

9<sup>e</sup> ÉDITION

# JOURNÉES DU GFCO 2023

Biomarqueurs et analyses moléculaires en oncologie

Avec la participation  
scientifique du



# Caractérisation fonctionnelle des variants :

## Vers une mise en place en routine

Alain Morel

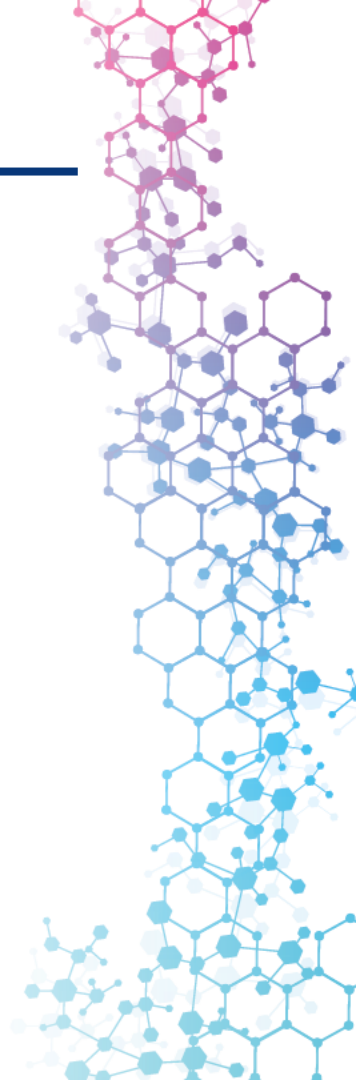
Unité de Génomique Fonctionnelle; Institut de Cancérologie de l'Ouest  
CRCI2NA, UMR Inserm 1307, Equipe « Immunité Innée et Cancer » - Angers, France



# Liens d'intérêt

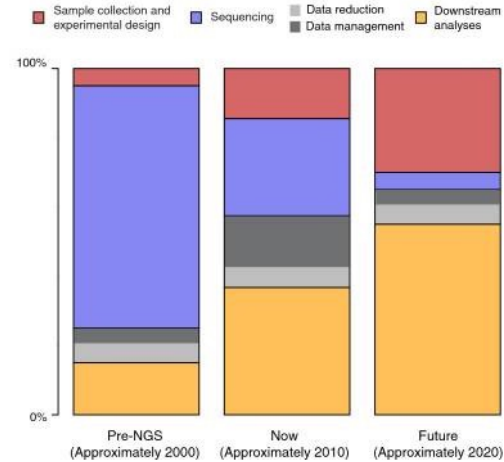
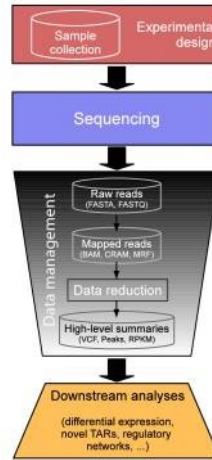
---

- AstraZeneca
- GSK
- MSD



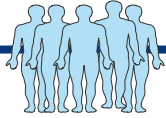
# Introduction

- Pour les 8 milliards d'humains il est estimé 9 milliards de variants compatibles avec la vie.
- Depuis le séquençage du génome humain et la généralisation du séquençage haut débit, l'interprétation des variants est un défi.



i  
n  
t  
e  
r  
p  
r  
é  
t  
a  
t  
i  
o  
n

# Le défi de l'interprétation des variants



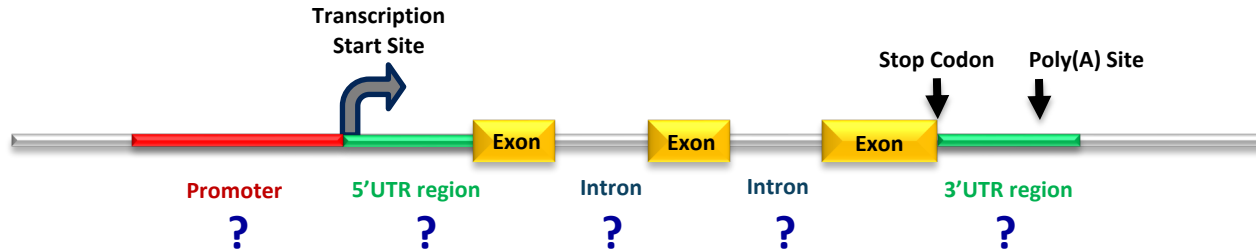
Énorme variabilité du génome humain

- 4-5 Millions variants par génome
- 200 000 unique variants par individu
- 20 000 variants par exome (1-2% du génome)  
(~ 150 rare, perte de fonction)

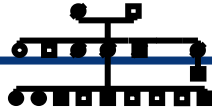
Lek et al., Nature 2016  
Karczewski et al., Nature 2020

**Défi de l'interprétation fonctionnelle des variants**

- Variants exoniques ou codants
- Variants génétiques non codants (promoteur, UTR, introns)



# Interprétation des variants



1

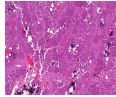
Données cliniques

Phénotype, co-ségrégation

2

Données épidémiologiques

Bases de données population générale  
BDD patients, estimations de fréquences alléliques



3

Analyses somatiques

Immunohistochimie, LOH, statut MSI

4

Prédictions bio-informatiques

Analyse *In silico* de l'impact sur la protéine et l'ARN



5

Essai fonctionnel

Interprétation clinique

Probably Benign  
Class 2

Uncertain Significance  
VUS Class 3

Probably Pathogenic  
Class 4

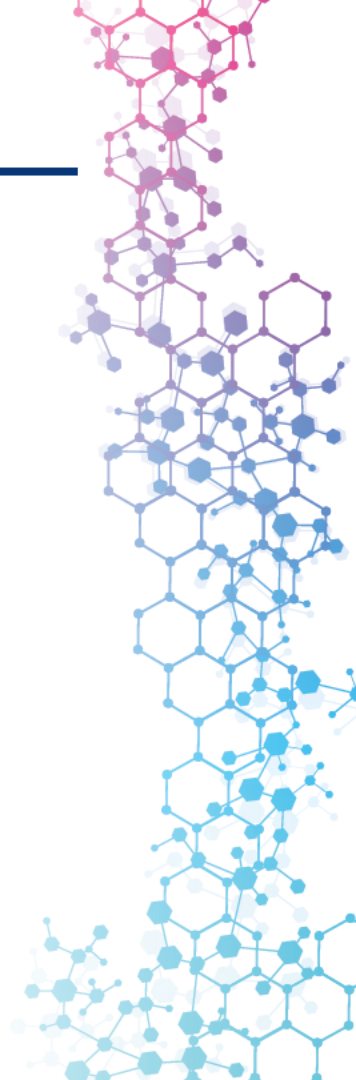
Pathogenic  
Class 5



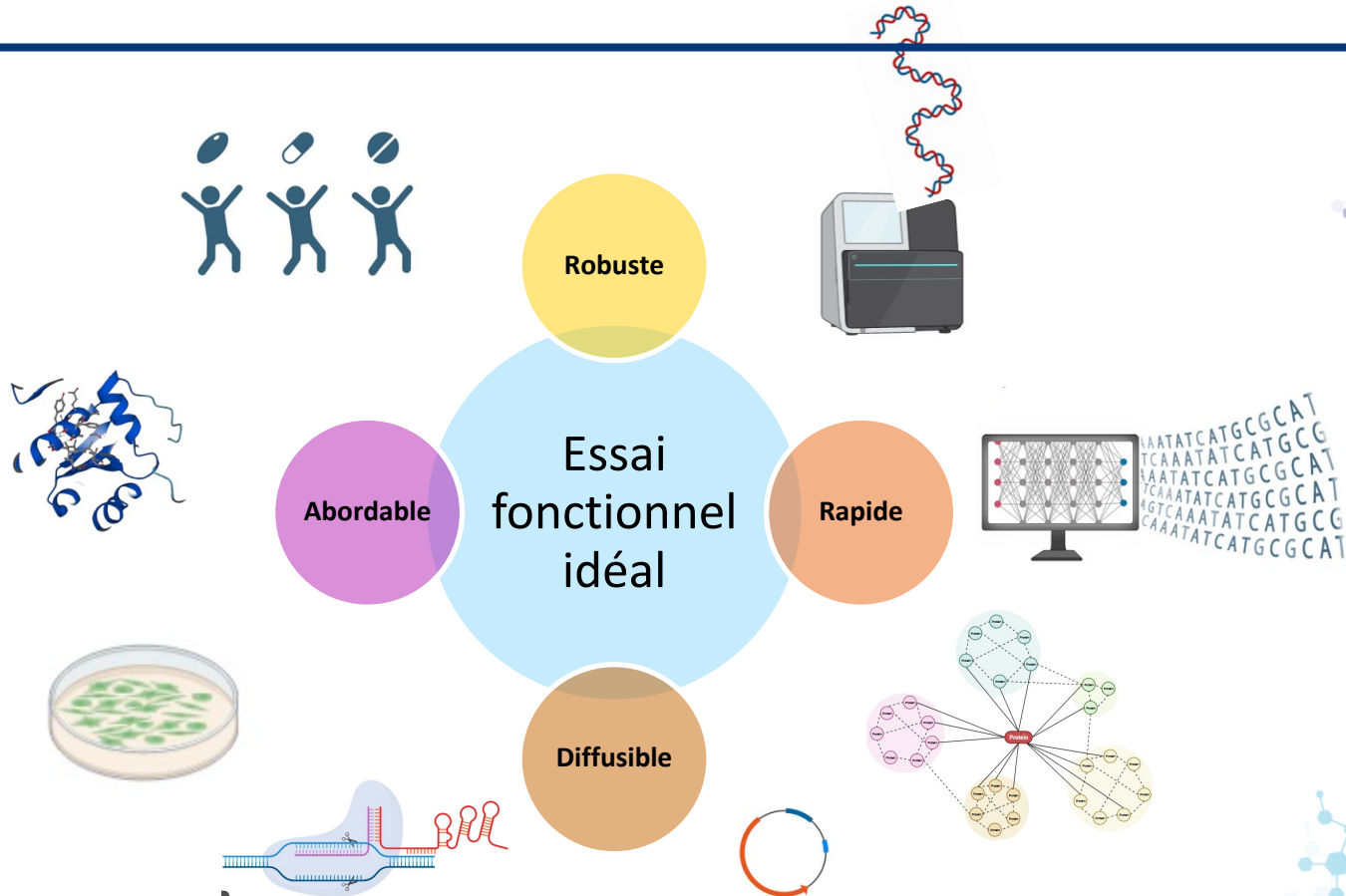
# Recommandations ACMG et évidence fonctionnelle

