

Qu'attendre de la biopsie liquide en immuno-oncologie thoracique en 2019 ?

What to expect from the liquid biopsy in thoracic immune oncology in 2019?

P. Hofman*

RÉSUMÉ

» La biopsie liquide (ou "test sanguin en oncologie") est à ce jour utilisée et validée en routine pour la détection des altérations génomiques de l'*EGFR* en oncologie thoracique. Des travaux de recherche translationnelle et des essais cliniques ont récemment montré que la détection de biomarqueurs circulants pouvait trouver une place de choix en immuno-oncologie. Ces biomarqueurs pourraient intervenir dans les étapes clés de la maladie, avant le traitement pour la prédiction de la réponse thérapeutique, d'une résistance primaire ou d'une toxicité, et dans le suivi évolutif, pour évaluer l'efficacité thérapeutique ou l'émergence de facteurs de résistance secondaire. Cependant, la place de ces biomarqueurs circulants en pratique quotidienne doit être encore démontrée dans le domaine de l'immuno-oncologie.

Mots-clés: Biopsie liquide – Immunothérapie – Charge tumorale mutationnelle – PD-L1 – ADN libre circulant.

SUMMARY

The liquid biopsy (or "blood testing in oncology") is now validated and used in routine clinical practice for the detection of EGFR genomic alterations in thoracic oncology. Translational research works and different clinical trials have recently demonstrated that detection of different circulating biomarkers could have a strong interest in immune oncology. These biomarkers could be involved at different key steps of the lung cancer disease : at baseline in order to predict the therapeutic response, a primary resistance mechanism or a toxic effect, and during the monitoring in order to look for treatment efficiency or to detect the onset of secondary resistance mechanism(s). However, the current usefulness of the detection of these circulating biomarkers needs to be demonstrated in daily practice of immune oncology to date.

Keywords: Liquid biopsy – Immunotherapy – Tumor mutational burden – PD-L1 – Free circulating DNA.

L'immunothérapie des cancers pulmonaires, en particulier des carcinomes bronchopulmonaires non à petites cellules est désormais administrée en première ligne de traitement dans les stades avancés ou métastatiques, sous réserve que la tumeur ne présente pas de cibles moléculaires activables par une thérapie ciblée (mutations de l'*EGFR* ou de *BRAF*, réarrangement d'*ALK* ou de *ROS1*), et qu'au moins 50 % des cellules tumorales expriment PD-L1. Toutefois, une majorité de tumeurs vont être réfractaires à ce traitement, soit d'emblée, soit après une période variable, alors que d'autres vont progresser de façon très rapide conduisant à une évolution fatale à très court terme. Récemment, des protocoles d'immunothérapie administrée en néoadjuvant ont fait l'objet d'essais cliniques, et leur efficacité est jugée sur l'absence de récurrence après l'intervention chirurgicale ou bien sur la régression des tumeurs de stade inopérable après radiochimiothérapie. La prédiction d'une réponse à l'immunothérapie en oncologie thoracique repose

aujourd'hui sur l'évaluation du pourcentage de cellules tumorales exprimant PD-L1 en immunohistochimie, seul biomarqueur validé et utilisable en pratique quotidienne. Il est maintenant certain que ce biomarqueur est imparfait, notamment du fait de son hétérogénéité d'expression, et il n'est pas adapté pour assurer le monitoring des patients sous traitement.

La biopsie liquide (BL) [ou "test sanguin en oncologie"] est désormais une approche validée en oncologie thoracique pour la détection des mutations de l'*EGFR* à partir de l'ADN libre circulant sous réserve de l'absence de matériel tissulaire accessible lors du diagnostic initial. Actuellement, la principale indication de la BL est la recherche de la mutation de résistance T790M de l'*EGFR* pour les patients dont la maladie progresse sous traitement par inhibiteurs de tyrosine kinase de première ou de deuxième génération (1, 2). D'autres indications pour réaliser une BL en oncologie thoracique sont actuellement discutées dans le cadre des thérapies ciblées et sont prometteuses, mais aucune d'entre elles

