type 2: Bilirubine indirecte = ~ 6 to 20 mg/ dl

Deficienc e partielle

Survie (encéphalopathie tardive / hyperbilirubinémie)

# **Déficiencia en Thiopurine S-Methyltransferase (TPMT) & Toxicité des purines**

- Azathioprine (Imuran), immunosuppressor**
- Anticancer drugs (6-thioguanine; 6-mercaptopurine)**

# Thiopurines/TP : 6MP - Azathioprine



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1988



Gertrude B. Elion

Development of  
**azathioprine and  
6MP** in late 50s and  
early 60s



George H. Hitchings

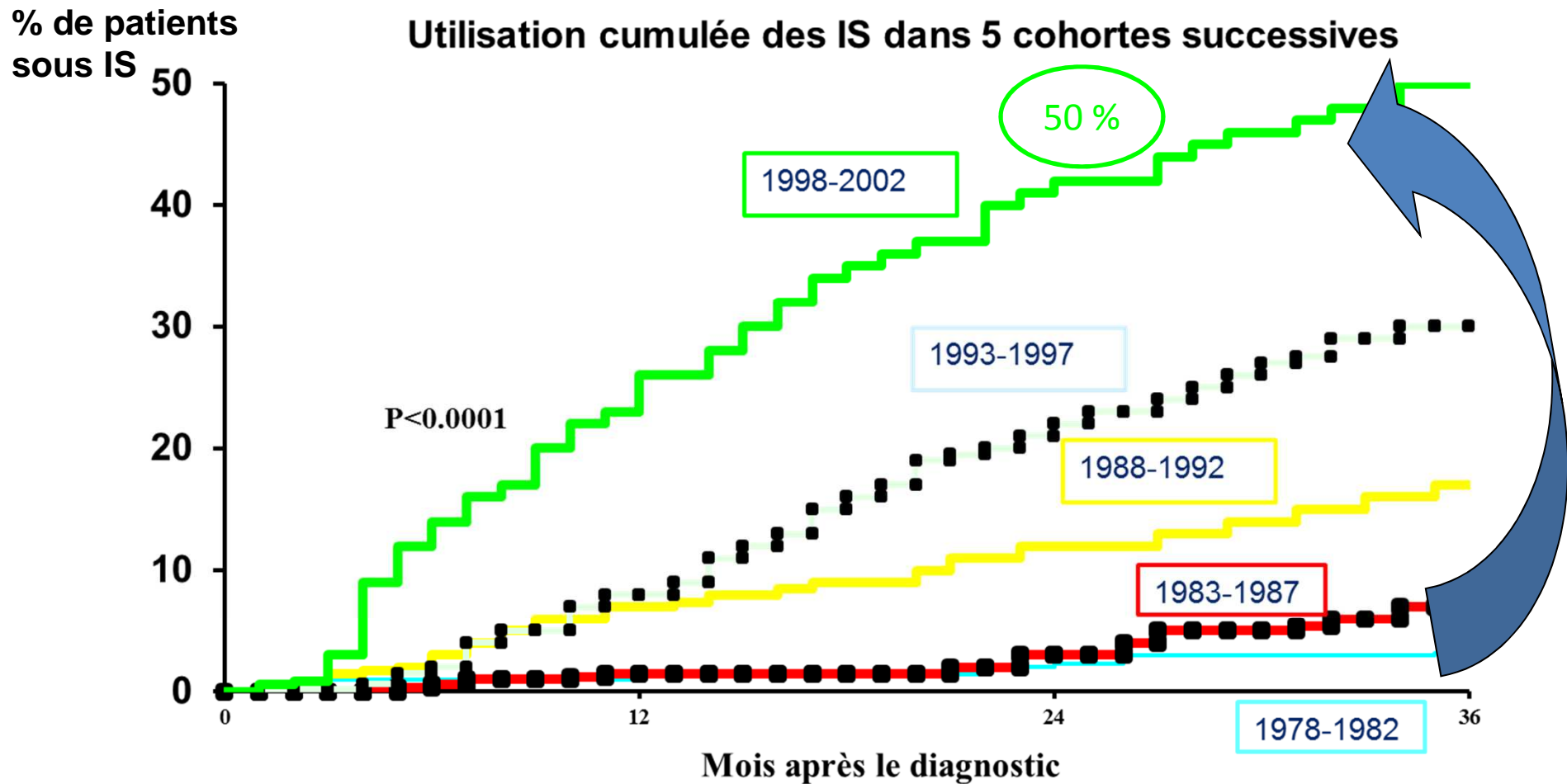
Azathioprine and its metabolite 6-mercaptopurine are immunosuppressive agents with potent anti-inflammatory functions

Leucémie de  
l'enfant

Transplantation  
d'organes

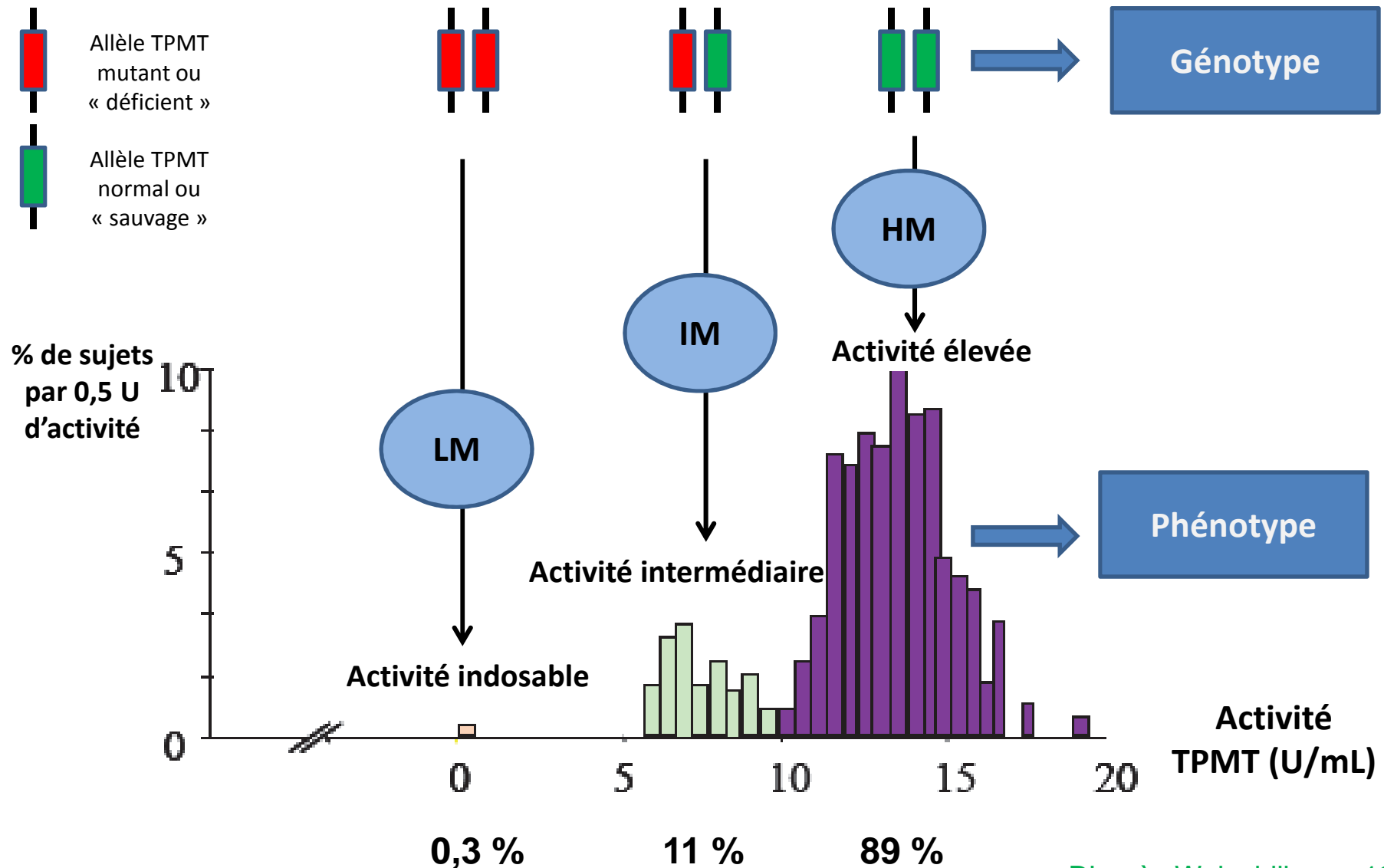
Maladies autoimmunes et  
inflammatoires chroniques

# Augmentation de l'utilisation des immunosuppresseurs dans la MC





# Distribution de l'activité TPMT



D'après Weinshilboum, 1980

# Impact de la TPMT

- **Activité basse (LM) ou intermédiaire(IM)**  
**homozygote déficient      hétérozygote déficient**

**TPMT Def**

- **Activité élevée (HM), « normale »**  
**homozygote normal ou « wild-type »: TPMT WT**

# Effets secondaires des TP

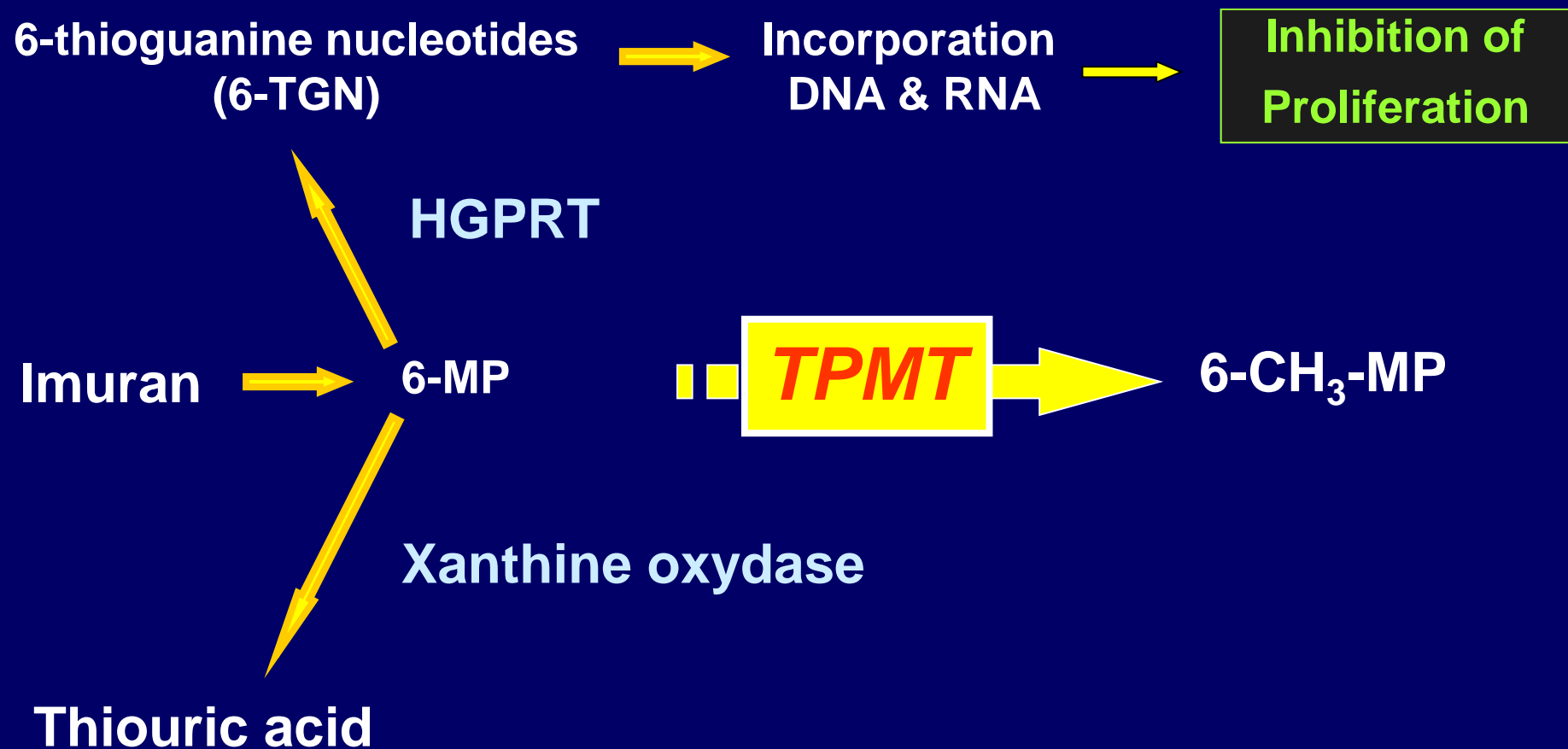
## Immuno-allergiques ou doses-indépendants

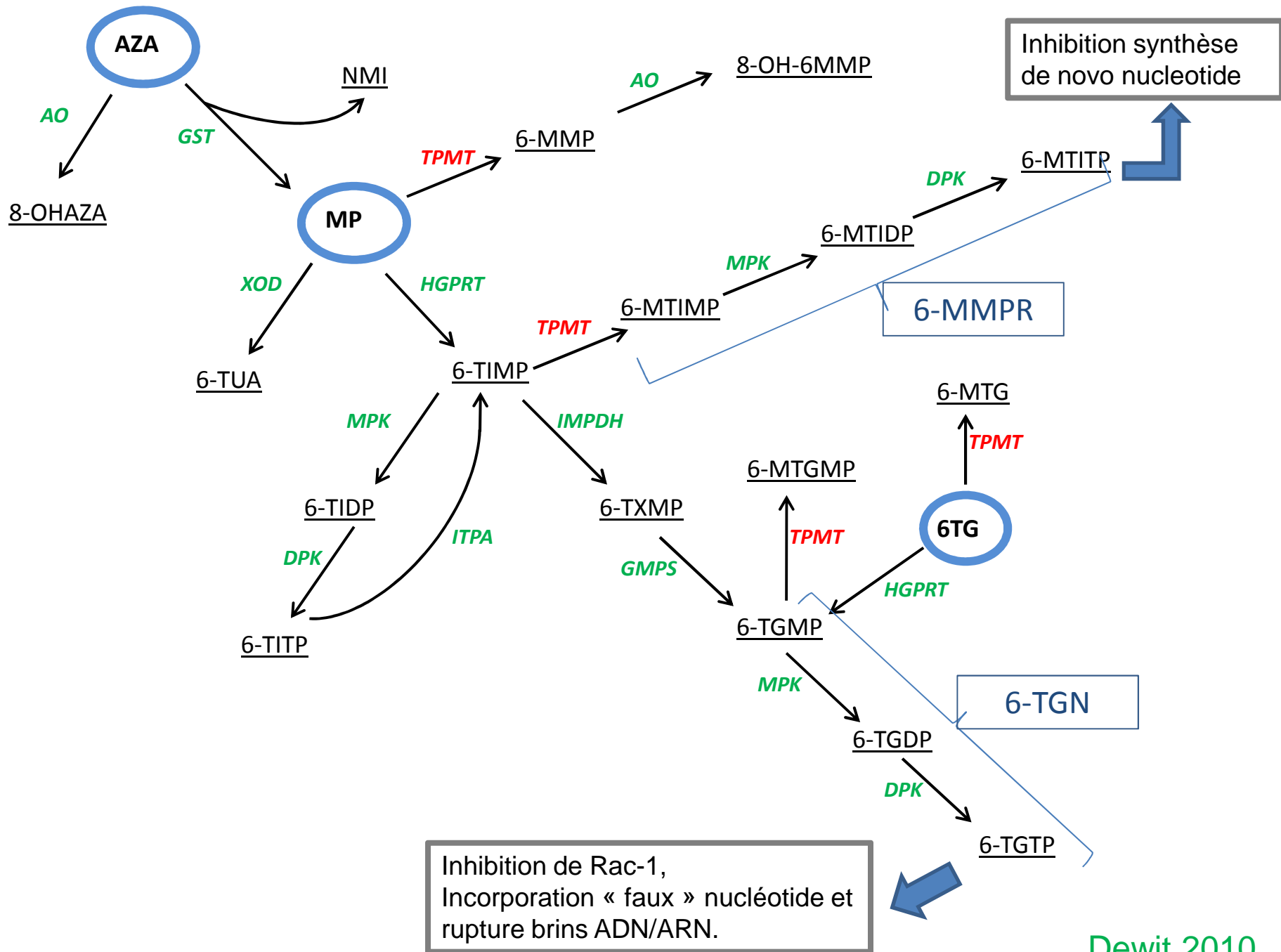
- Pancréatite
- Syndrome grippal
- Myalgies, arthralgies
- Rash cutané
- Hépatotoxicité