	Évidence pathogène	Évidence bénin
Prédiction in silico (CADD)	Faible/modéré	Faible/modéré
Association avec un variant pathogène		Faible
Présence du variant dans la population générale		Forte
Variant rare dans la population	Modérée	
Changement d'AA à la même position qu'un variant pathogène	Modérée	
<b>Étude fonctionnelle</b>	Forte	Forte

Génomique fonctionnelle : étude de la fonction des gènes, de leur régulation et des interactions de leurs produits d'expression, ARN et protéines.



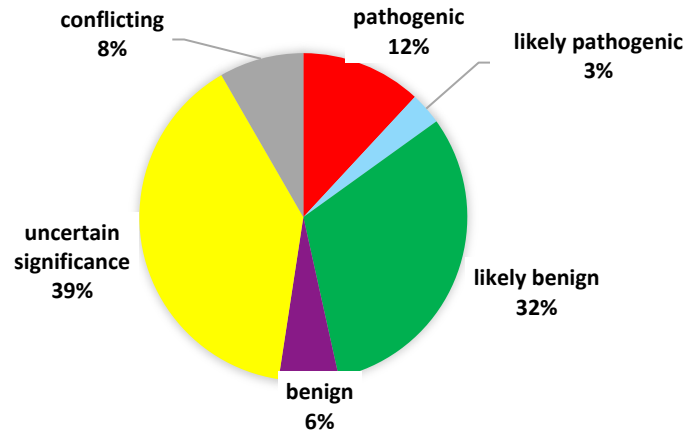
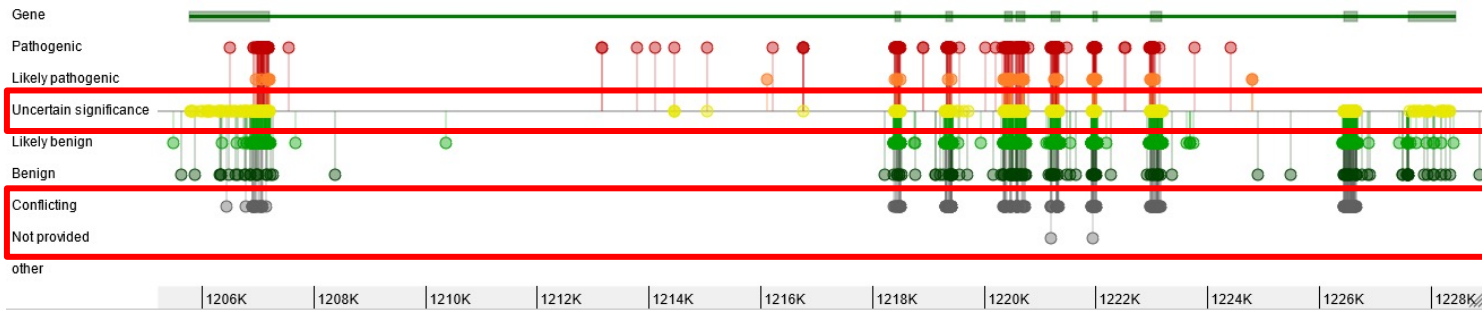
# Un essai fonctionnel de variant doit



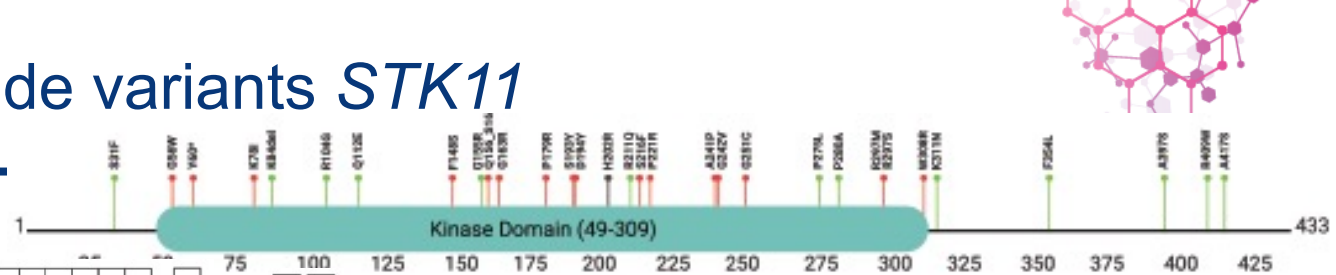


# Essai fonctionnel : *Sérine Thréonine kinase 11* (*STK11*) gène suppresseur

*STK11* variants LoF : résistance à l'immunothérapie anti-PD1 des CBNPC *KRAS* muté



# Essai fonctionnel de variants *STK11*



	DANN	MutationTaster	Mutation assessor	FATHMM	FATHMM-MKL	FATHMM-XF	LRT	DEOGEN2	EIGEN	EIGEN PC	SIFT	SIFT4G	PROVEAN	MVP	MutPred	REVEL	PrimateAI	MetaSVM	MetaLR	BayesDel addAF	BayesDel noAF	LIST-S2	ClinVar Database	Luciferase assay	Kinase Assay	
S31F																										
G56W																										
R104G																										
Q112E																										
F148S																										
G155R																										
G163R																										
P179R																										
S193Y																										
D194Y																										
H202R																										
R211Q																										
S216F																										
P221R																										
A241P																										
G242V																										
G251C																										
P275L																										
P280A																										
R297M																										
R297S																										
W308R																										
K311N																										
F354L																										
A397S																										
R409W																										
A417S																										

Luciférase essai : activation de l'activité transcriptionnelle de p53  
 Kinase essai : autophosphorylation de *STK11*

- Likely pathogenic
- Likely benign
- Conflicting or VUS
- No informations

**Nombreuses discordances Clinvar et prédicteurs ou absence d'informations dans ClinVar**

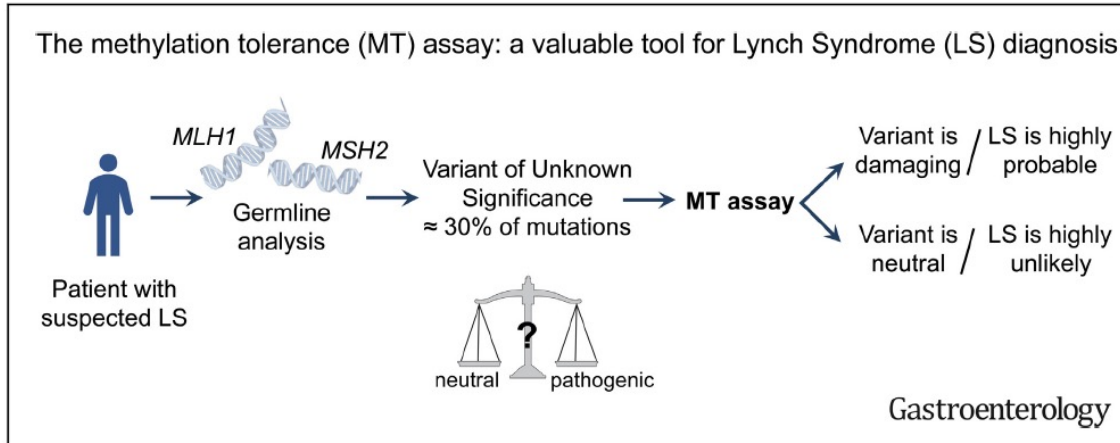
# Essai fonctionnel de variants de *MLH1* et *MSH2* et syndrome de Lynch