* Laboratoire de pathologie clinique et expérimentale et biobanque Côte d'Azur (BB-0 033-000 225), FHU OncoAge, Inserm U1 081/CNRS UMR 7284, université Côte d'Azur, Nice.

n'est validée pour être utilisée en routine (3-5). Dans le contexte de l'immunothérapie en oncologie thoracique, l'utilisation de la BL fait l'objet d'intenses recherches et de travaux de plus en plus nombreux. Même si les perspectives sont prometteuses, cette approche n'est pas encore employée en pratique quotidienne. Nous décrivons brièvement les principales orientations visant à recourir à la BL dans le contexte de l'immunothérapie en oncologie thoracique.

Apport des cellules tumorales circulantes

L'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales circulantes (CTC) peut être mise en évidence par différentes approches et techniques. Ainsi, les techniques de type CellSearch[®], reposant sur une capture par ferrofluides puis une reconnaissance par des anticorps anti-cellules épithéliales, ou bien de type ISET[®] basé sur une filtration sanguine et une sélection par la taille des cellules sanguines, puis sur une caractérisation morphologique, ont déjà été utilisées pour évaluer l'expression de PD-L1 à la surface des CTC (6, 7). L'intérêt de cette approche est théoriquement d'apprécier le statut PD-L1 chez un patient qui n'aurait pas eu de biopsie tissulaire. Une autre opportunité potentielle serait aussi d'évaluer "globalement" le statut PD-L1 d'un cancer, sachant que l'expression de PD-L1 est hétérogène dans les tissus et d'un site tumoral primitif ou métastatique à un autre. Ainsi, un patient dont la biopsie bronchique serait négative pourrait avoir des CTC exprimant PD-L1. Une autre utilisation serait aussi de suivre le statut PD-L1 sur les CTC lors du monitoring d'un patient sous traitement par immunothérapie et de contrôler la persistance, la disparition, voire l'apparition de PD-L1 au décours de ce traitement. Plusieurs questions sont à ce jour posées par ce type d'approche :

- ✓ sachant que le nombre de CTC est variable d'un patient à un autre et qu'il est relativement rare de pouvoir détecter au moins 100 CTC dans 10 ml de sang, l'établissement d'un seuil de positivité (notamment supérieur ou égal à 50 cellules positives) est difficile à établir;
- ✓ aucun essai thérapeutique n'a intégré à ce jour le nombre de CTC et leur positivité pour PD-L1 comme biomarqueur prédictif, et la validation multicentrique d'une telle étude sera nécessaire avant d'envisager une application pratique;
- ✓ des études d'harmonisation sur le clone PD-L1 à utiliser et des analyses comparatives avec l'expression tissulaire de PD-L1 sont à mettre en place de façon incontournable.

D'une façon générale, les approches visant à analyser les CTC sont très difficiles à transférer des travaux de recherche translationnelle à la mise en pratique dans le cadre de l'offre de soins. Cela tient à plusieurs raisons :

- ✓ la sensibilité et la spécificité des techniques utilisées et la reproductibilité variable des résultats;
- ✓ la difficulté de maîtriser la phase préanalytique selon l'organisation des centres de soins et le flux des échantillons sanguins. Hormis cela, l'absence de reconnaissance à la nomenclature des actes visant à mettre en évidence des CTC et de leur prise en charge financière ne permet pas actuellement d'envisager une application au quotidien à très court terme dans les hôpitaux.

Ainsi, si la détection et la caractérisation des CTC, notamment en évaluant leur nombre ainsi que l'expression de PD-L1, peuvent apporter des informations intéressantes dans le cadre de l'immunothérapie en oncologie thoracique, plusieurs écueils mettent à ce jour un frein à leur utilisation en routine. En fait, plus globalement, ces interrogations rejoignent celles concernant l'optimisation des techniques de détection et leur automatisation (8).