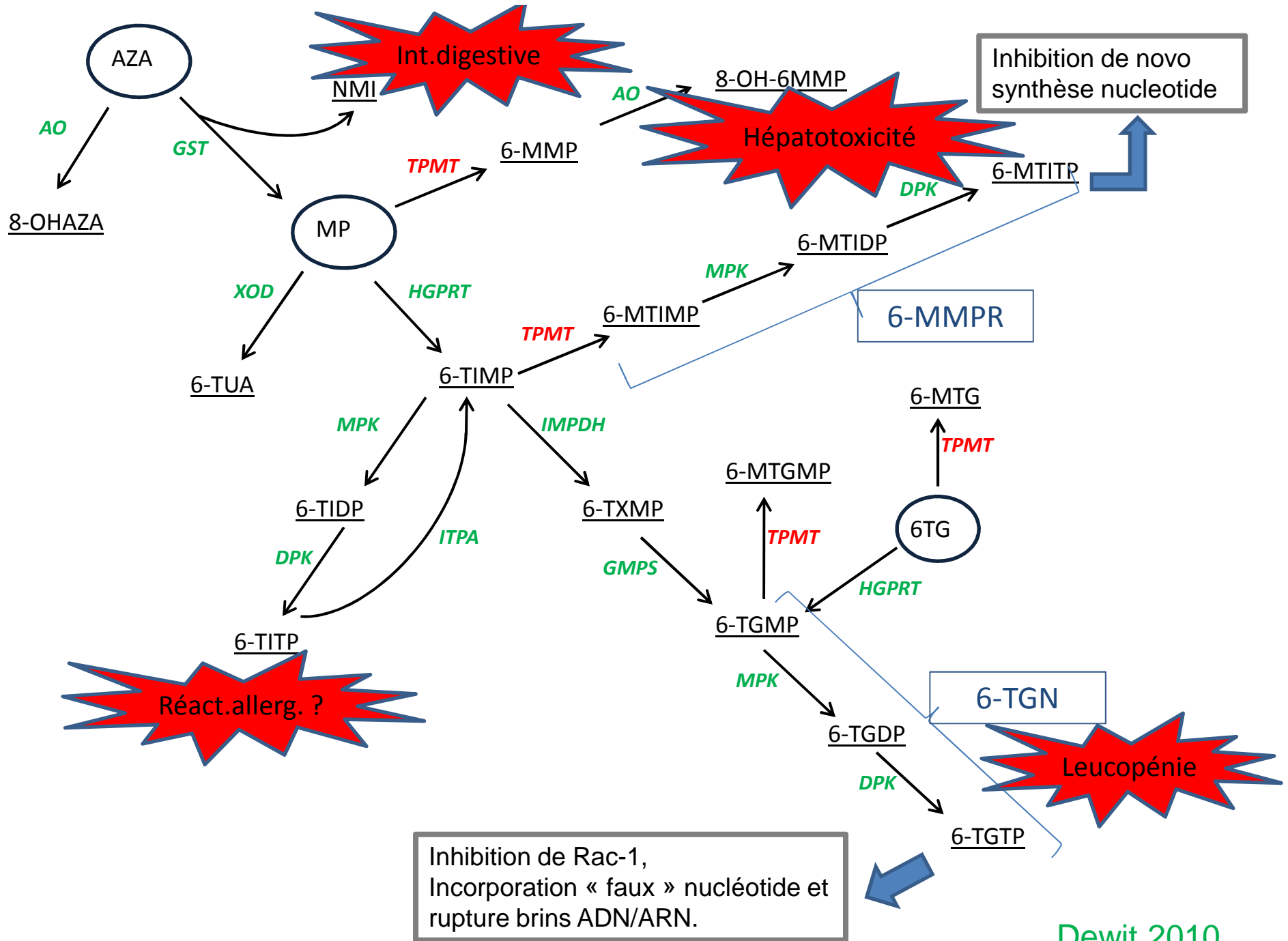
## Doses-dépendants

- Intolérance digestive
- Toxicité médullaire
- Hépatotoxicité
- Infections
- Néoplasies
  - lymphomes
  - cutanés non mélaniques

# Métabolisme de l'azathioprine







# De nombreuses enzymes sont impliquées dans la formation des métabolites

- **Thiopurine-méthyltransférase : TPMT**
- Xanthine-oxydase : XO
- Aldéhyde-oxydase: AO
- Inosine triphosphate pyrophosphatase: ITPA
- Glutathion S-Transférase: GST
- Méthylène tétrahydrofolate réductase: MTHFR
- .....

# Toxicité des thiopurines et Base génétique

**Polymorphismes alléliques de la TPMT**

**Inhibition de la TPMT de fonction par interaction médicamenteuse**

**AAS et substances assimilées**

(sulfasalazine, Ac. 5-aminosalicylique, olsalazin )

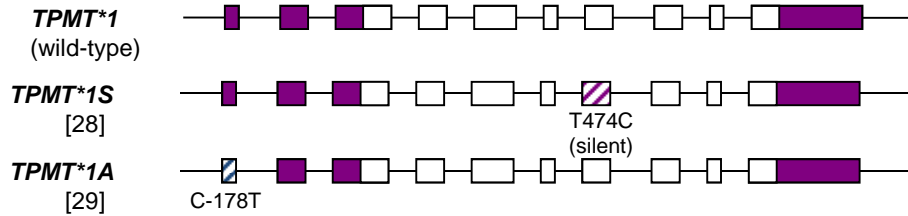
**Furosémide**

**Leucopénie**                      10- 11 %

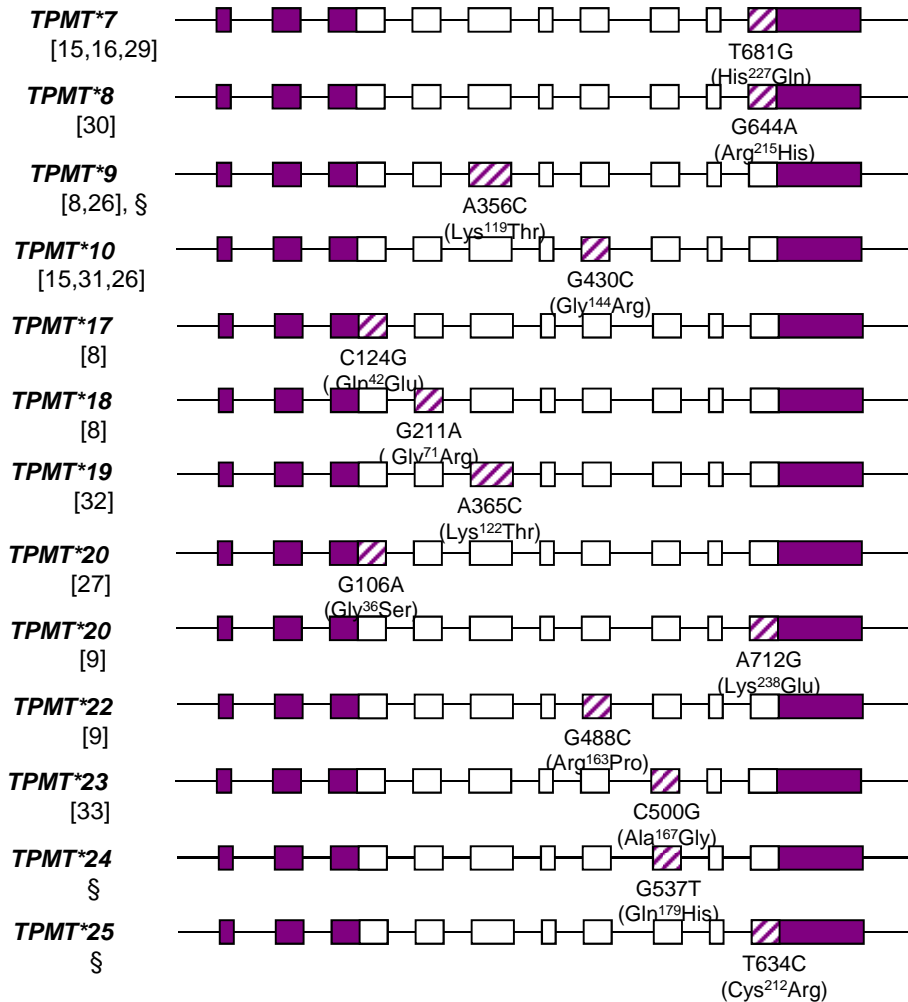
**Myélotoxicité**                    1 / 300



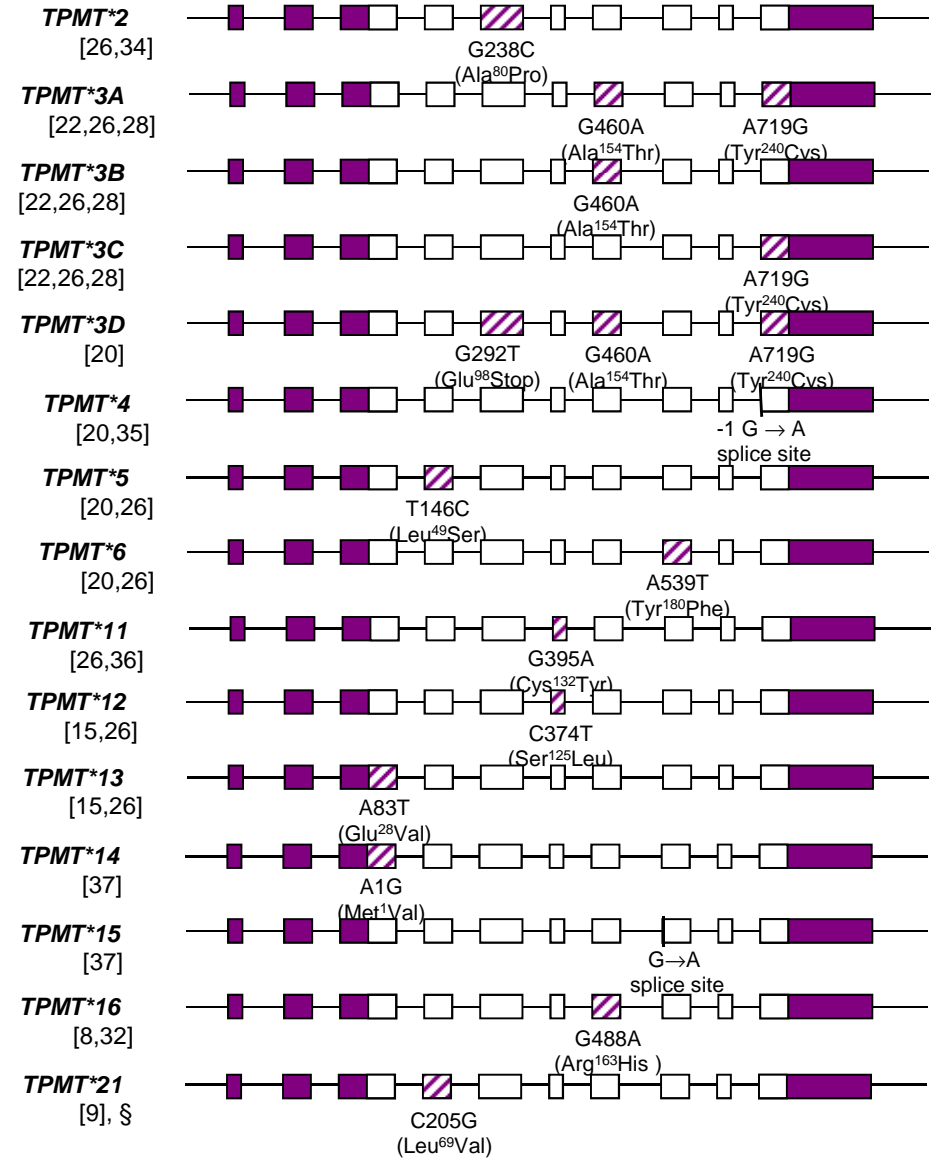
Alleles *TPMT* associés avec une activité normale



Alleles *TPMT* suspects de diminuer l'activité



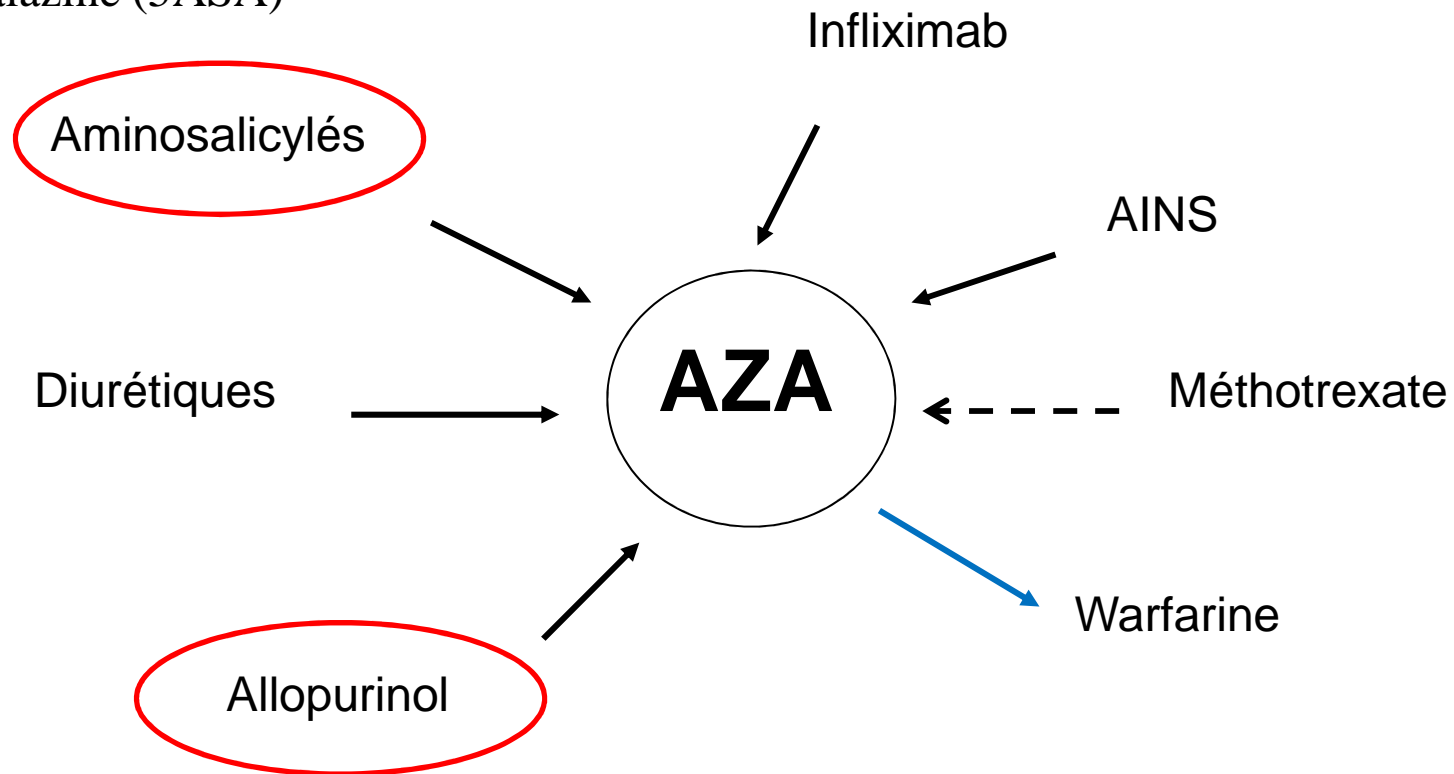
Alleles *TPMT* associés avec une activité diminuée