## Methylation Tolerance-Based Functional Assay to Assess Variants of Unknown Significance in the *MLH1* and *MSH2* Genes and Identify Patients With Lynch Syndrome

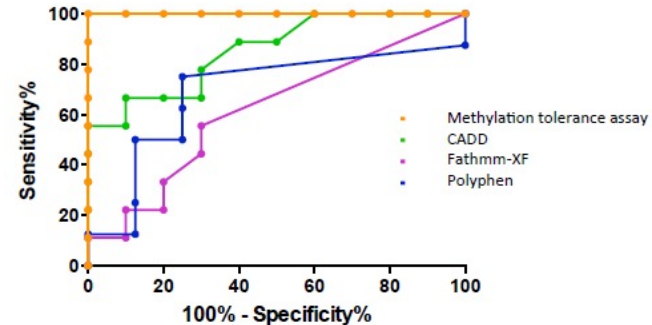
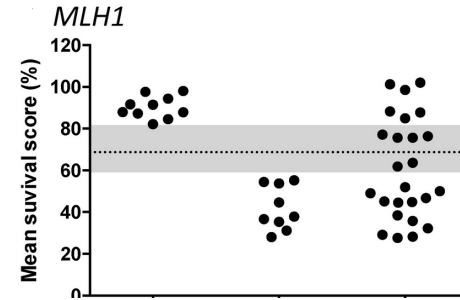
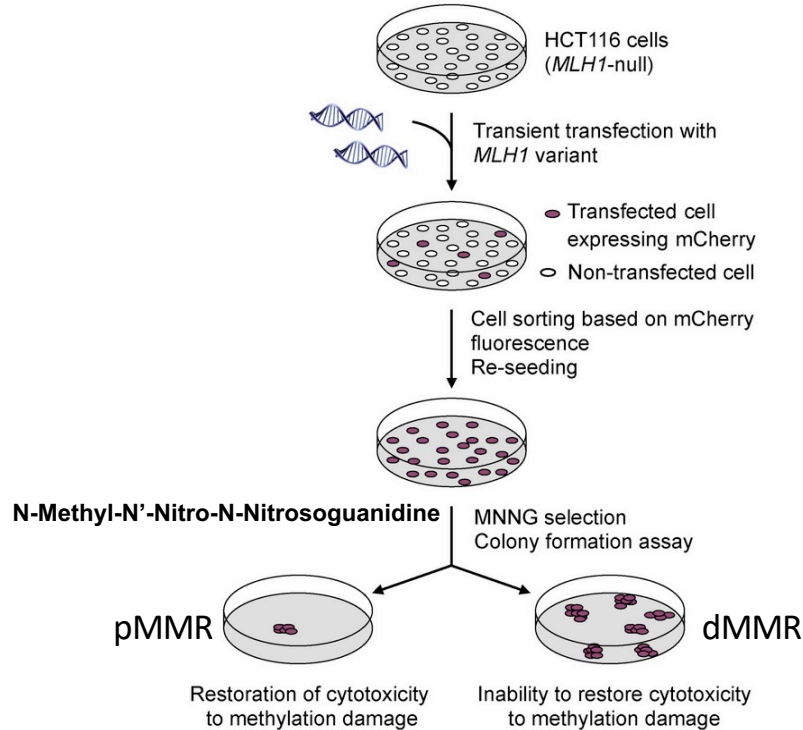


Delphine Bouvet,<sup>1,2</sup> Sahra Bodo,<sup>1,2</sup> Annie Munier,<sup>3</sup> Erell Guillermin,<sup>1,2,4</sup> Romane Bertrand,<sup>1,2</sup> Chrystelle Colas,<sup>1,2,5</sup> Alex Duval,<sup>2,6</sup> Florence Coulet,<sup>1,2,4</sup> and Martine Muleris<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, Paris, France; <sup>2</sup>Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, Paris, France; <sup>3</sup>Sorbonne Université, Inserm, Centre de recherche Saint-Antoine, UMS30-LUMIC, Plateforme de Cytométrie en Flux CISA, site Saint-Antoine, Paris, France; <sup>4</sup>Genetics Department, AP-HP, Hôpital Universitaire Pitié-Salpêtrière, Paris, France; <sup>5</sup>Institut Curie, Paris Sciences Lettres Research University, Department of Genetics, Paris, France; and <sup>6</sup>Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, AP-HP, Biochimie, biologie moléculaire, Paris, France

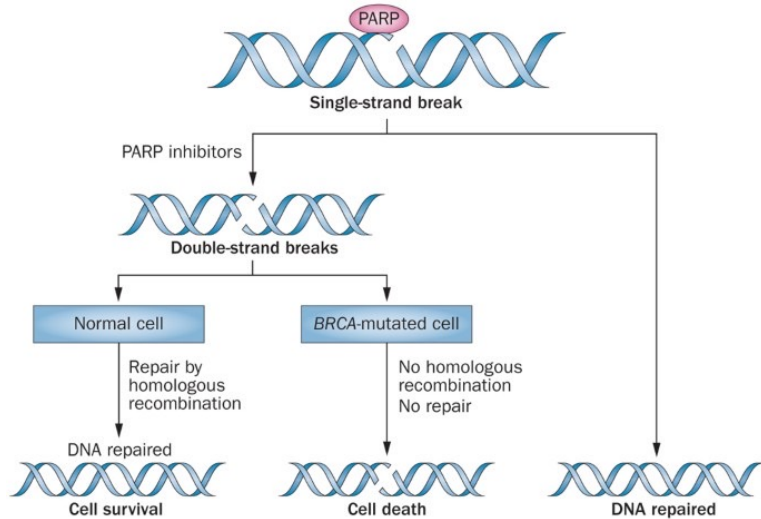


# Essai fonctionnel de variants de *MLH1* et syndrome de Lynch



La fonctionnalité semble supérieure  
aux prédicteurs

# Essai fonctionnel de *BRCA1/2*



Sonnenblick A. et al, 2014

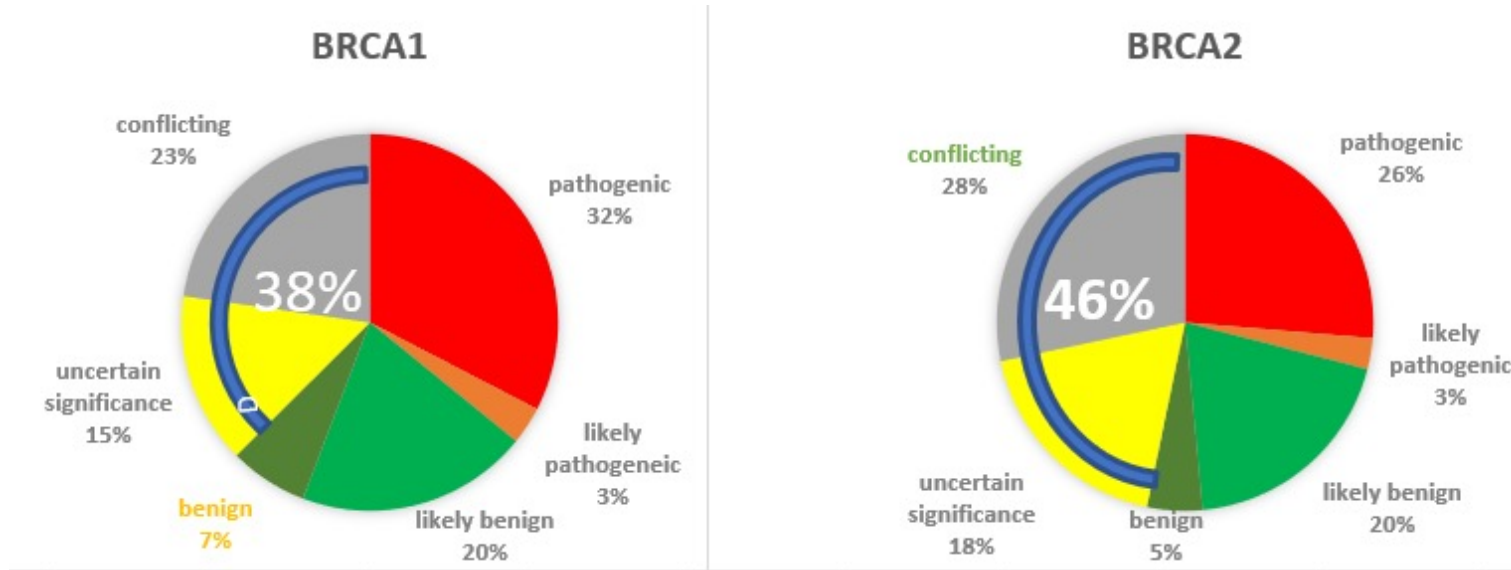
PARP = enzymes poly  
(ADP-ribose) polymérase  
humaine

**Variants pathogènes de *BRCA1/2*  
sensibilisation accrue aux agents  
pharmacologiques ciblant la réparation  
de l'ADN : inhibiteurs de PARP**