Apport de l'ADN libre plasmatique

La quantification et l'analyse de l'ADN libre circulant sont les pistes actuellement les plus explorées pour développer des biomarqueurs associés à l'immunothérapie en oncologie thoracique. Plusieurs axes sont envisagés et parmi ceux-ci l'analyse de la charge tumorale mutationnelle (*tumor mutational burden* [TMB]). La TMB tissulaire apparaît depuis plusieurs mois comme un biomarqueur prédictif prometteur d'une réponse à l'immunothérapie des cancers pulmonaires. Ce biomarqueur a été évalué dans plusieurs essais cliniques et se positionne comme étant indépendant de la valeur prédictive de PD-L1. Son utilisation dans la "vraie vie" pour les patients pris en charge dans les hôpitaux est freinée actuellement par certaines difficultés :

- ✓ le choix du panel de gènes à utiliser par les approches de type "next generation sequencing" (NGS) et le choix de la plateforme de séquençage à mettre en place. Afin de pallier des variabilités d'analyses et de résultats, des études d'harmonisation et de validation multicentrique ont été initiées récemment;
- ✓ quelle définition donner à une charge tumorale mutationnelle "élevée" et, donc, comment établir un seuil à partir duquel sera administrée une immunothérapie ?

En effet, selon la composition du panel des gènes analysés, le type de cancer et la molécule thérapeutique envi-

sagée, ce seuil peut ne pas être le même à considérer. L'analyse tissulaire de la TMB se heurte à 2 contraintes. L'une concerne la quantité d'ADN tumoral disponible selon la taille de la biopsie et le pourcentage de cellules tumorales. Ainsi, selon la plateforme technologique et le panel NGS utilisés, la quantité d'ADN nécessaire va varier de 15 ng à 100 ng, ce qui n'est pas toujours possible à obtenir à partir de biopsies bronchiques ou transthoraciques. La deuxième contrainte est liée à la qualité de l'ADN, celle-ci étant largement dépendante du temps de fixation par le formol dont la durée prolongée induit des phénomènes de déamination de l'ADN dont la conséquence est une augmentation artefactuelle de la TMB. Ainsi, une évaluation de la TMB sur l'ADN circulant a été envisagée comme pouvant être une alternative de cette analyse sur les tissus, d'autant plus que la répétition de cette approche peu invasive est relativement aisée, notamment en cas d'analyse initiale peu contributive ou surtout d'un monitoring sous traitement. De ce fait, certaines études récentes ont montré la bonne valeur prédictive d'une TMB sanguine élevée pour une réponse à l'immunothérapie des cancers pulmonaires (9). La TMB sanguine est toutefois difficile à mesurer à ce jour et peu d'équipes se sont encore lancées dans cette mise en place. Ces difficultés tiennent au panel NGS à utiliser, à la quantité (et à la qualité) d'ADN somatique extrait et à l'établissement et à la définition d'un seuil élevé selon la molécule thérapeutique à administrer (10-12).

La quantité globale de l'ADN somatique circulant avant traitement et le suivi de cette quantité au cours du traitement ont été montrés comme ayant une valeur pronostique dans le cadre des différents protocoles d'immunothérapie (13, 14). Ainsi, une chute rapide de cette quantité et le maintien d'une valeur basse d'ADN somatique circulant seraient corrélés à une bonne réponse thérapeutique. L'analyse étendue par NGS des altérations génomiques de l'ADN circulant s'avère aussi complémentaire dans ce contexte, en particulier pour la détection de mutations de résistance avant l'initiation du traitement (résistance innée) ou apparaissant au décours du traitement (résistance adaptative) [15].