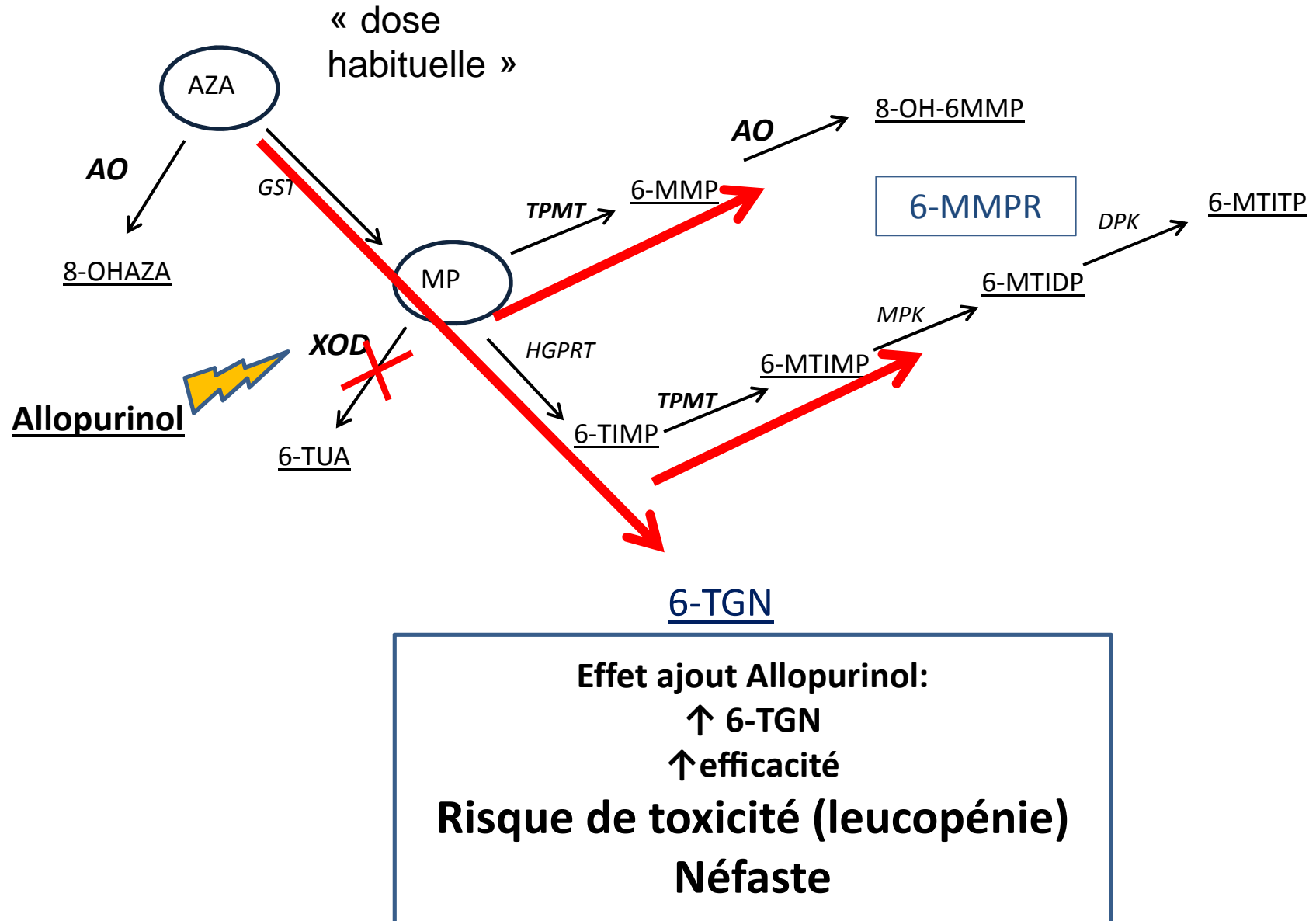
.....30 mutations *TPMT* décrites

# Interactions médicamenteuses

Sulphasalazine (SZP)  
Mésalazine (5ASA)



# Interaction Allopurinol/TP:



# Etude génotypage extensif TPMT et MS médications concomitantes

- Aminosalicylés	38/61
- Infliximab	4/61
- <b>Allopurinol</b>	<b>3/61</b>
- Diuretiques (bumetanide, spironolactone)	3/61
- AINS	2/61
- Aucun	11/61

**L'interaction est évidente pour l'allopurinol.**

**Apparition d'une MS respectivement 4, 5 et 10 sem. après ajout d'allopurinol.**

**Ces cas soulignent la toxicité bien connue de cette association et la nécessité de la rappeler aux professionnels de santé et aux patients.**

CTMA / TPMT	~4000 samples RNA Genotyping	9.34 %	1998-2013
TPMPT*2	29	<b>0.73</b>	<i>5/24 hetero with another heterovariant (three *3A, one *3B or *21)</i>
TPMT*3A	266	<b>6.66</b>	<i>Among which 10 homo and 7/266 hetero with another variant</i>
TPMT*3B	2	0.05	
TPMT*3C	46	<b>1.15</b>	
TPMT*8	11	0.28	<i>4/11 with another hetero variant (3A, 3C, twice each)</i>
TPMT*9	5	0.13	
TPMT*12	4	0.10	
TPMT*16	3	0.08	<i>1/3 with another hetero variant</i>
TPMT*19	2	0.05	
TPMT*20- 21- 25	1-1-1	0.03	
TPMT*33	3	0.08	

# Double hétérozygote TPMT\*3A et \*12

TPMT\*12 = C374 T (Ser 125 Leu)

Edwige Bertrand



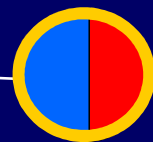
Hétéro TPMT\*3A

Hétéro TPMT\*12

Yves Crohn



Anne



Radiochemical assay	Edwige Bertrand	Yves	Anne
Nmoles / h / grHb	10	25	6



Perte totale de la fonction TPMT

# Variants TPMT : facteur ethnique

	3*A	*3C
Caucasians	6% <i>(CTMA: 6.6%)</i>	0,6 – 3% <i>(CTMA: 1.2%)</i>
Asians	Usually not found	0,3 – 1,6%
Africans	Usually not found	6%

# L'importance de génotyper le TPMT

Hétérozygotie (activité TPMT réduite de 30 %)

Patients bénéficie d'une réduction posologique  
(imuran)

Homozygotie: ne pas donner plus de 10% de  
la posologie standard et monitorier  
soigneusement le patient



# Vitamin K antagonists (VKA)

Intrinsic

XII

XI

24 hr

IX

VIII

Extrinsic

Tissue Factor

6 hr

VII

X

36 hr

V

II

60 hr

I

Fibrin Clot

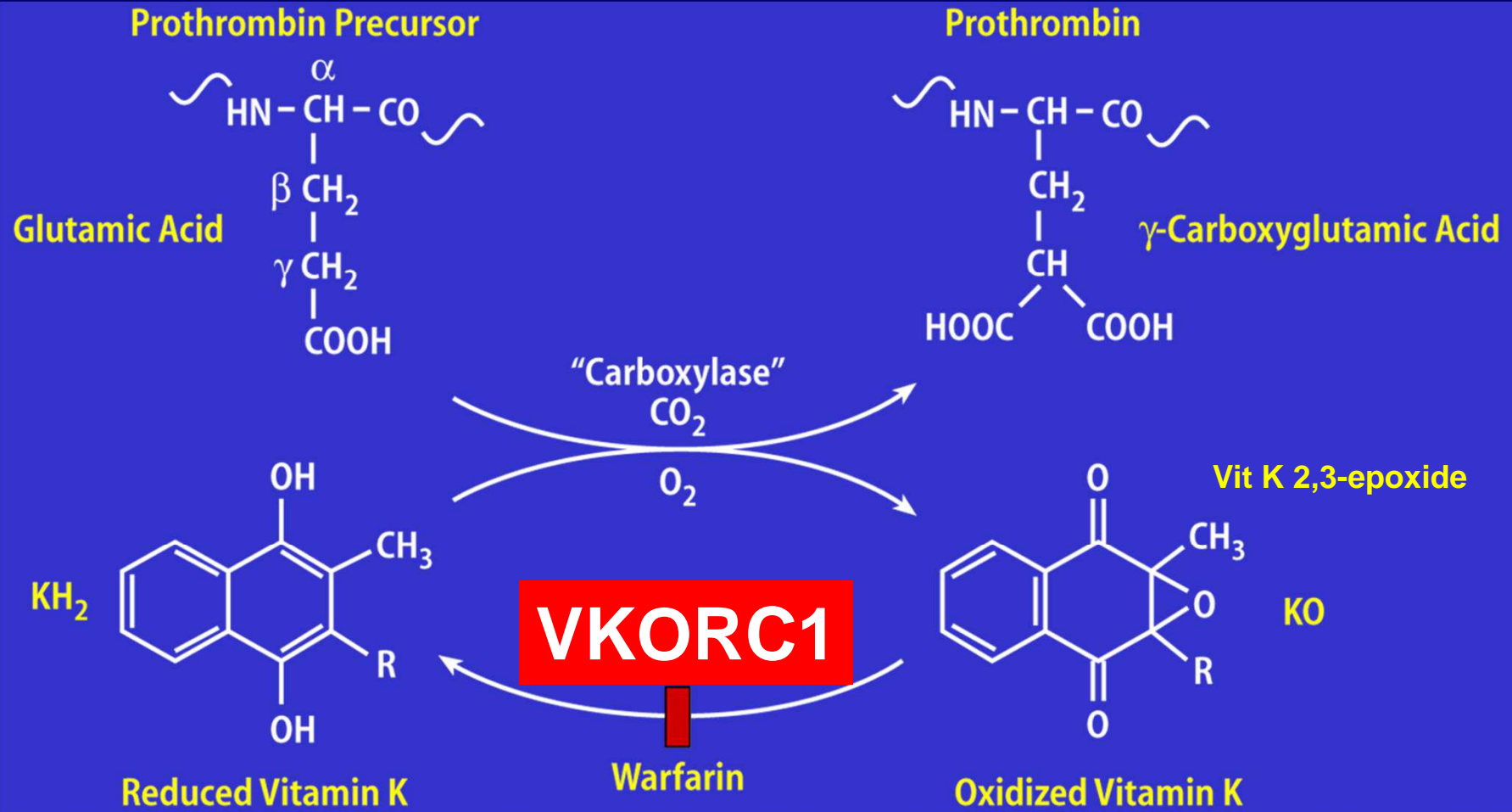
INR (2-3)

Vitamin K

Reduced use of vitamin K

VKA

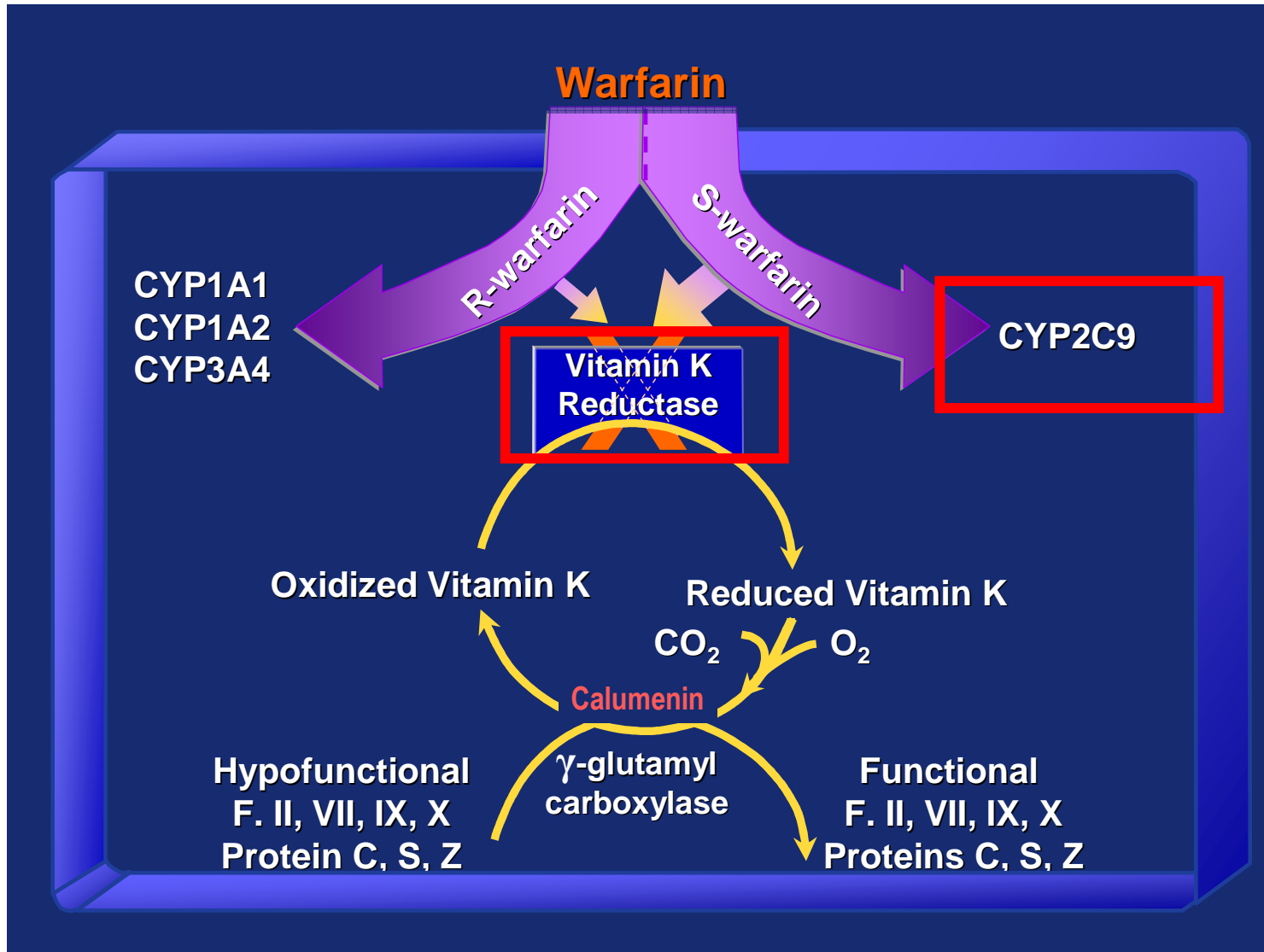
# Vitamin K antagonists : Site of action