Concept de létalité synthétique

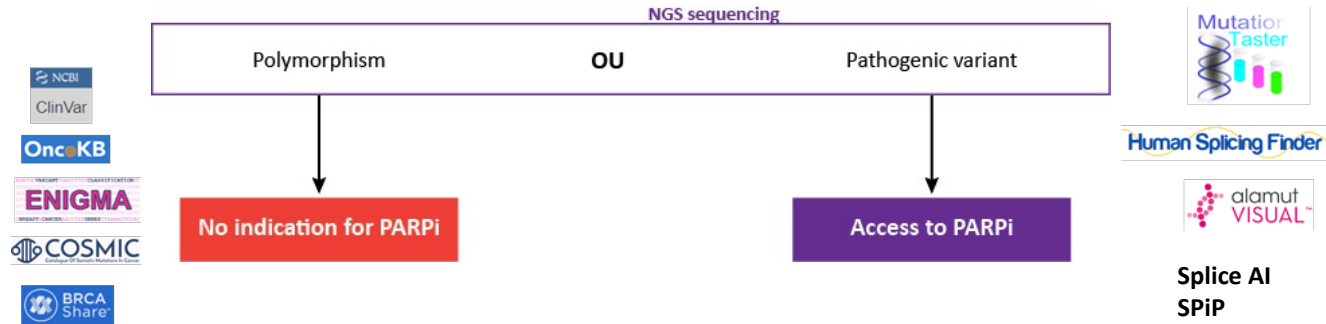
→ Détection des mutations *BRCA1* et *BRCA2* somatiques au laboratoire depuis 2016

# Problématique des variants non interprétés de *BRCA1/2*



**40% des variants *BRCA1/2* identifiés ne permettent pas de décision de prescription des inhibiteurs de PARP**

# Importance des variants de signification inconnue (VSI) de *BRCA1/2*



MAIS...variants non répertoriés ou d'interprétations conflictuelles (VSI)

15% constitutionnels

*BRCA1* = 2663 VSI et plus de 11 000 familles  
*BRCA2* = 4839 VSI et plus de 13 500 familles

**72166 variants**

**64 700 VSI**

**2537 bénins 4900 pathogènes**

*(BRCA exchange nov 2023)*

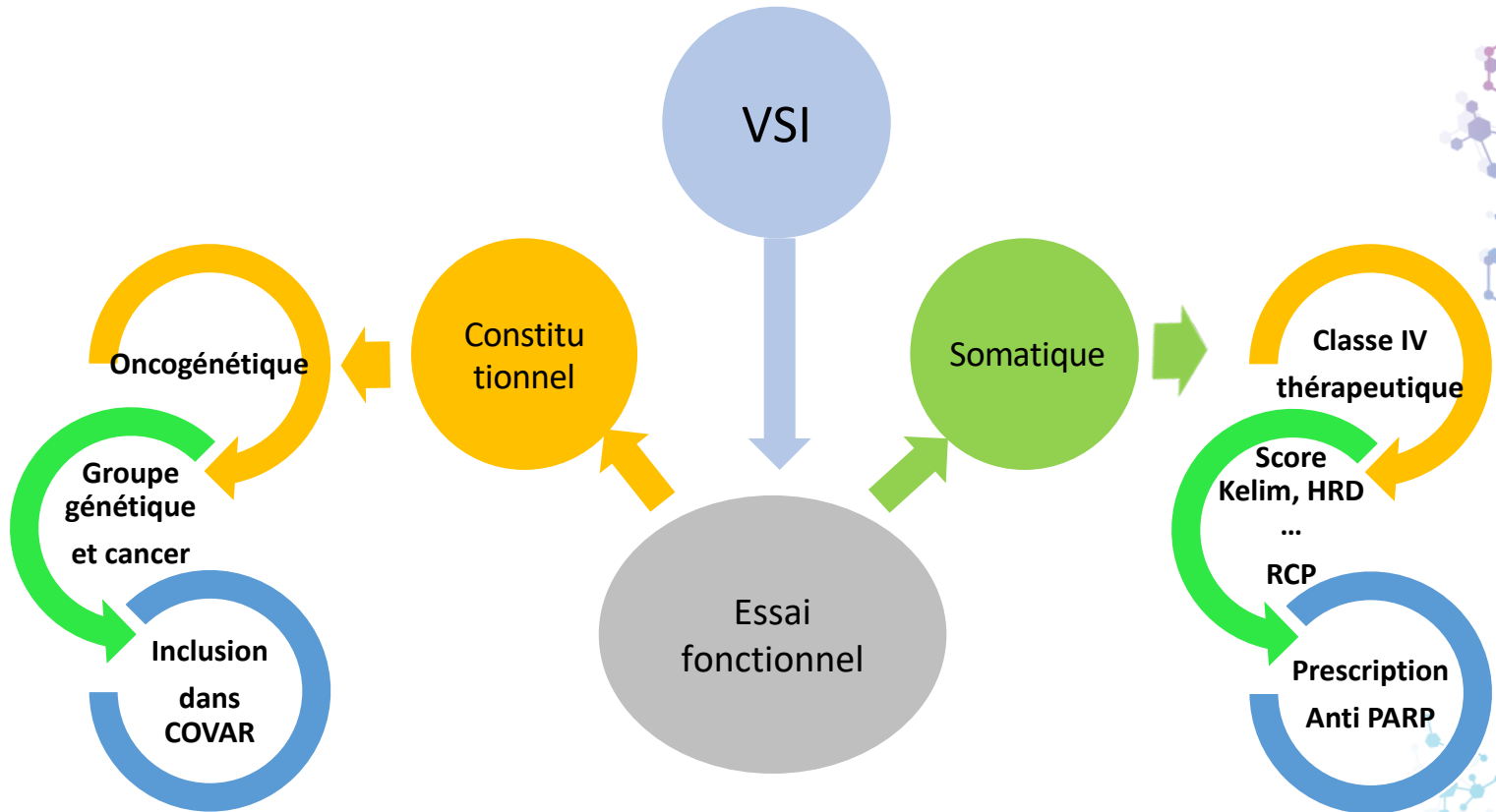
5-7% somatiques

Plus rares, absence d'historique familial  
Apparentés à des maladies orphelines

Actuellement : bases de données, prédictions bioinformatiques, conservation interespèces...

**Nécessité d'un test fonctionnel  
pré-thérapeutique dans un délai < 1 mois**

# Conséquence de l'interprétation des VSI *BRCA* sur la prise en charge





# Test fonctionnel et édition génomique CRISPR/CAS

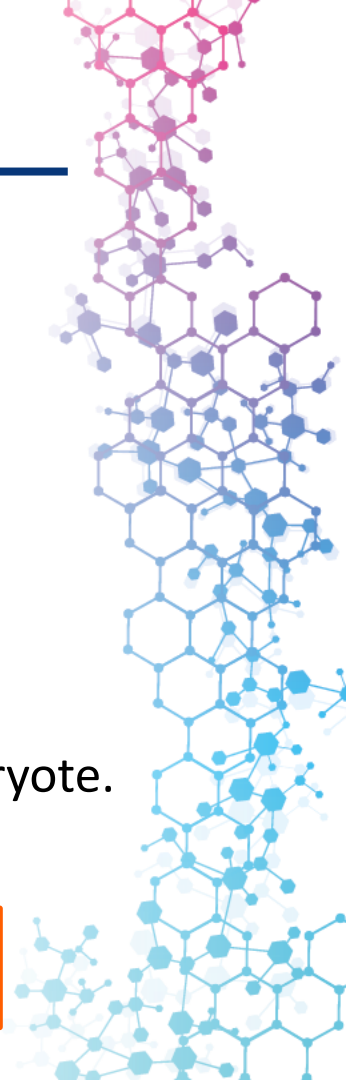


**J Doudna et E Charpentier**

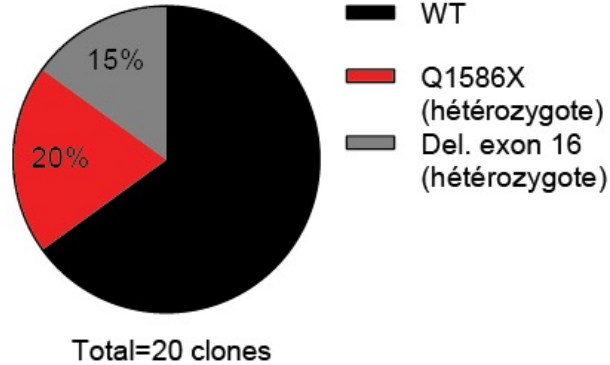
Découverte 2012 : il est possible de modifier rapidement un génome eucaryote en utilisant le système CRISPR de procaryote.