Apport des autres composants sanguins

Les protéines plasmatiques

PD-L1 soluble

PD-L1 peut être détecté et quantifié au niveau du plasma ou du sérum. Des niveaux élevés de cette protéine ont été mis en évidence chez des patients atteints

de différentes tumeurs solides (16). Ce biomarqueur a été ainsi envisagé comme pouvant être un biomarqueur prédictif d'une réponse à l'immunothérapie et/ou être un biomarqueur permettant de suivre l'efficacité thérapeutique. Plusieurs difficultés apparaissent :

- ✓ Quel seuil envisager si l'on doit considérer et distinguer les patients bons répondeurs ou non répondeurs ?
- ✓ Comment s'assurer de la bonne sensibilité de la méthode de dosage réalisée ?
- ✓ Peut-on utiliser indifféremment du plasma ou du sérum pour ce dosage ?
- ✓ Un autre écueil est l'augmentation de PD-L1 dans le sang des patients atteints d'une maladie inflammatoire chronique ou d'une maladie infectieuse (en particulier la tuberculose) parfois concomitantes chez un patient atteint d'un cancer pulmonaire, et également la variabilité de la valeur de PD-L1 selon l'état physiologique du patient.

Autres protéines

Il a été montré que le niveau du taux d'IL-8 plasmatique et sa chute lors du traitement avait une valeur pronostique d'une réponse thérapeutique efficace (17). L'analyse d'autres protéines plasmatiques en particulier d'un panel de cytokines fait aussi l'objet de certains travaux chez les patients recevant une immunothérapie.

Les cellules immunitaires

L'analyse des cellules de l'immunité au niveau sanguin est actuellement une piste prometteuse non seulement pour envisager de développer un ou des biomarqueurs prédictifs de la réponse à une immunothérapie, mais aussi pour la mise en place de biomarqueurs de toxicité. Différentes cellules peuvent être analysées, les cellules myélosuppressives (*myeloid derived suppressor cells* [MDSC]), les cellules *natural killer*, les monocytes-macrophages et les lymphocytes. Au sein des lymphocytes, les sous-populations (c'est-à-dire CD8, CD4, CD28, etc.) et les ratios entre ces différentes sous-populations font actuellement l'objet d'études exploratoires. L'analyse du répertoire du récepteur des lymphocytes T (TCR) et les études sur la variabilité et la clonalité apportent des pistes nouvelles pour prédire et évaluer la réponse aux immunothérapies, mais aussi pour prédire certaines toxicités médicamenteuses (18, 19).

Les exosomes et les microARN

Les microARN plasmatiques (soit libres, soit combinés à d'autres structures biologiques au sein de microparticules circulantes) peuvent être utilisés comme des biomarqueurs diagnostiques, pronostiques et même prédictifs en oncologie. Aucune signature biologique

associant les microARN plasmatiques n'est toutefois proposée à ce jour en pratique quotidienne de l'oncologie. Ces signatures de microARN sont également étudiées dans le domaine de l'immunothérapie, mais les résultats sont à ce jour encore trop préliminaires pour envisager leur utilisation dans le cadre de l'offre de soins (20, 21).

Conclusion

La BL ouvre des perspectives à court et à moyen terme dans le cadre de l'immunothérapie. La TMB sanguine semble aujourd'hui se positionner comme pouvant être un biomarqueur prédictif de réponse et applicable en pratique quotidienne, compte tenu des résultats prometteurs affichés dans des essais cliniques récents. L'utilisation de ce biomarqueur reste soumise aux différentes contraintes énoncées plus haut. L'analyse

du répertoire TCR, réalisable notamment à partir de culots leucocytaires frais ou après congélation à basse température, semble être également une opportunité pour prédire la réponse et pour suivre l'efficacité thérapeutique (voir pour évaluer la toxicité médicamenteuse). Les autres biomarqueurs sanguins présentent aussi un certain intérêt, mais ils nécessitent également une grande maîtrise de la phase préanalytique, et des approches technologiques suffisamment sensibles et spécifiques avant d'envisager leur passage du secteur de la recherche translationnelle à celui de l'offre de soin. Il est nécessaire d'avoir une réflexion sur la vraie valeur ajoutée de réaliser des BL dans le champ de l'immunothérapie. Il faut concevoir aussi des tests biologiques automatisés, sensibles et spécifiques, robustes et reproductibles, ne nécessitant pas une technologie trop coûteuse et permettant d'obtenir des résultats dans des délais acceptables dans le cadre de la prise en charge thérapeutique des patients (3, 22). ■