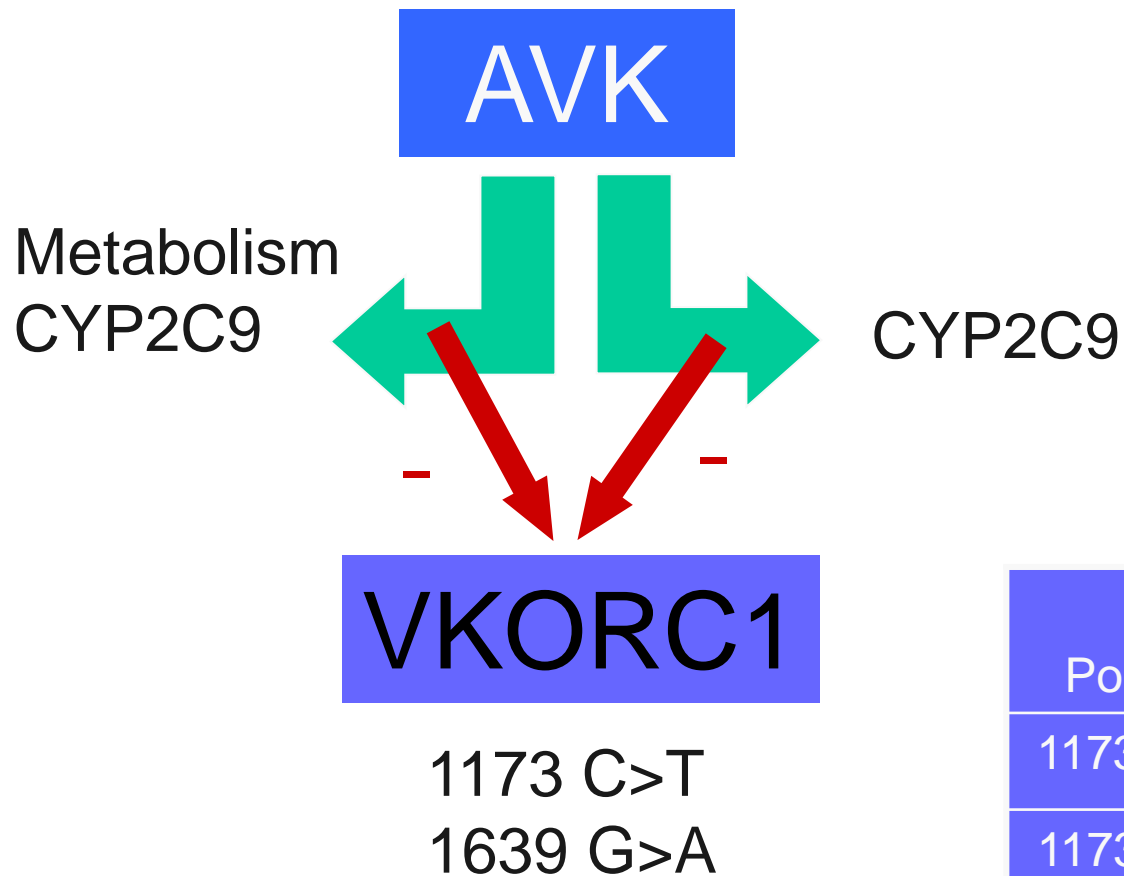
**VKORC1**

**Vitamin K epoxide reductase complex**

# Vitamin K antagonists : Pharmacokinetics and Pharmacodynamics



# Influence of SNPs on average dose of AVK



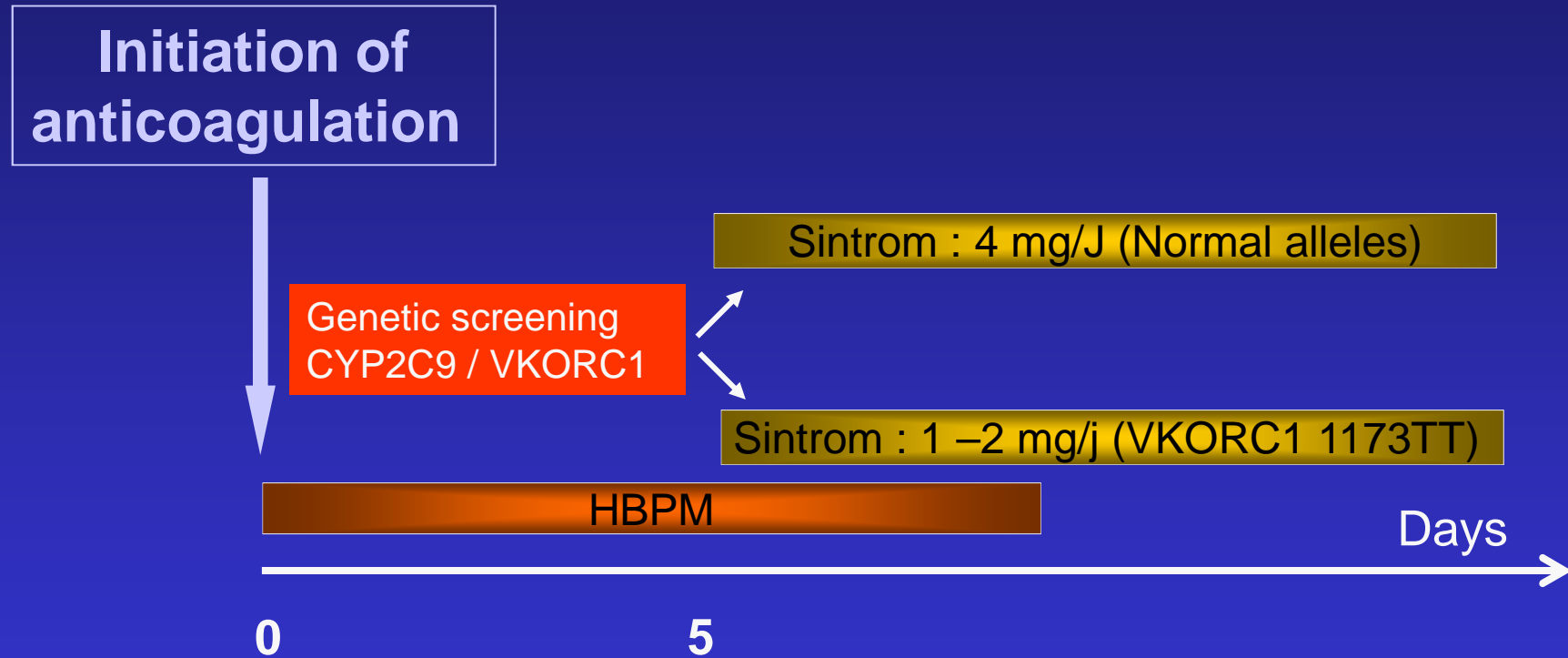
CYP2C9 Polymorphisms	Needs of AVK
CYP2C9*1	100 %
CYP2C9*2	60 - 81%
CYP2C9*3	29 – 72 %

VKORC1 Polymorphisms	Needs of AVK
1173CC / 1639AA	100 %
1173CT / 1639GA	78 %
1173TT / 1639 GG	57 %

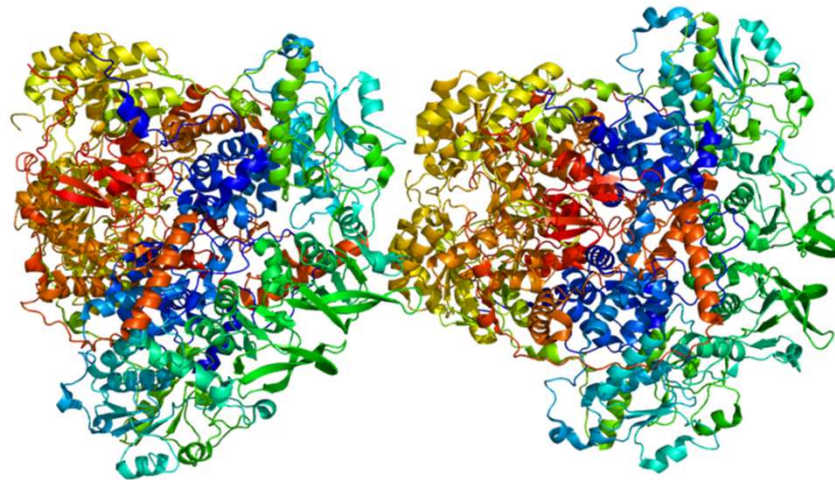
Perspectives

# Pharmacogenetics in the Management of Coumarin Anticoagulant Therapy: The Way Forward or an Expensive Diversion?

Mike Greaves



# Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD)

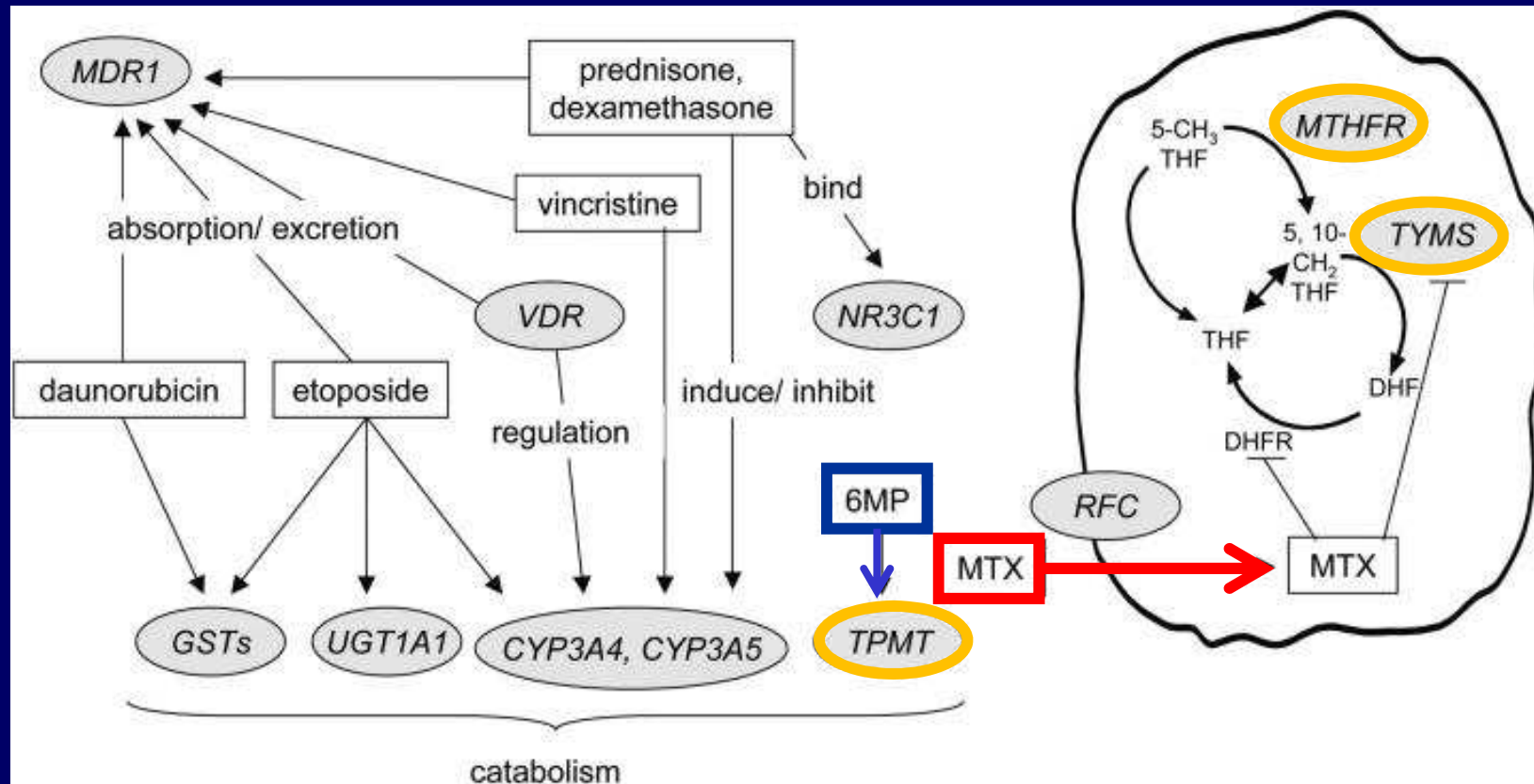


**Mutation = Increased TOXICITY towards:**

- **Capecitabine**
- **Fluorouracyl (5Fu)**



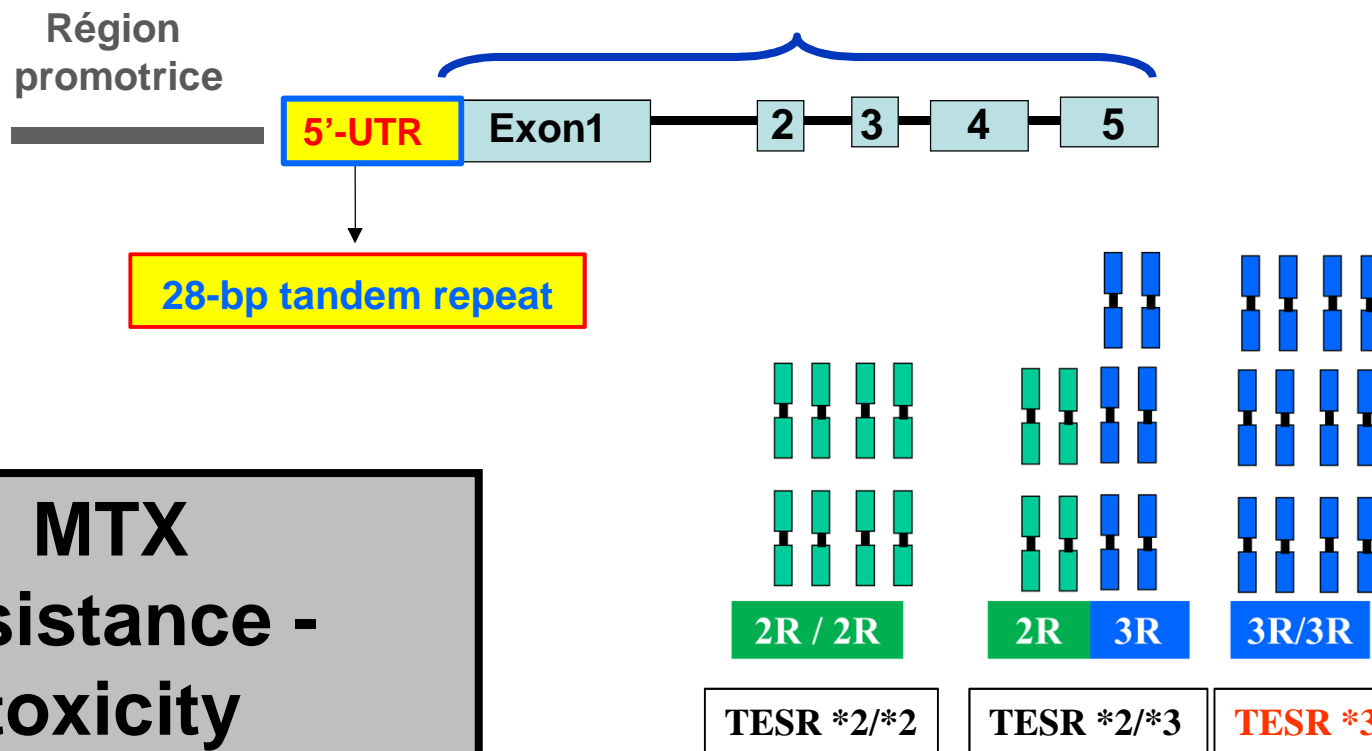
# Prédiction de la toxicité chez les enfants leucémiques ?