Nobel de chimie 2020

**Une opportunité de validation fonctionnelle des VSI**

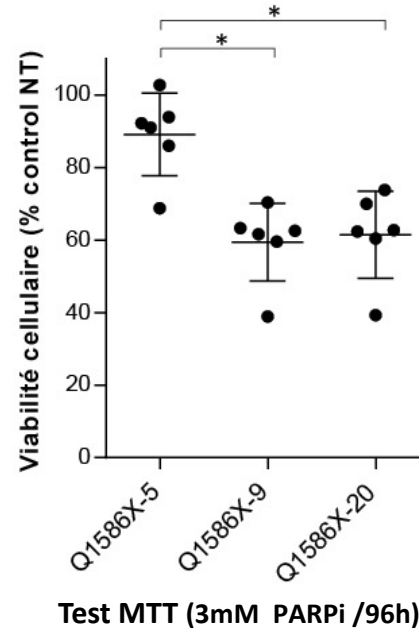


# Édition du variant *p.Glu1586X BRCA1* dans la lignée diploïde MCF10A



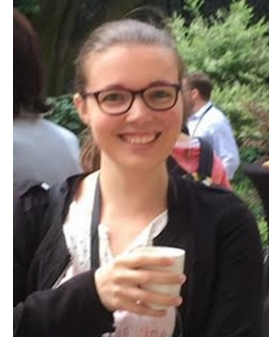
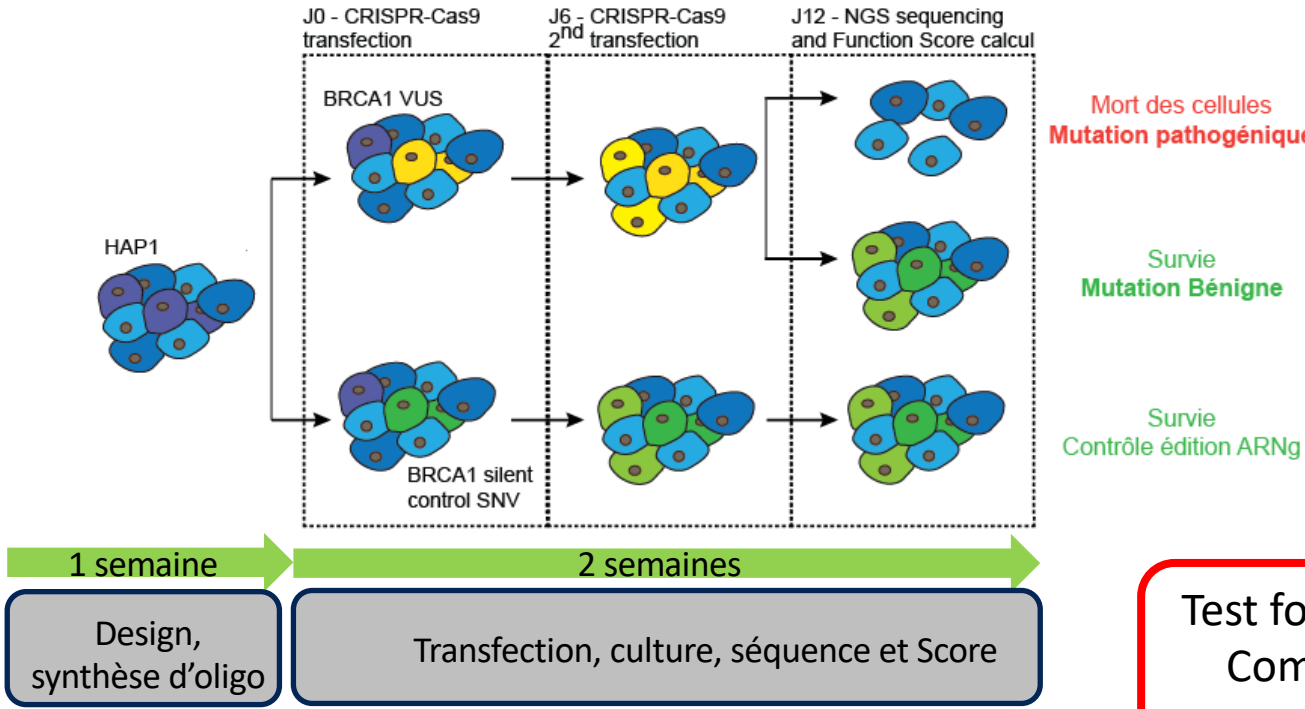
	Statut génomique	Description
MCF10A	WT BRCA1	Lignée parentale
Q1586X-5	WT BRCA1	Clones issus de l'édition de la mutation Q1586X
Q1586X-9	Q1586X hétérozygote	
Q1586X-20	Q1586X hétérozygote	

Pas d'homozygote – édition inattendue –  
Difficulté d'interprétation – Effet clonal –  
Délai > 2 mois



**Intérêt d'une lignée haploïde HAP1  
dont *BRCA* est essentiel**

# Mise en place d'un test fonctionnel dans la lignée haploïde HAP1

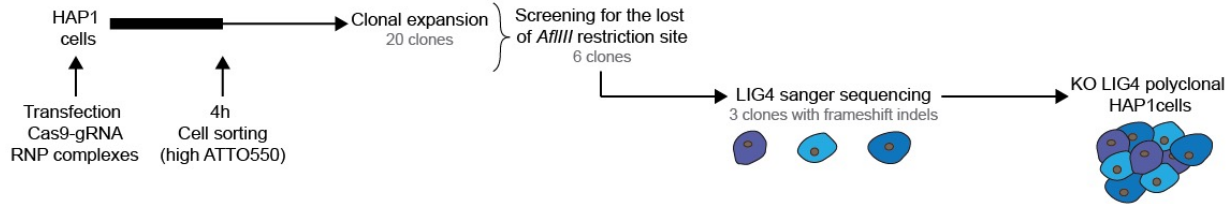


Amandine Billaud  
Thèse 2020

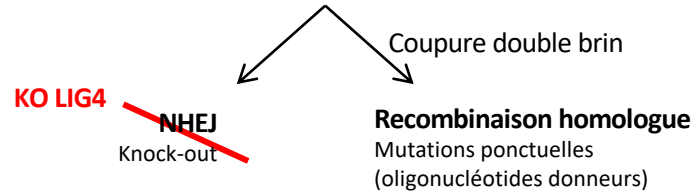
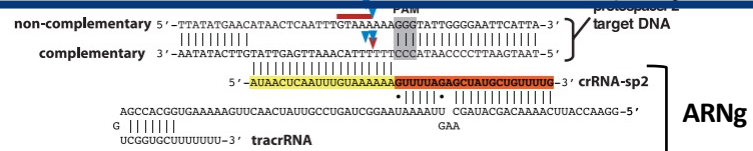
Test fonctionnel : 3 semaines  
Compatible avec la prise  
en charge des patients

# Optimisation des HAP1 pour la recombinaison homologue

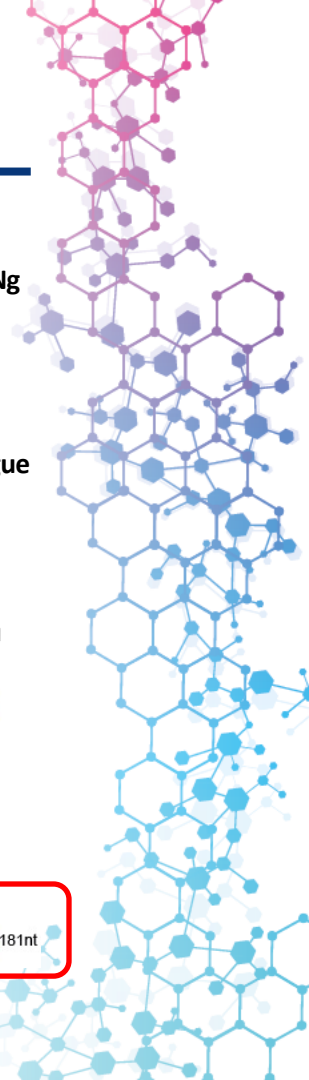
L'inactivation de LIG4 favorise la recombinaison homologue



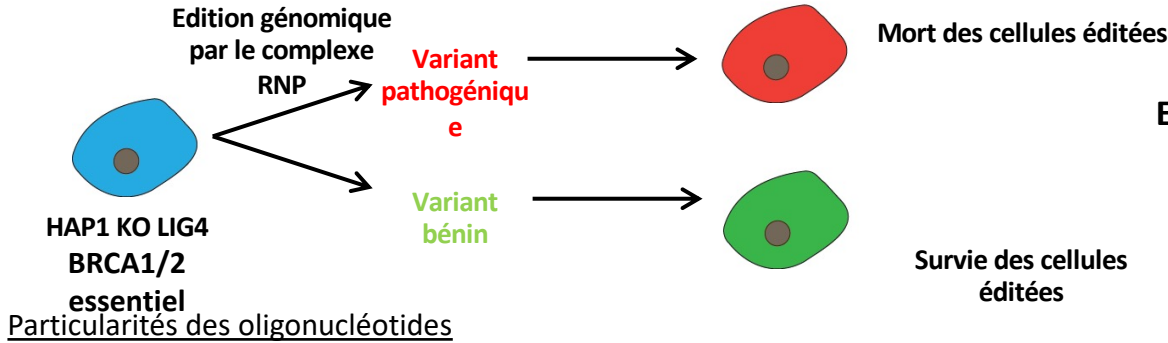
Obtention de HAP1 KO LIG4 polyclonale (5,8,17)