P. Hoffman déclare ne pas avoir de liens d'intérêts en rapport avec cet article.

RÉFÉRENCES

1. Hofman V, Hofman P. Resistances to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer-how to routinely track them in a molecular pathology laboratory? *J Thorac Dis* 2019;11 (Suppl 1):S65-S70.
2. Rolfo C et al. Liquid biopsy for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): a statement paper from the IASLC. *J Thorac Oncol* 2018;13(9):1248-68.
3. Rossi G, Ignatiadis M. Promises and Pitfalls of Using Liquid Biopsy for Precision Medicine. *Cancer Res* 2019. doi: 10.1158/0008-5472.
4. Hofman P. ALK Status Assessment with Liquid Biopsies of Lung Cancer Patients. *Cancers (Basel)*. 2017 Aug 12;9(8):pii: E106. doi: 10.3390/cancers9080106.
5. Hofman P. Liquid Biopsy and Therapeutic Targets: Present and Future Issues in Thoracic Oncology. *Cancers (Basel)* 2017;9(11):pii: E154.
6. Mazel M et al. Frequent expression of PD-L1 on circulating breast cancer cells. *Mol Oncol* 2015;9(9):1773-82.
7. Ilić M et al. Detection of PD-L1 in circulating tumor cells and white blood cells from patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2018;29:193-9.
8. Hofman V et al. Circulating Tumor Cell Detection in Lung Cancer: But to What End? *Cancers (Basel)*. 2019 Feb 23;11(2). pii: E262. doi: 10.3390/cancers11020262.
9. Gandara DR et al. Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab. *Nat Med* 2018;24:1441-8.
10. Chae YK et al. Clinical Implications of Circulating Tumor DNA Tumor Mutational Burden (ctDNA TMB) in Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncologist*. 2019. pii: theoncologist.2018-0433. doi: 10.1634/theoncologist.
11. Fenizia F et al. Measuring tumor mutation burden in non-small cell lung cancer: tissue versus liquid biopsy. *Transl Lung Cancer Res* 2018;7:668-77.
12. Koepffel F et al. Whole exome sequencing for determination of tumor mutation load in liquid biopsy from advanced cancer patients. *PLoS One*;12(11):e0188174.
13. Cabel L et al. Circulating tumor DNA changes for early monitoring of anti-PD1 immunotherapy: a proof-of-concept study. *Ann Oncol* 2017;28:1996-2001.
14. Goldberg SB et al. Early Assessment of Lung Cancer Immunotherapy Response via Circulating Tumor DNA. *Clin Cancer Res* 2018;24:1872-80.
15. Yi X et al. The feasibility of using mutation detection in ctDNA to assess tumor dynamics. *Int J Cancer* 2017;140:2642-7.
16. Zhu X, Lang J. Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget* 2017;8:97671-82.
17. Sanmamed MF et al. Changes in serum interleukin-8 (IL-8) levels reflect and predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* 2017;28:1988-95.
18. Akyüz N et al. T-cell diversification reflects antigen selection in the blood of patients on immune checkpoint inhibition and may be exploited as liquid biopsy biomarker. *Int J Cancer* 2017;140:2535-44.
19. Liu YY et al. Characteristics and prognostic significance of profiling the peripheral blood T-cell receptor repertoire in patients with advanced lung cancer. *Int J Cancer*. 2019. doi: 10.1002/ijc.32145.
20. Boeri M et al. Circulating miRNAs and PD-L1 Tumor Expression Are Associated with Survival in Advanced NSCLC Patients Treated with Immunotherapy: a Prospective Study. *Clin Cancer Res* 2019;25:2166-73.
21. Halvorsen AR et al. Circulating microRNAs associated with prolonged overall survival in lung cancer patients treated with nivolumab. *Acta Oncol* 2018;57:1225-31.
22. Pennell NA et al. Biomarker Testing for Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Real-World Issues and Tough Choices. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2019;39:531-42.