# Thymidylate Synthase (TS)

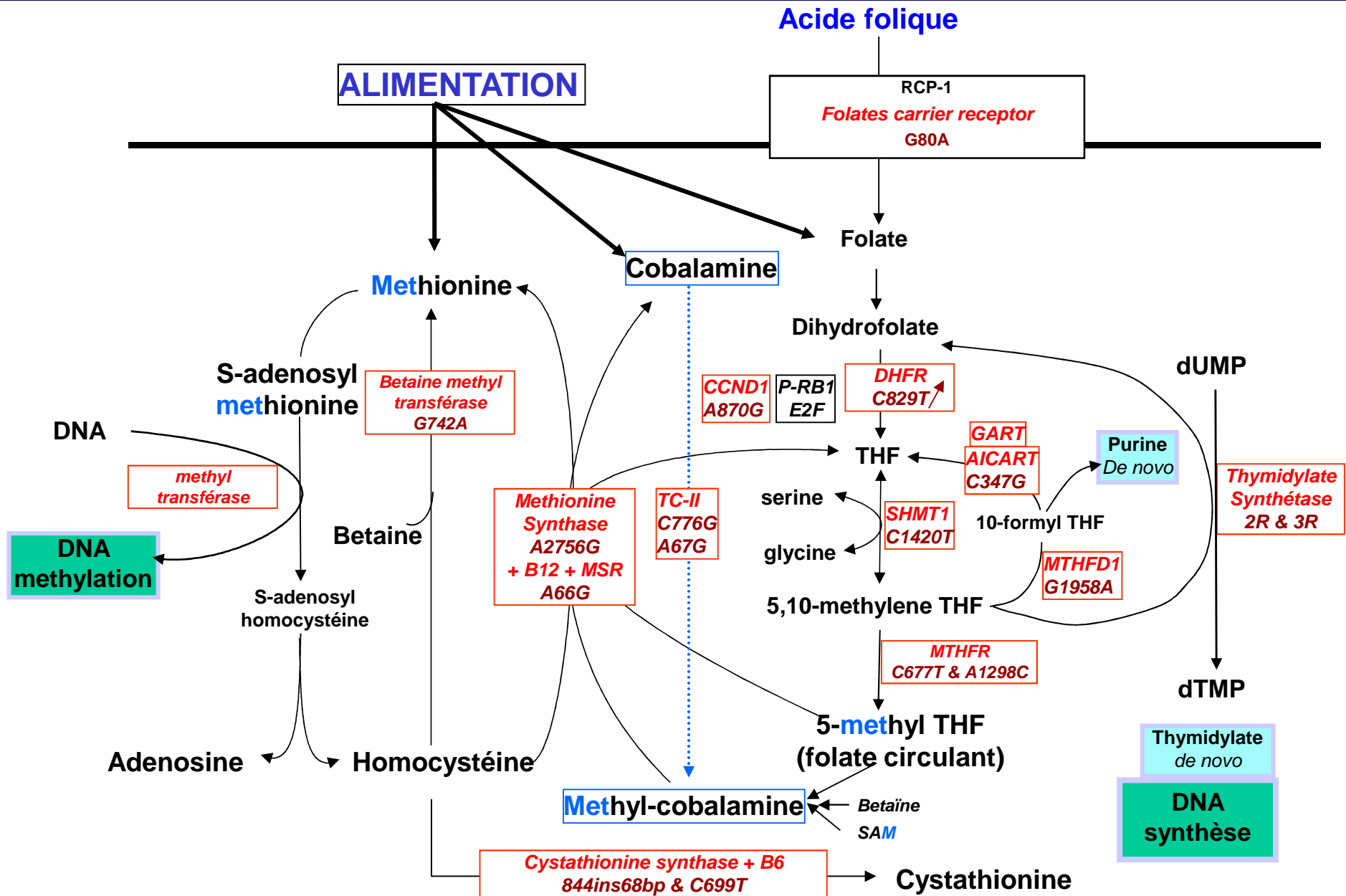
The 5' untranslated enhancer region of TS (TESR)



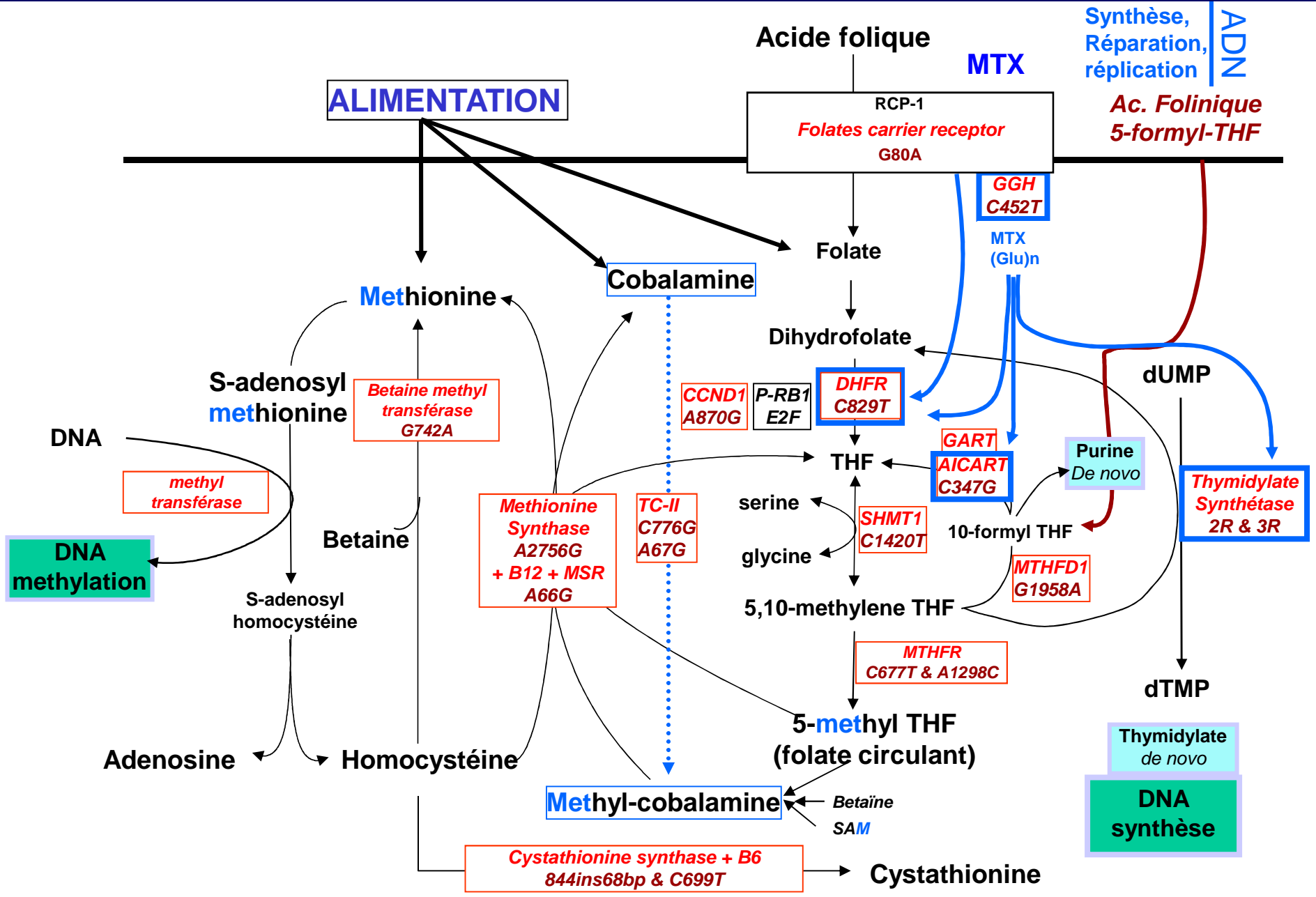
**MTX  
resistance -  
toxicity**

**Prevalence:**  
- Caucasians ~30%  
- Asians ~60%

# Métabolisme des folates et de l'homocystéine : Nombreuses cibles PG !!!



# Métabolisme des folates et de l'homocystéine : Nombreuses cibles PG !!!



# Comparative pharmacogenetic analysis of risk relevant polymorphisms in Caucasian and Vietnamese children with leukemia: prediction of therapeutic outcome?

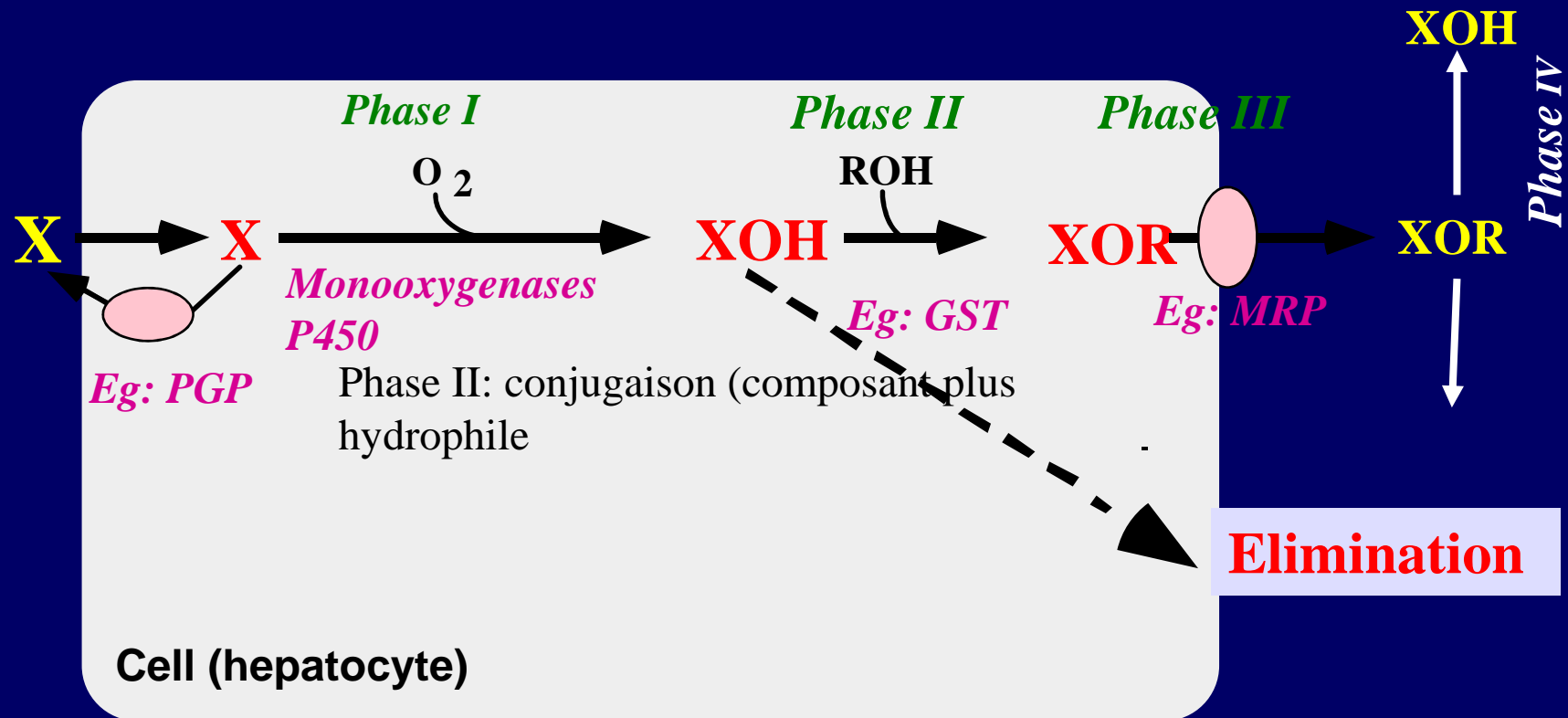
**Vu Hoang Phuong T, Ambroise J, Dekairelle AF, Dang Chi Vu L, Huynh Nghia,**

**Nguyen Tan B, Robert A, Vermeylen C, Gala Jean-Luc**

*BJCP, 2014*

- Cyclin D1 (CCND1) (G870A),  $\gamma$ -glutamyl hydrolase (GGH) (C452T), methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) (C677T and A1298C), thymidylate synthase promoter (TSER), and thiopurine methyltransferase (TPMT) (TPMT\*3A and TPMT\*3C)
- Caucasian (N=94) and Vietnamese (N=141) childhood ALL: EFS and MGRS ?

# Métabolisme des xénobiotiques



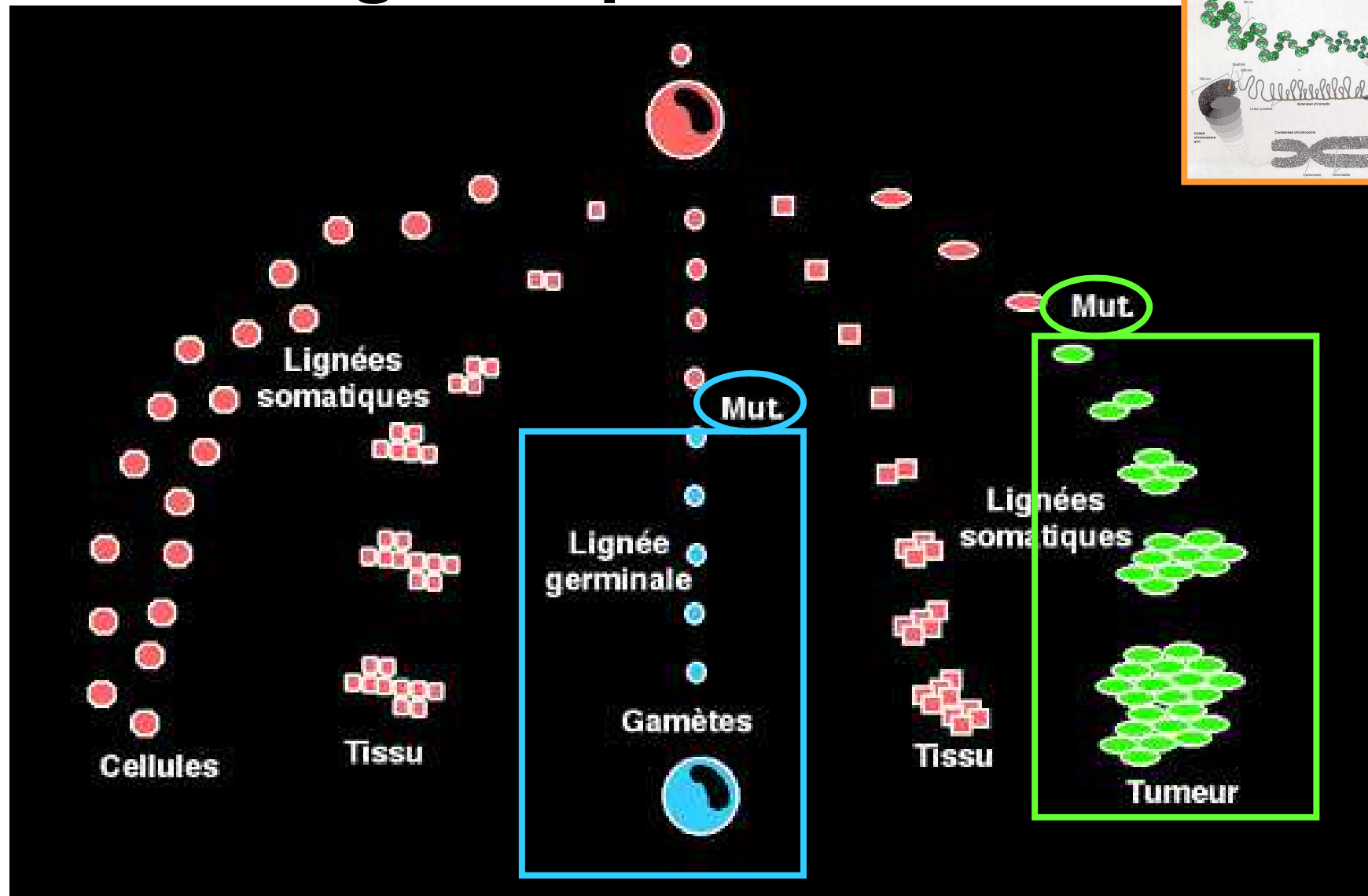
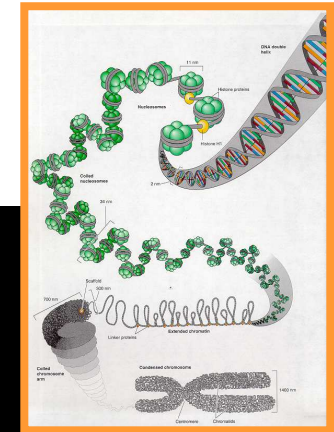
Phase I: fonctionalisation (oxydation, réduction, hydrolyse...)