HAP1 cell line	ACACAGTACGTGCTCTGGGCCCTGGATTTTGTACTATATAACC
HAP-LIG4-1	ACACAGTACGTG-----ATATAACC -21nt
HAP-LIG4-18	ACACAGT-----CTGGGCCCTGGATTTTGTACTATATAACC -6nt
HAP-LIG4-2	ACACAGTACGTGCTCTGGGCCCTGGATTTTGTACTATATAACC -60nt
HAP-LIG4-17	ACACAGTACGTCTCTCTGGGCCCTGGATTTTGTACTATATAACC -1nt
HAP-LIG4-5	ACACAGTACGTGTTTCTCTGGGCCCTGGATTTTGTACTATATAACC +2nt
HAP-LIG4-8	ACACAGTACGTGAATACC[... ]CTGGGCCCTGGATTTTGTACTATATAACC +181nt

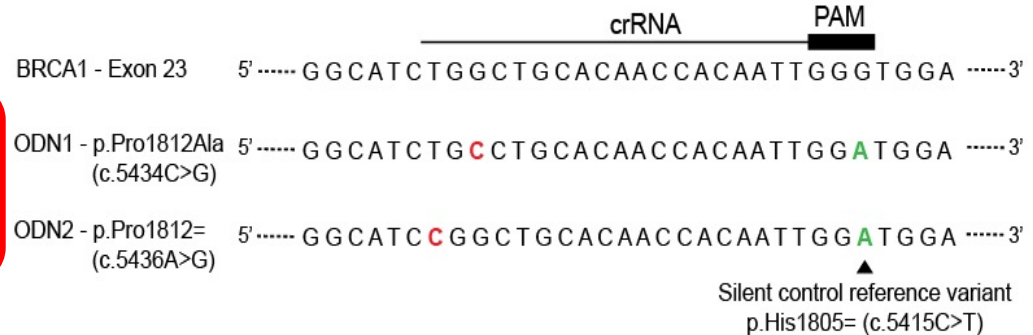


# Description des oligonucléotides donneurs (ODN)



ODN1 mutation gène et PAM silencieuse

ODN2 mutation silencieuse et PAM silencieuse



L'impact potentiel des mutations silencieuses évalué par Human Splice Finder, Codon usage database...

# Validation de la démarche expérimentale

## Édition de variants de *BRCA1/2* classés comme bénins ou pathogéniques

BRCA1 - Exon 23 5'.....GGCATCTGGCTGCACAACCACAATTGGGTGGA.....3'

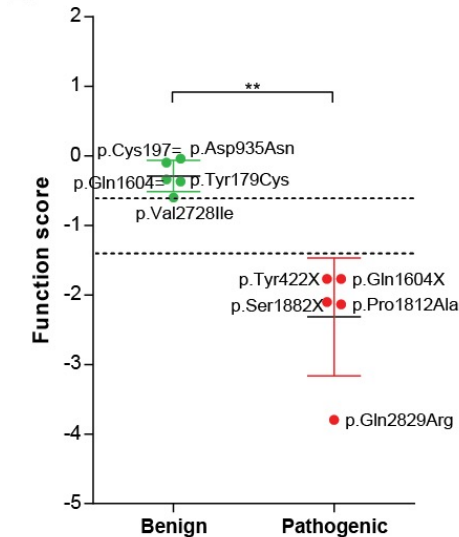
ODN1 - p.Pro1812Ala (c.5434C>G) 5'.....GGCATCTG**C**CTGCACAACCACAATTGG**A**TGGA.....3'

ODN2 - p.Pro1812= (c.5436A>G) 5'.....GGCAT**C**GGCTGCACAACCACAATTGG**A**TGGA.....3'

▲  
Silent control reference variant  
p.His1805= (c.5415C>T)

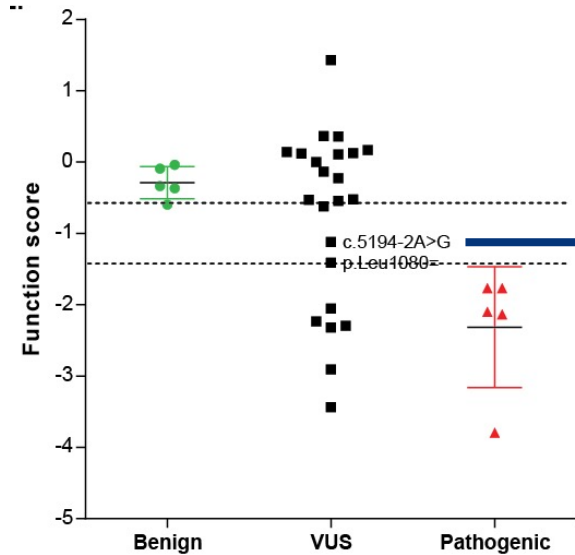
crRNA      PAM

Variants		Fréquences NGS (%)		Scores fonctionnels
		Mutation	Référence	
p.Pro1812Ala	Variant étudié	5.9	69.3	<b>-2.136</b> <b>Pathogénique</b>
	Mut. sil. ctrl	26.3	72.2	
p.Tyr179Cys	Variant étudié	23.7	10.9	<b>-0.369</b> <b>Bénigne</b>
	Mut. sil. ctrl	21.4	14.0	



**Rapport des séquences mutées et silencieuses**

# Caractérisation fonctionnelle de 23 VSI somatiques de *BRCA1/2*



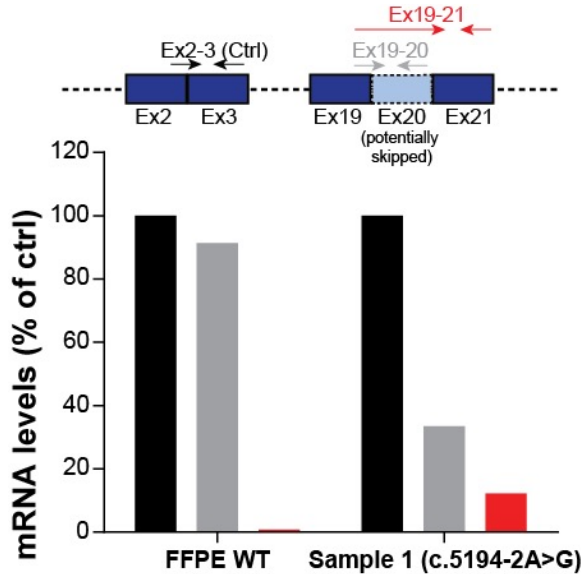
\*2 variants classés comme intermédiaires

Gene	Nucleotide change	Amino acid change	Exon	UMD database	Clinvar database	BRCA exchange	Function score	Reclassifié d'variants
BRCA1	c.92T>A	p.Ile31Asn	3				-0,624	
BRCA1	c.446A>C	p.Glu149Ala	3				0,361	
BRCA1	c.448A>G	p.Thr150Ala	8				-0,138	
BRCA1	c.572T>A	p.Val191Asp	8				-0,229	
BRCA1	c.630A>G	p.Gln210=	10				-2,055	*
BRCA1	c.872T>G	p.Leu291X	11				-2,298	*
BRCA1	c.1384G>A	p.Gly462Arg	11				-0,527	
BRCA1	c. 2935C>T	p.Arg979Cys	11				0,122	
BRCA1	c.3238T>C	p.Leu1080=	11				-1,415	*
BRCA1	c. 3601G>A	p.Gly1201Ser	11				0,138	
BRCA1	c.3748G>A	p.Glu1250Lys	11				0,117	
BRCA1	c.3823A>G	p.Ile1275Val	11				-0,531	
BRCA1	c.4181C>T	p.Thr1394Ile	12				1,430	
BRCA1	c.4516G>A	p.Asp1506Asn	15				-0,004	
BRCA1	c.4518T>G	p.Asp1506Glu	15				0,165	
BRCA1	c.4756G>T	p.Glu1586X	15				-2,3194	*
BRCA1	c.5194-2A>G		20				-1,123	*
BRCA1	c.5254G>A	p.Ala1752Thr	20				-2,909	
BRCA1	c.5254G>C	p.Ala1752Pro	20				-2,235	
BRCA1	c.5309G>T	p.Gly1770Val	21				-3,439	
BRCA2	c.652G>A	p.Glu218Lys	8				-0,546	
BRCA2	c.2803G>A	p.Asp935Asn	11				-0,042	
BRCA2	c.3539A>G	p.Lys1180Arg	11				0,104	

Green	Bénigne
Red	Pathogénique
Orange	Signification incertaine
Yellow	Non répertorié
Blue	Intermédiaire

\*Classe IV thérapeutique et conseil génétique si constitutionnel

# Classification intermédiaire de la mutation c.5194-2A>G



## Fonction

c.5194-2A>G	
Somatique	75.7%
Clinvar	Pathogénique
UMD database	Non répertorié
ARUP Utah database	Pathogénique
LOVD database	Pathogénique
ENIGMA database	Non répertorié

Pathogénique
Non répertorié


**Progression après 3 mois sous iPARP**  
**Corrélation entre score fonctionnel, niveau d'expression et sensibilité au traitement ?**



RESEARCH

Open Access

# Functional pre-therapeutic evaluation by genome editing of variants of uncertain significance of essential tumor suppressor genes