Phase II: conjugaison (composant plus hydrophile)

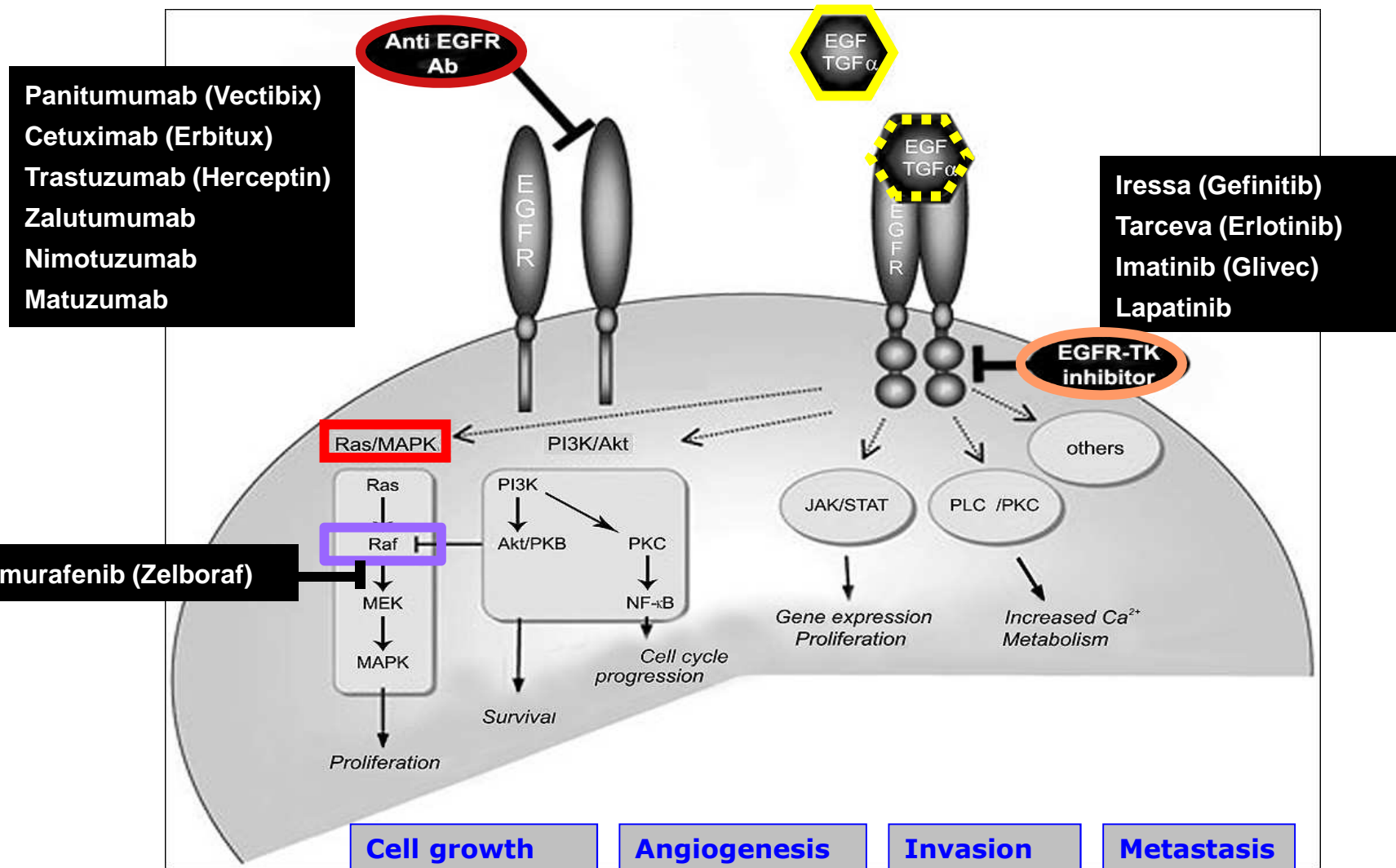
Phase III: expulsion du conjugué ou de la drogue initiale (ex: MDR, MRP)

Expulsion des xénobiotiques conjugués ou tels quels 

# Anomalies acquises ou génétiques ?



# Personalized medicine: acquired Ki-Ras EGFR or B-Raf mutation



# Pourquoi analyser l'EGFR ?

---

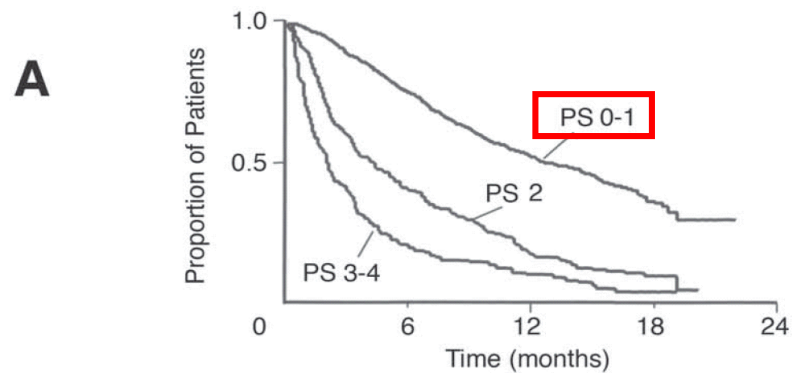
*EGFR*

## MUTATION EGFR :

- Traitement spécifique par TKI dans les cancers du poumon non-à petites cellules (Non Small Cell Carcinoma [NSCLC])

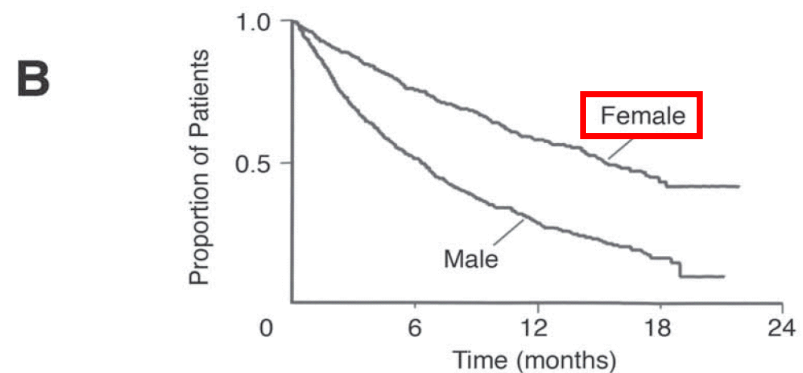


# Excellent Response to EGFR TKIs :



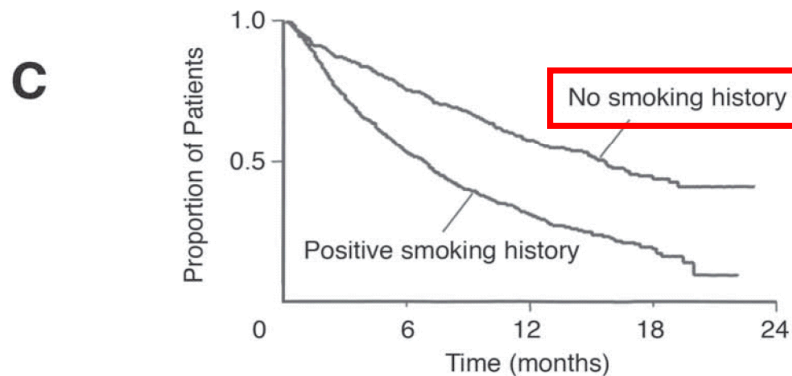
No. at risk:

PS 0-1	709	500	332	42
PS 2	218	85	35	8
PS 3-4	124	25	13	3



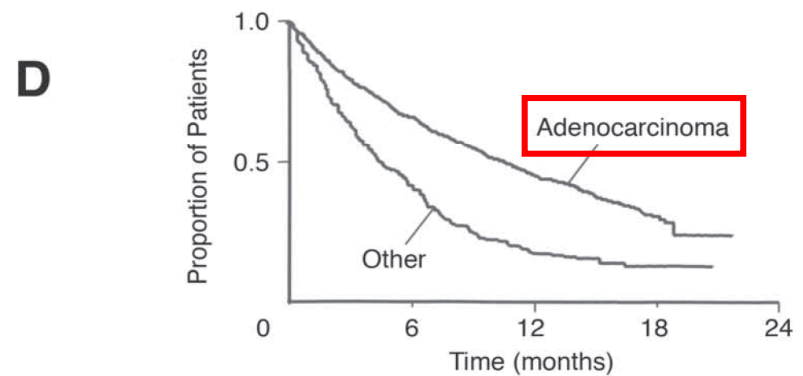
No. at risk:

Female	417	304	221	35
Male	638	307	159	18



No. at risk:

No history	431	312	217	38
Positive history	600	288	155	15

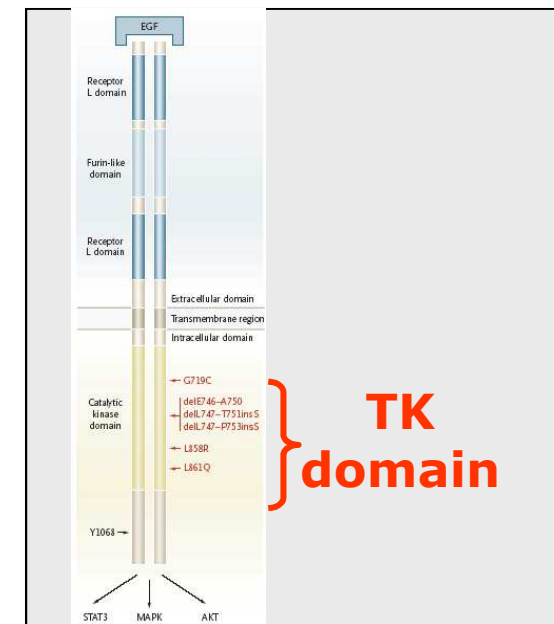
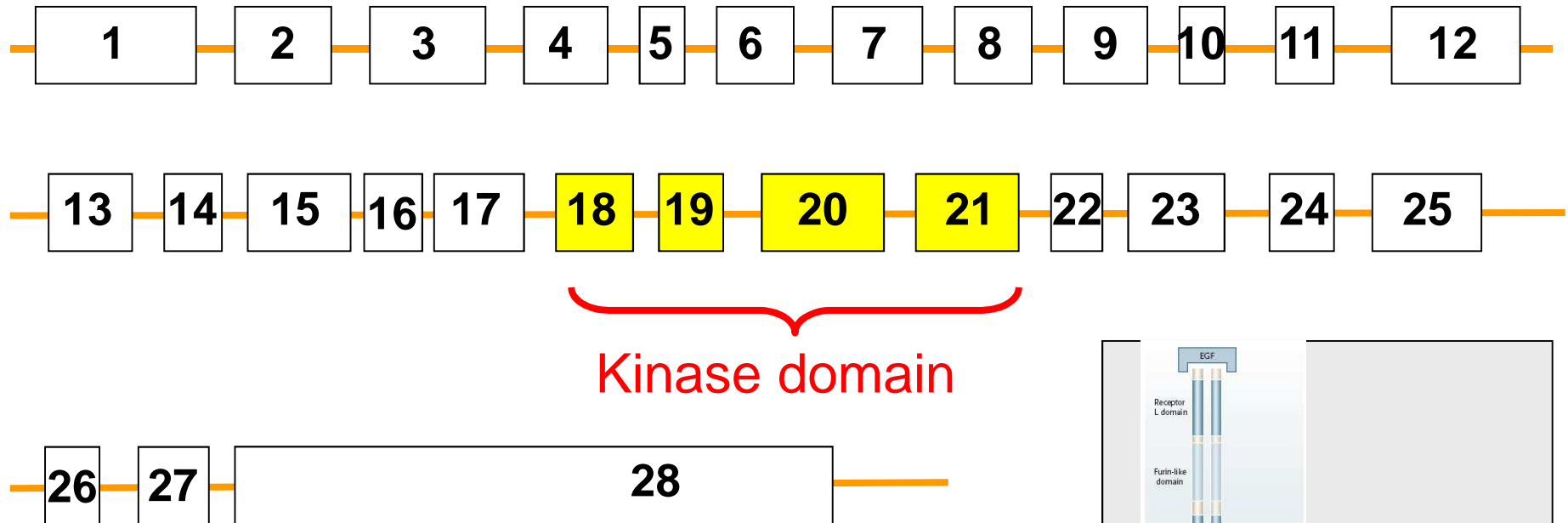


No. at risk:

Adenocarcinoma	843	533	349	48
Other	208	76	30	5

**+ asian patients**

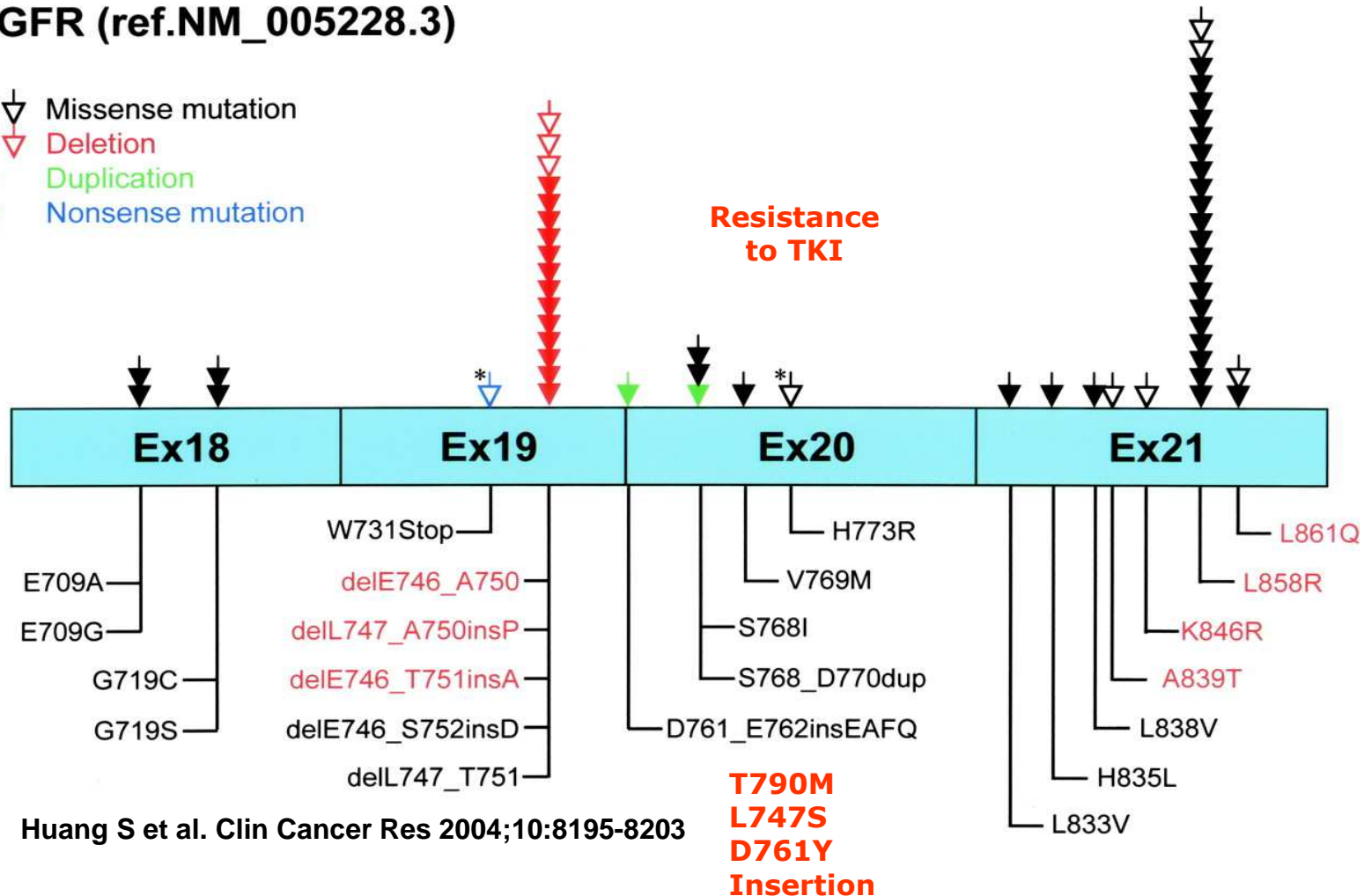
# EGFR : Gene organization



# EGFR mutations in the kinase domain (exons 18 to 21)

EGFR (ref.NM\_005228.3)

- ▼▼ Missense mutation
- ▼▼ Deletion
- ▼ Duplication
- ▼ Nonsense mutation

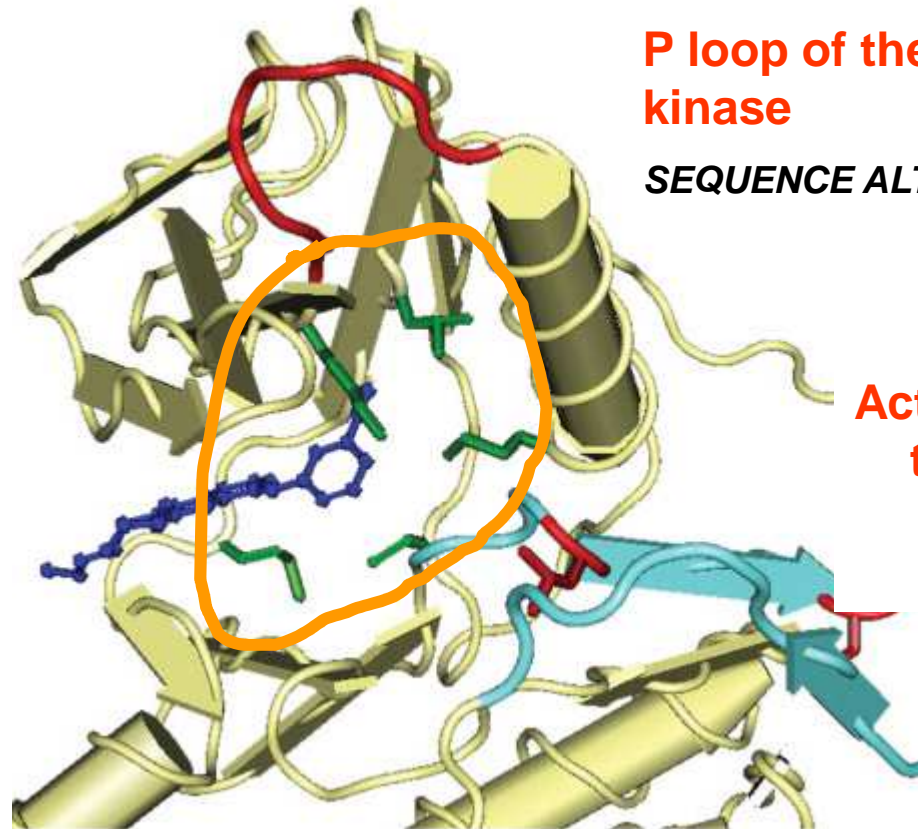


Huang S et al. Clin Cancer Res 2004;10:8195-8203

# Mutated *EGFR* gene: Impact on the EGFR protein !

In green, aminoacids involved in the binding of ATP or inhibitor.

The inhibitor (4-anilinoquinazoline) inhibits the catalysis of ATP by occupying ATP binding sites (hydrogen bonds with methionine and cystéine)



**P loop of the tyrosine kinase**

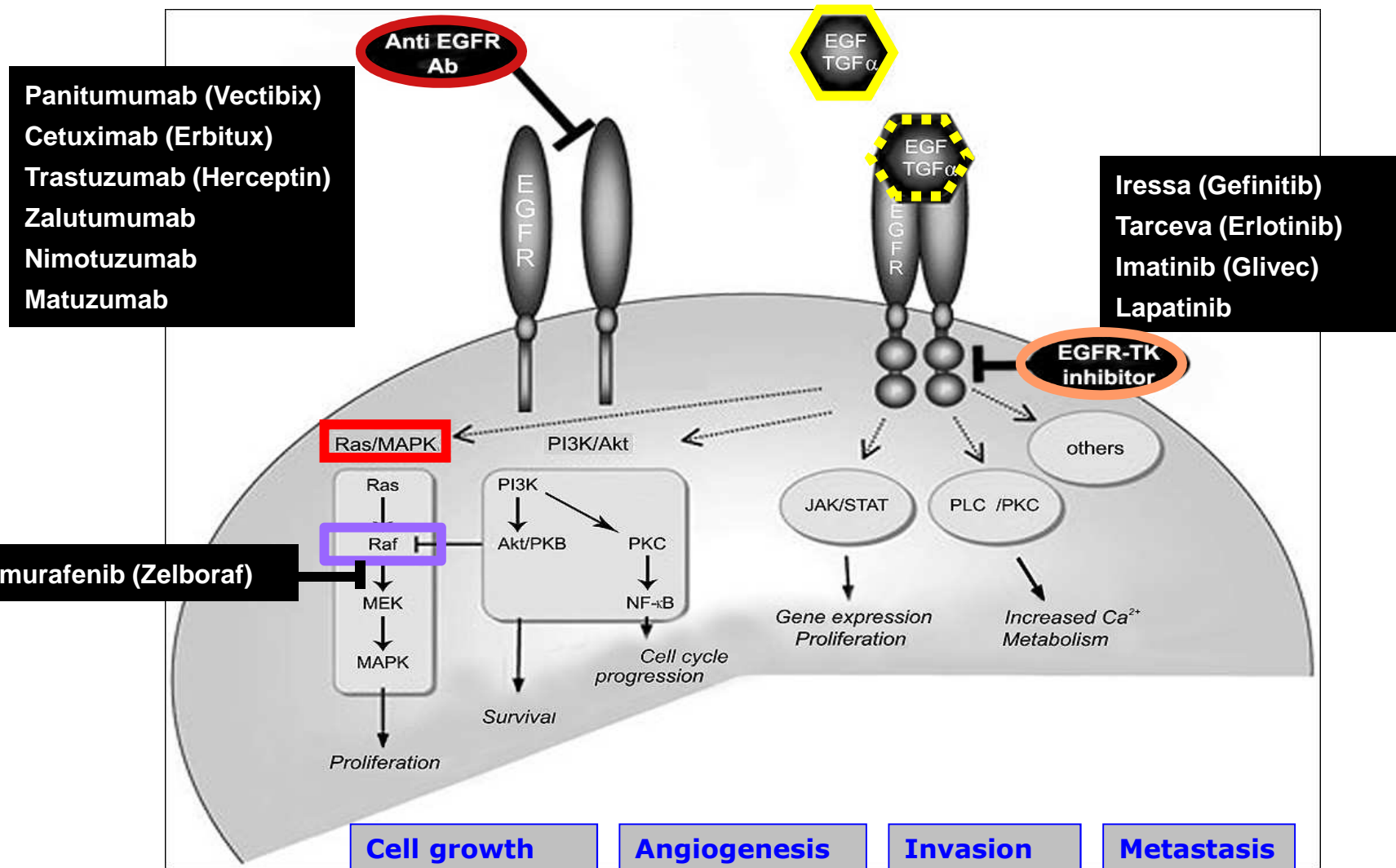
**SEQUENCE ALTERATIONS**

**Activating loop of the tyrosine kinase :**

**SUBSTITUTION MUTATIONS**

- Much stronger inhibition of phosphorylation in presence of TKI

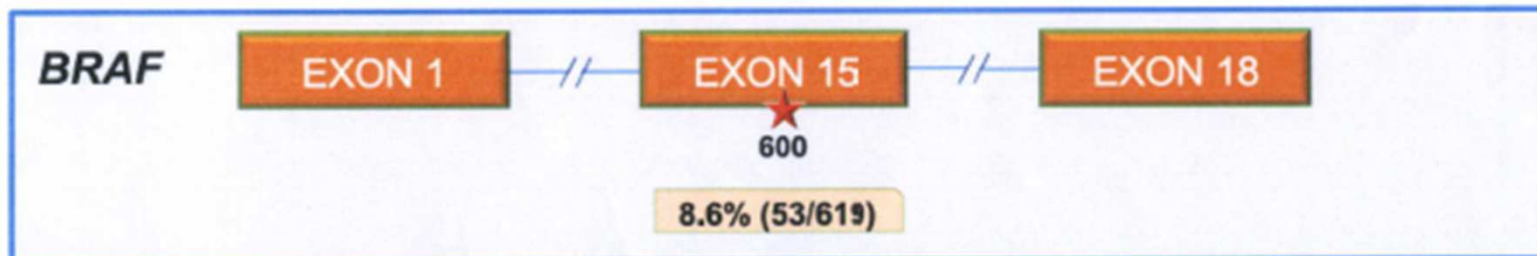
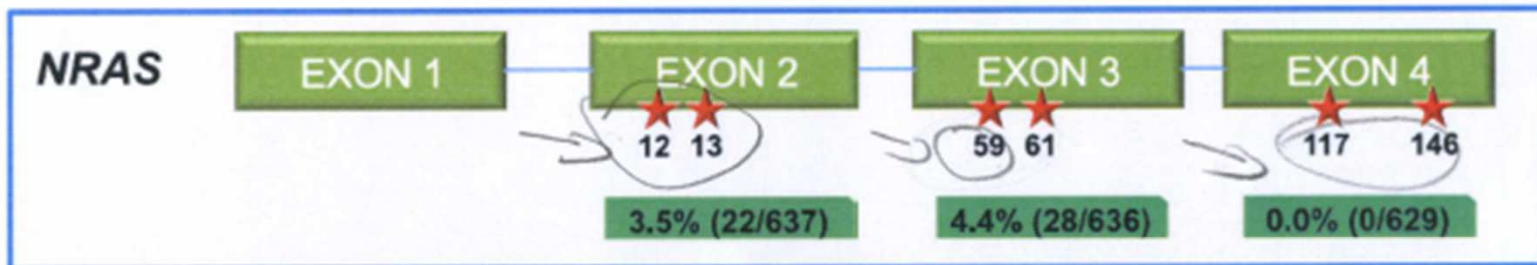
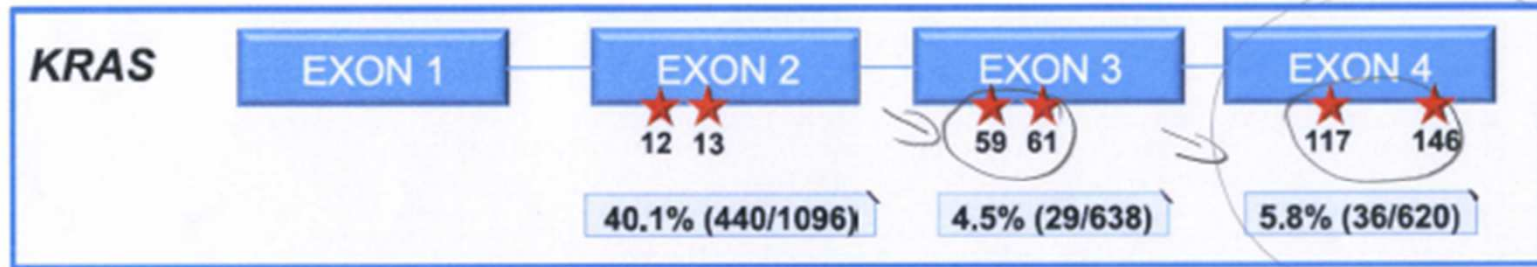
# Personalized medicine: acquired Ki-Ras EGFR or B-Raf mutation



# Kras, Nras Braf: nouvelles mutations ?

## Prevalence of Mutations\*

PEARL





# Pourquoi analyser le *Kras*?

---

*Kras*

**MUTATION KRAS dans le cancer colorectal : Pas de Réponse au R/ TKI**

Les cellules cancéreuses continuent de recevoir des messages les incitant à croître et à se diviser malgré le traitement anti-EGFR

# Pourquoi analyser le *Braf* ?

---

*Braf*

## MUTATION Braf :

- Traitement spécifique dans le mélanome
- Pas de réponse au R/ TKI dans le cancer colorectal



# Pourquoi analyser le *Nras*?

---

*Nras*

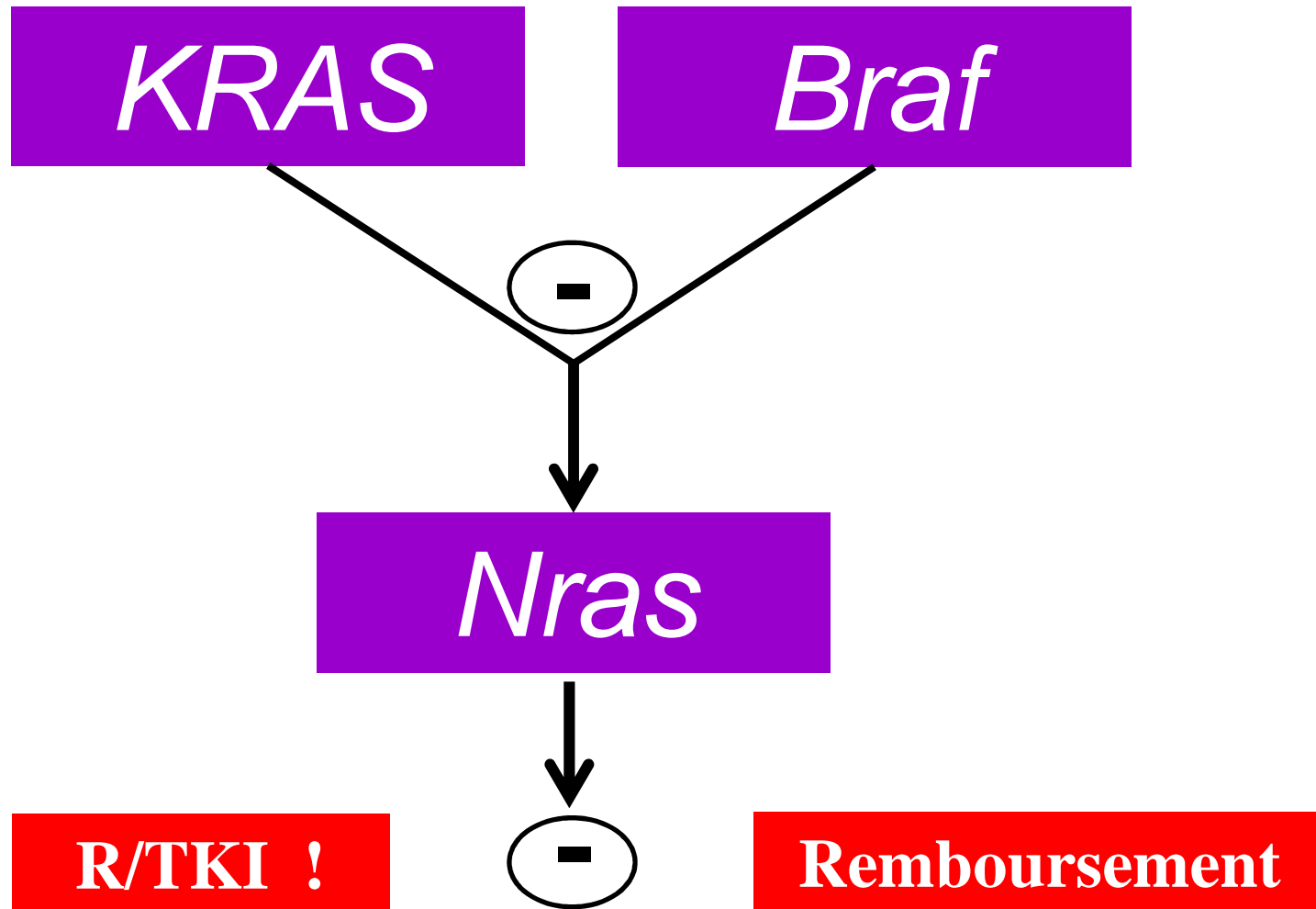
## MUTATION Braf :

- Traitement spécifique dans le mélanome
- Pas de réponse au traitement dans le cancer colorectal

# Cancer colorectal

## Algorithme analytique?

---



# RECHERCHE DES MUTATIONS DE L'EGFR



GUIDE PRATIQUE

## CLINICIEN



La prescription et le prélèvement

## PATHOLOGISTE



Le diagnostic histologique du cancer  
et la procédure pré-analytique

## BIOLOGISTE MOLECULAIRE



La recherche des mutations

# What type of sample ? Issues ?

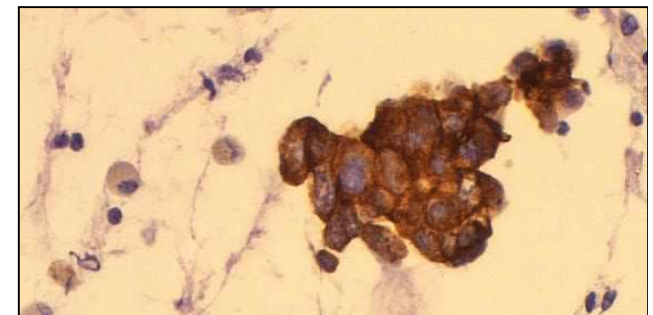
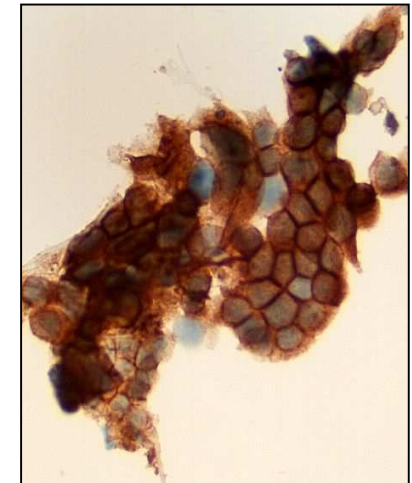
---

## □ Main issue

Small tumor & small sample !!!