Amandine Billaud<sup>1,2</sup>, Louise-Marie Chevalier<sup>1,2</sup>, Paule Augereau<sup>2</sup>, Jean-Sebastien Frenel<sup>2,3</sup>, Christophe Passot<sup>2</sup>, Mario Campane<sup>2,3</sup> and Alain Morel<sup>1,2\*</sup> 

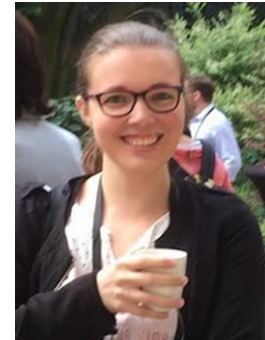
Molecular Diagnosis & Therapy

<https://doi.org/10.1007/s40291-020-00452-z>

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

## Somatic mRNA Analysis of *BRCA1* Splice Variants Provides a Direct Theranostic Impact on PARP Inhibitors

Louise-Marie Chevalier<sup>1,2</sup> · Amandine Billaud<sup>1,2</sup> · Sabrina Fronteau<sup>2</sup> · Jonathan Dauvé<sup>2</sup> · Anne Patsouris<sup>2</sup> · Véronique Verrièle<sup>2</sup> · Alain Morel<sup>1,2\*</sup> 

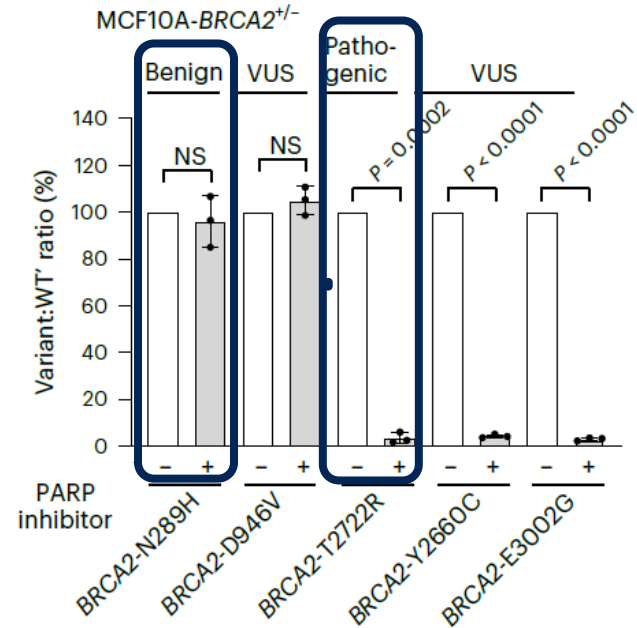
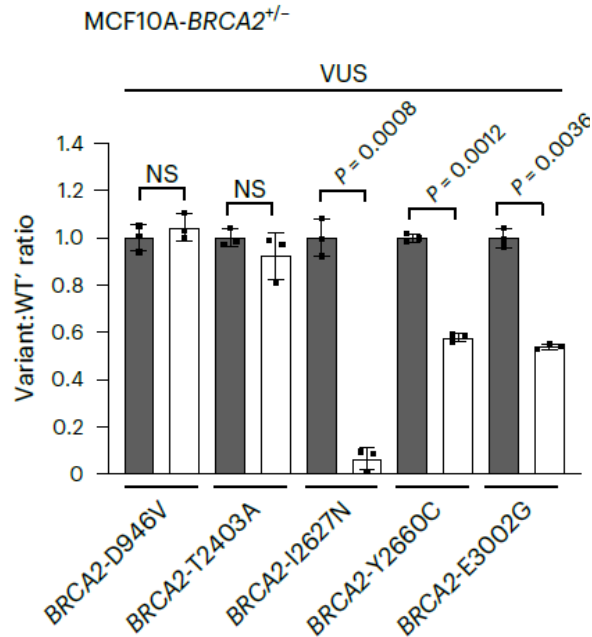


Amandine Billaud

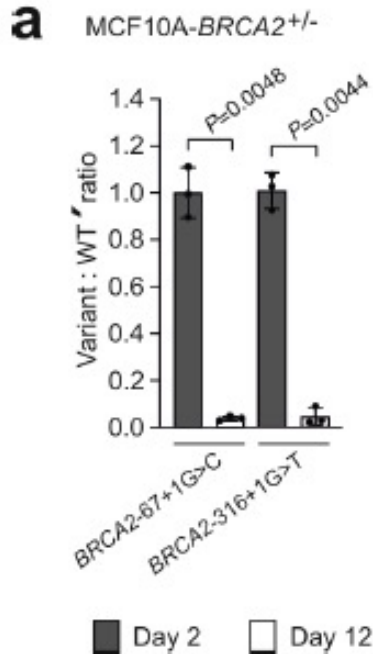


# Essai fonctionnel de VUS BRCA2 dans les cellules MCF10A-BRCA2+/-

Sur le même principe : ratio variant d'intérêt/variant synonyme



# Essai site d'épissage de BRCA2 dans les MCF10A-*BRCA2*<sup>+/-</sup>



**b**

*BRCA2*-67+1G>C cassette

```
.. AACAAAGCAGGTATTGACAA.. Genomic target site
.. AACAAAGCAGCTATTGACAA.. BRCA2-67+1G>C ssODN (variant-of-interest)
.. AACAAAGCAGGTATTGACAA.. BRCA2-K21KR ssODN
(synonymous internal control mutation)
```

Exon Splice site

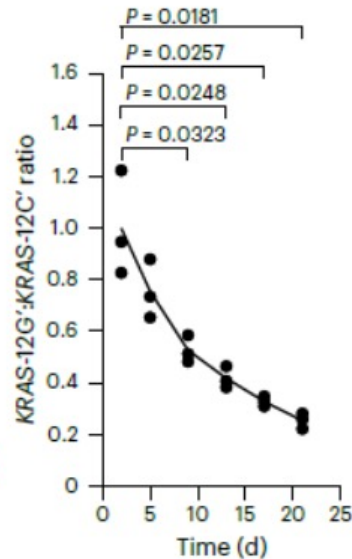
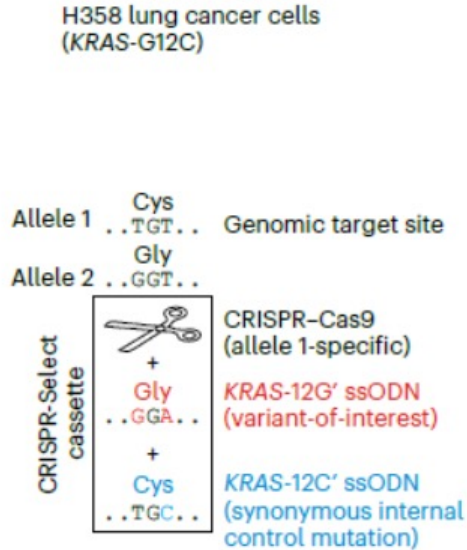
*BRCA2*-316+1G>T cassette

```
.. TTAGACTTAGGTAAGTAATG.. Genomic target site
.. TTAGACTTAGTTAAGTAATG.. BRCA2-67+1G>C ssODN (variant-of-interest)
.. TTAGACTTAGGTAAGTAATG.. BRCA2-N104NR ssODN
(synonymous internal control mutation)
```

Exon Splice site

Mutation silencieuse de référence dans l'exon

# Essai fonctionnel d'oncogènes ?



Essai des fonctions oncogéniques possible

nature genetics

Technical Report

<https://doi.org/10.1038/s41588-022-01224-7>

## Multiparametric and accurate functional analysis of genetic sequence variants using CRISPR-Select

Received: 1 December 2021

Yiyuan Niu<sup>1,3</sup>, Catarina A. Ferreira Azevedo<sup>1,3</sup>, Xin Li<sup>1,3</sup>, Elahe Kamali<sup>1,3</sup>,