## □ A wide range of samples

- Surgical Tumor (rare if early stage...)
- Paraffin-Embedded-Formalin-Fixed Biopsy
- Cytology
  - Unfixed
  - Fixed in alcohol (cytospins)
  - Embedded in paraffin
- Frozen specimens
- Bronchiolo Alveolar Lavage:
  - Very few cells !
  - However sometimes effective !!!!



# Sample collection

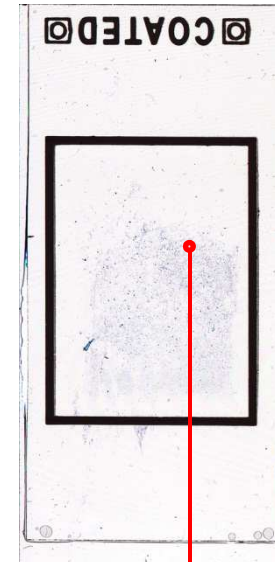




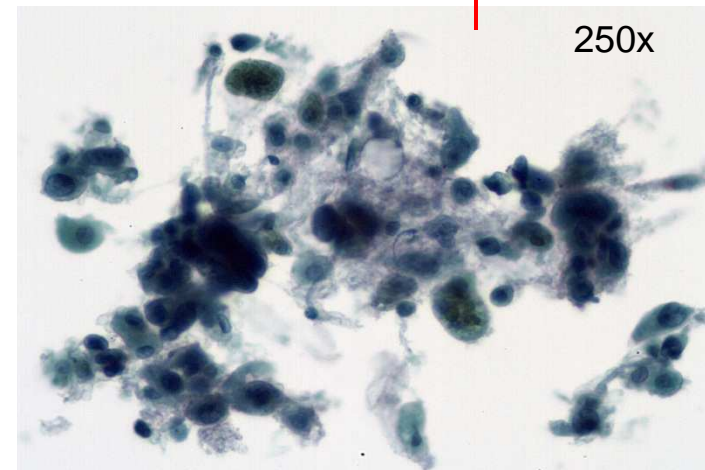
# Liquid samples



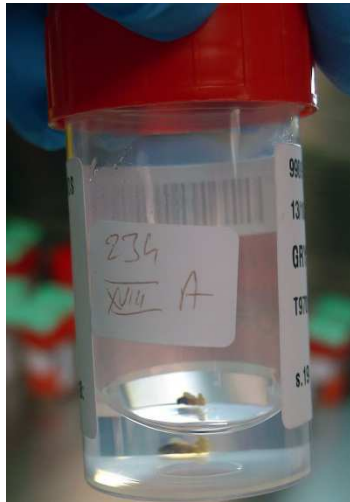
OR



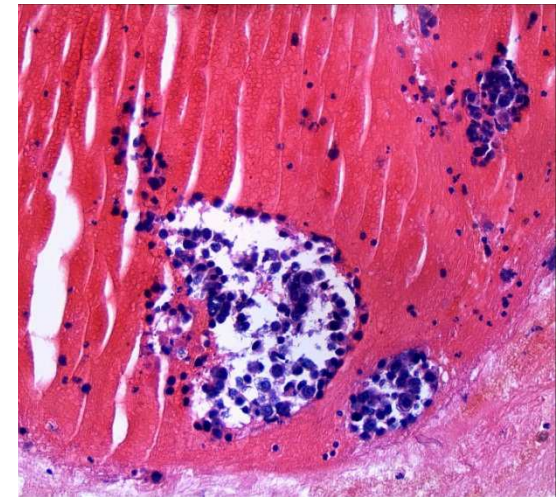
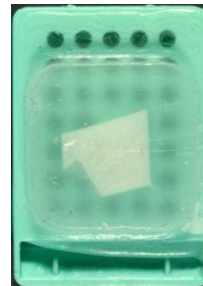
**NO** possibility to identify the cells !!



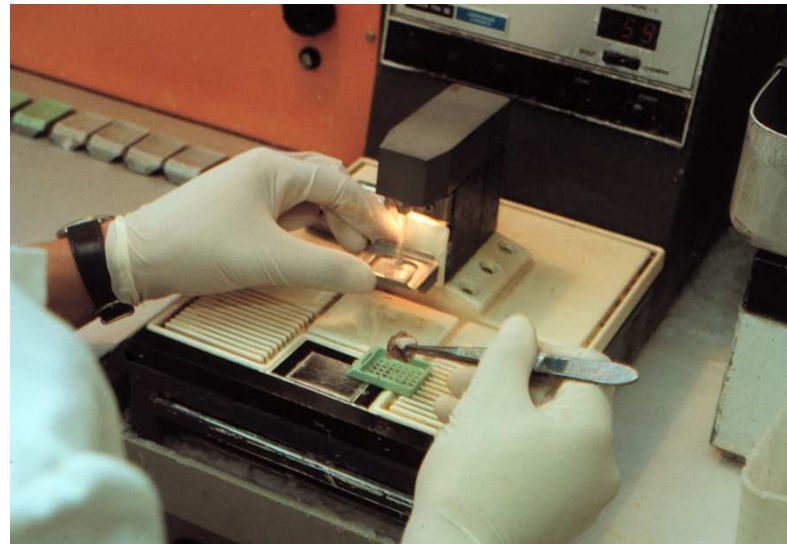
# Biopsies & Cytology



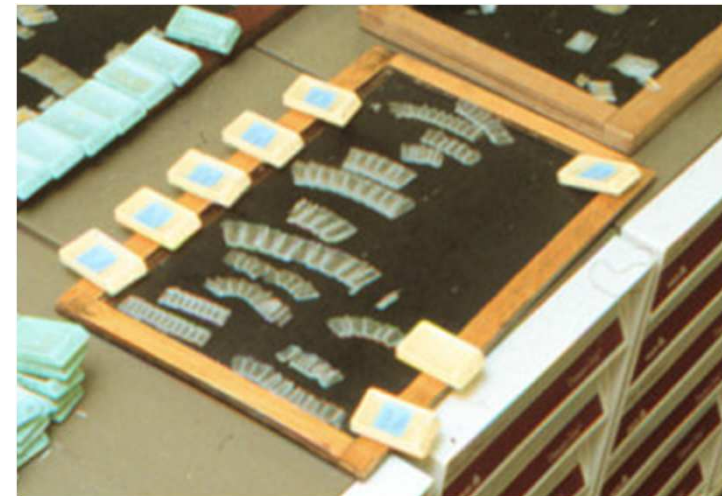
Centrifugation  
Paraffin embedding



# Paraffin embedding - Microtome



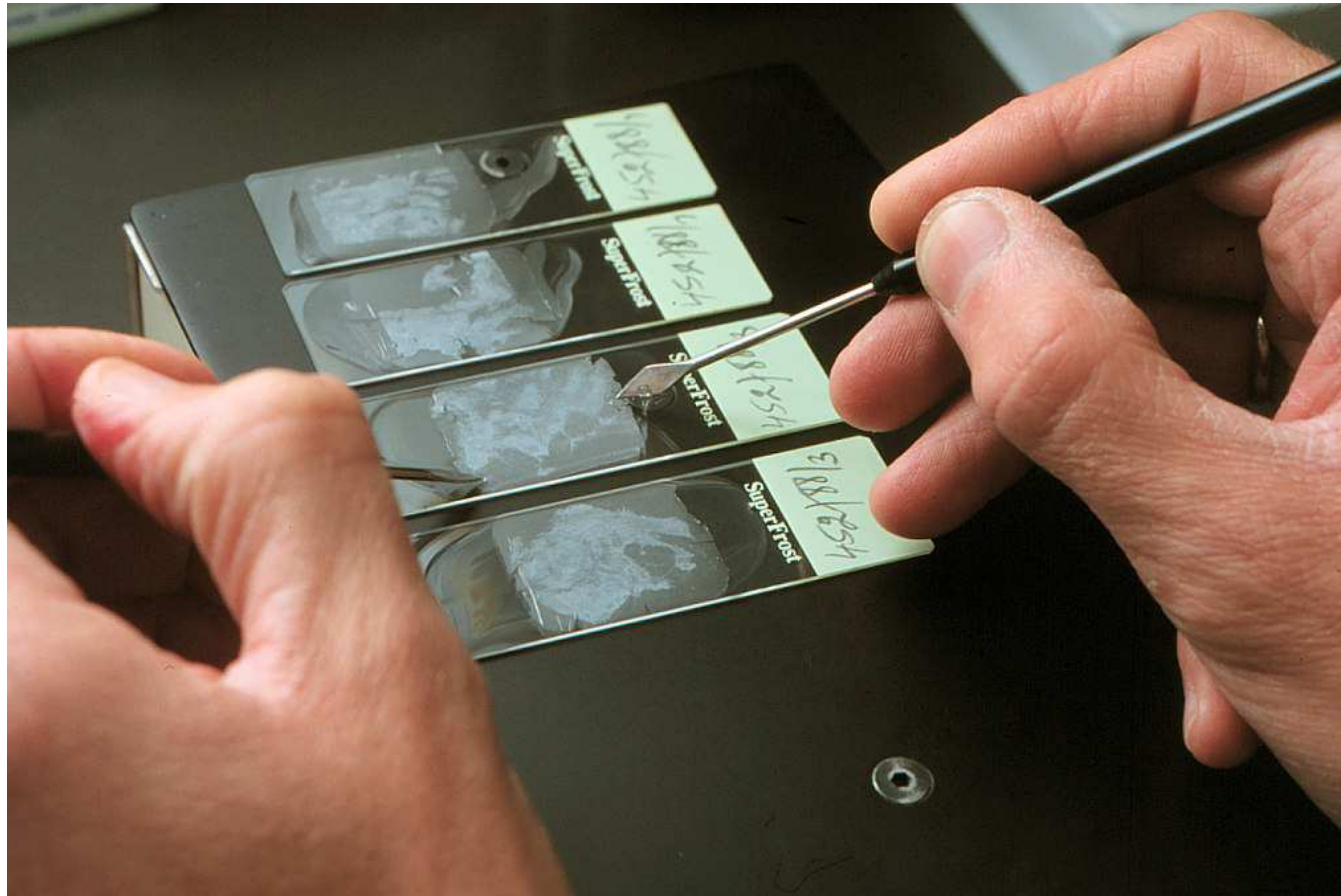
Cut  
ribbons of  
5 to 7  
microns



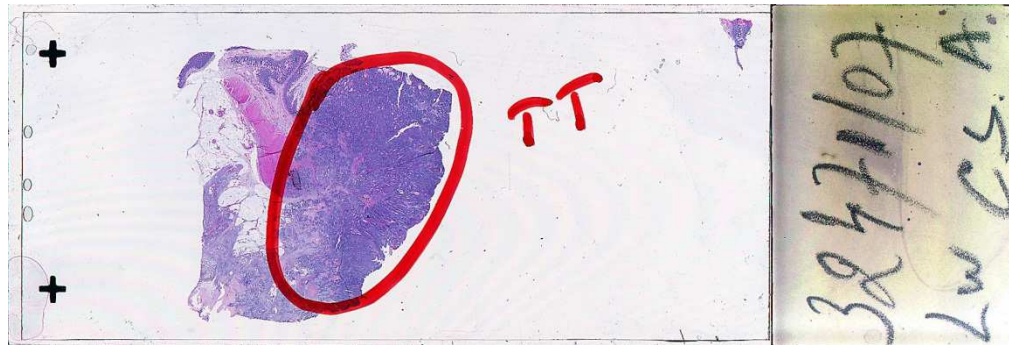


# Fixation on the slides

---

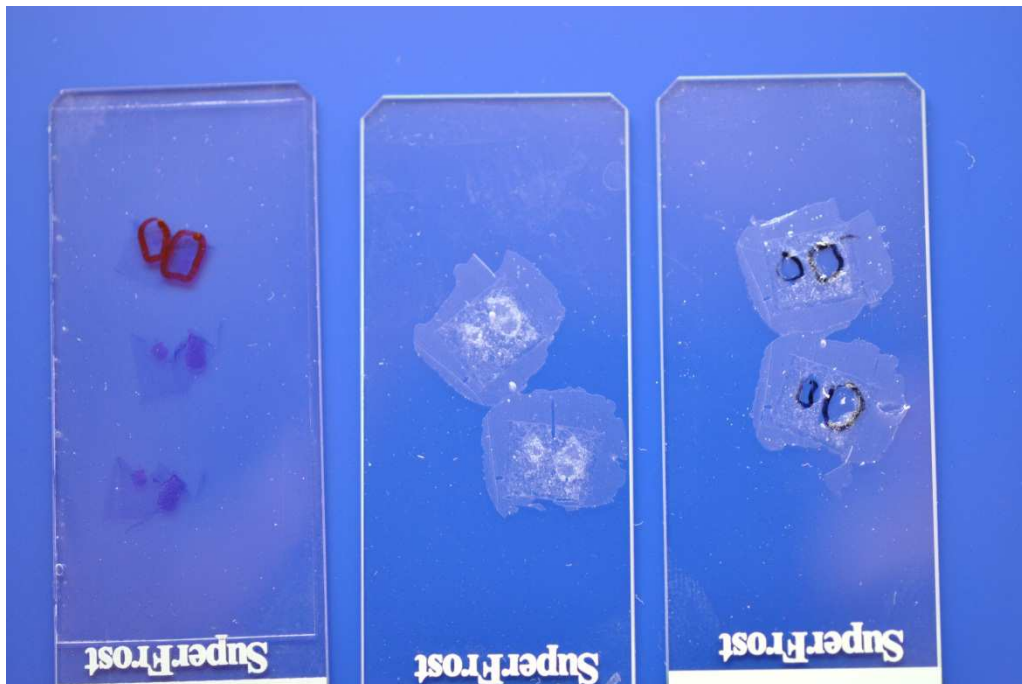


# Histological identification of the tumor zone



## Pathology Dpt

- Colored slide
- White slides



## CTMA

Scraping the tumor zone

# Conclusion

- ✓ Une **meilleure connaissance des anomalies génétiques** offrira une meilleure prédiction de la réponse thérapeutique en permettant d'optimiser la sélection des médicaments, et un ajustement plus rapide de la posologie.
- ✓ **L'accessibilité au génotypage** pourrait modifier dans un avenir proche notre approche de la thérapeutique et favorisera ainsi une meilleure individualisation thérapeutique

## To take home messages...

### Still a technological challenge :

How to characterize a wide spectrum of polymorphisms in a population ?  
And how to use them rationally on an individual basis ?

### Economical challenge :

Cost / benefit studies are needed before large clinical implementation  
cost of analysis vs optimal dosage, selection of good responders,  
avoidance of E<sup>2</sup>, decrease of hospitalization length, and of  
biological/ clinical surveillance...

### Ethical, legal, and social challenges:

« Genetic profiling »: how to use the information only for the benefit of the  
patient and not of its employer ?

But will guide the medicine of tomorrow even if the « research phase » is  
far to be over