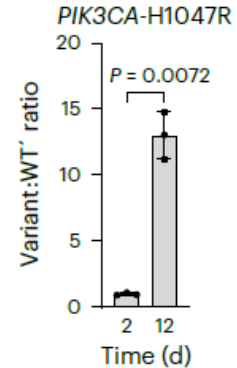
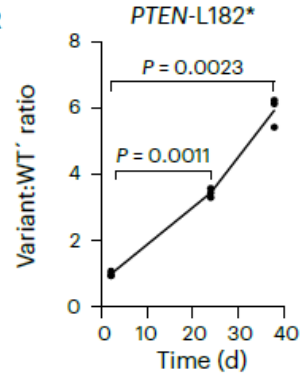
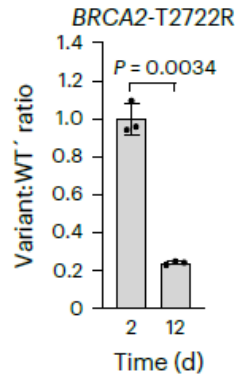
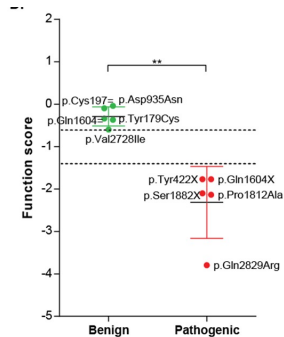
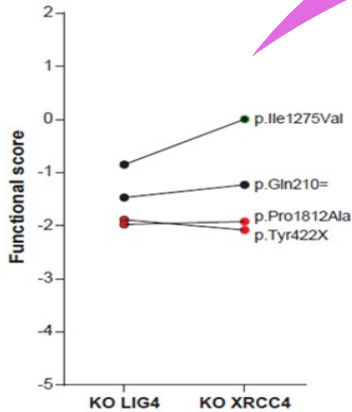
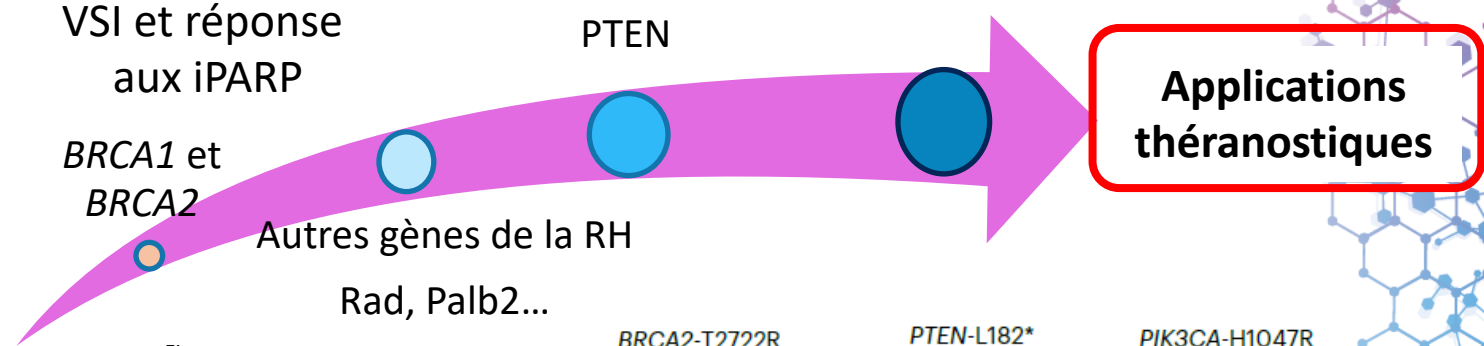
Accepted: 12 October 2022

Ole Haagen Nielsen<sup>2</sup>, Claus Storgaard Sørensen<sup>1,3</sup> & Morten Frødin<sup>1,3</sup> ✉

La perte de 12G' (sauvage) au profit de G12C' (driver) indique la dépendance de la prolifération et survie cellulaire au variant G12C'

# Perspectives

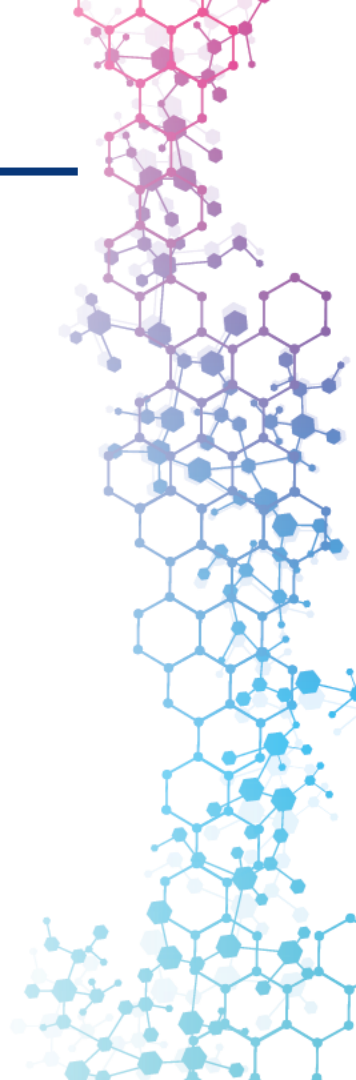
Oncogènes  
*PI3KCA, RAS, EGFR, BRAF...*



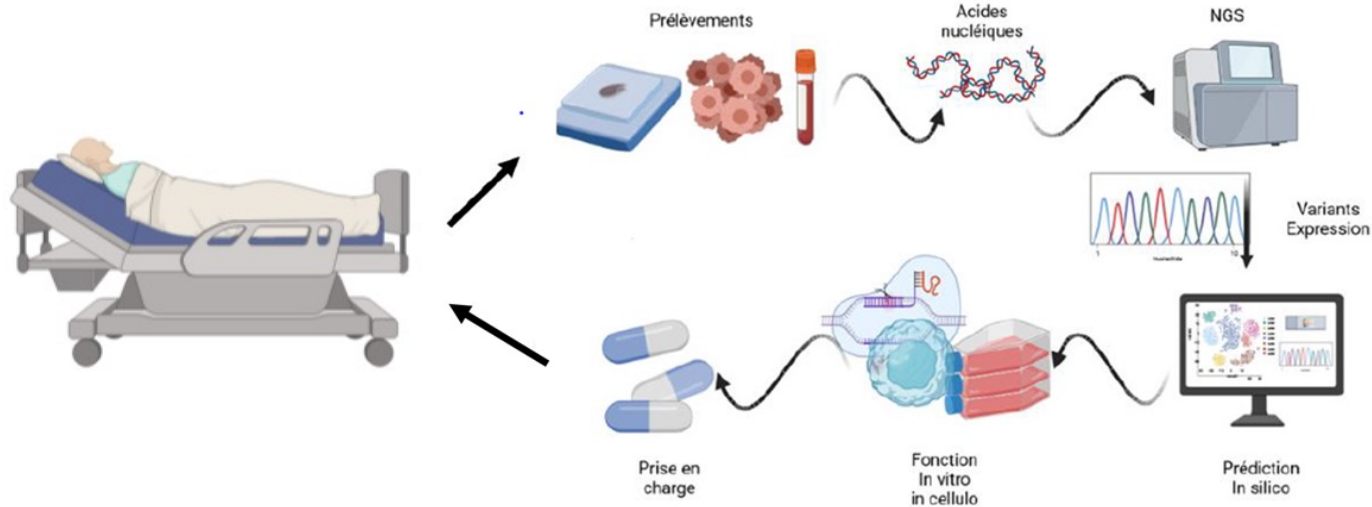
# Limites et solutions

---

- **CAS 9 dépend de la séquence PAM NGG proche de la mutation**
  - CAS 12 PAM TTT, base editing, SpRY, Cas 9 variant near PAMless....
- **Grande duplication/délétion**
  - Prime editing (fusion Reverse transcriptase CAS9)
- **Impact de la mutation synonyme de référence**
  - Codon usage database, Human Splice Finder, .....
- **Validation clinique**
  - Étude rétrospective/prospective
- **Financement**
  - RIHN 314 810€ ?



# Du patient au patient à l'ère post-génomique



- La production de données génomiques a cédé la place aux questionnements d'interprétation.
- La disposition et la diffusion d'un test versatile, cliniquement applicable devrait permettre de limiter l'errance thérapeutique.

# Remerciements



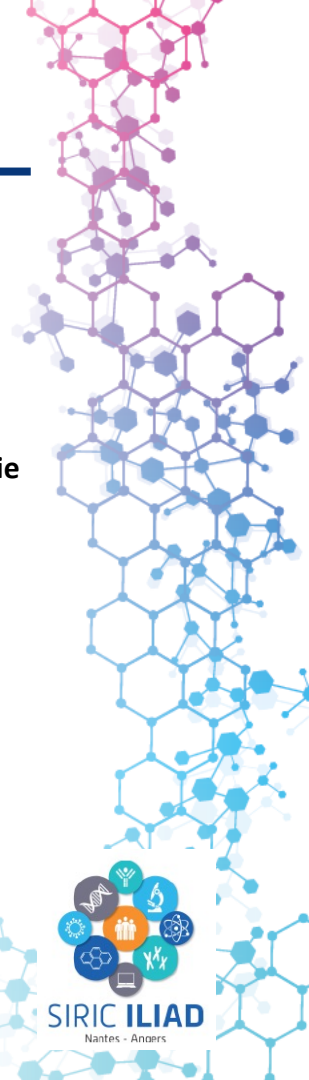
**INSERM UMR 1307 équipe 4**  
**Immunité innée et unité de**  
**génomique fonctionnelle ICO**

*Isabelle Tournier*  
*Luisa Vergori*  
*Marie Bléquin*  
*Vincent Milon*  
*Fida Khater*  
*Jonathan Dauvé*  
*Christophe Passot*  
*Louise-Marie Chevalier*  
*Elena Menand*  
*Yves Delneste*

**Plateforme de génétique moléculaire INCa**



*Amandine Billaud*  
postdoc Milan Italie





MERCI DE VOTRE ATTENTION



09h45-10h40 : Atelier - Rotation 1

*10h40-11h20 Pause*

11h20-12h15 : Atelier - Rotation 2



9<sup>e</sup> ÉDITION

# JOURNÉES DU GFCO 2023

Biomarqueurs et analyses moléculaires en oncologie

Avec la participation  
scientifique du

