

Les journées scientifiques de L'Institut Servier

19^e colloque 2019

**Les révolutions thérapeutiques en cancérologie :
comment les intégrer ?**

Les biopsies liquides

Marc Ychou

Institut du Cancer de Montpellier (ICM), Montpellier, France

Abstract

Les acides nucléiques libres circulants (ANlc) représentent l'un des domaines les plus passionnants de l'oncologie et l'un de ceux ayant évolué le plus rapidement au cours de ces dernières années. Les ADN/ARN libres circulants (ADNlc/ARNlc) sont des ADN/ARN extracellulaires retrouvés dans le sang. Leur étude, en particulier celle de l'ADNlc, aurait un grand potentiel, en particulier pour le dépistage et le pronostic du cancer et la surveillance de l'efficacité des traitements oncologiques. A la différence des biopsies tissulaires, l'ADNlc, en biopsie liquide, est obtenu à partir du sang, ce qui présente différents avantages. Premièrement, les échantillons plasmatiques sont compatibles avec l'analyse génétique. A partir de biopsies tissulaires celle-ci se heurte à des difficultés inhérentes le plus souvent aux produits de conservation qui peuvent endommager l'ADN. Au contraire, les conservateurs utilisés dans les échantillons sanguins ne modifient pas les méthodes d'analyse génétique actuelles. Un autre avantage réside dans la simplicité du recueil, en outre moins invasif qu'une résection chirurgicale ou une biopsie à l'aiguille ; le risque pour le patient en est diminué. Les échantillons sanguins peuvent être recueillis à tout moment pendant le traitement et le suivi, plus facilement que des biopsies tissulaires. Ils peuvent être prélevés régulièrement au cours des consultations de routine et ne nécessitent pas de personnel chirurgical entraîné ou d'équipement spécifique. Cela permet une surveillance dynamique des changements moléculaires de la tumeur au cours du traitement, au lieu d'un instantané au moment de l'instauration de celui-ci. Les biopsies liquides présentent également l'avantage de détecter l'hétérogénéité: elles informent sur toutes les parties de la tumeur du patient et sur des sites tumoraux multiples chez des patients ayant des métastases multiples. Ce tableau génétique plus large participe à une caractérisation plus complète du profil moléculaire, permettant une ligne directrice thérapeutique. Enfin, les échantillons sanguins contiennent des informations sur les métastases précoces alors que les biopsies tissulaires ne sont réalisées que sur des tumeurs ayant déjà été détectées par imagerie ou autre moyen. Les biopsies liquides informent sur une maladie résiduelle minime et des métastases qui n'auraient pas encore été détectées, les médecins pouvant alors identifier les patients nécessitant d'être traités. Dans le cancer colorectal, les analyses de mutations RAS et BRAF sur le tissu tumoral pourraient être remplacées par des analyses d'ADNlc, préalablement à l'instauration éventuelle d'un traitement par anticorps anti-EGFR (epidermal growth factor receptor), et pour la surveillance du traitement. Diverses données indiquent que l'ADNlc pourrait dans l'avenir évaluer une maladie résiduelle et aider à la prise de décision d'une chimiothérapie adjuvante après résection colorectale. Enfin, la biopsie liquide nous fait rêver à son utilisation dans le dépistage du cancer.

INTÉRÊT DE L'UTILISATION DE L'ADN TUMORAL CIRCULANT DANS LA STRATÉGIE DE PRISE EN CHARGE DU CANCER COLORECTAL

La biopsie liquide consiste à identifier des biomarqueurs tumoraux sur un prélèvement sanguin. Deux types d'approche, complémentaires, sont utilisés : les cellules tumorales circulantes et les acides nucléiques libres circulants (ANlc). Parmi ceux-ci, l'ADN circulant (ADNlc) est le principal objet du présent propos.

Dans le cancer colorectal, comme dans la prise en charge oncologique d'autres tumeurs, l'ADNlc approché par biopsie liquide présente de multiples intérêts et applications possibles :

- En termes de théranostique, il contribue à guider la sélection d'un traitement, notamment la prescription d'anticorps anti-EGFR (mutations de *RAS*) ;
- Pour le suivi de ce traitement, il permet par des prises de sang longitudinales d'observer et de gérer la résistance au traitement ;
- Il permet de surveiller les récurrences et de les détecter précocement ;
- Il permet d'identifier la maladie résiduelle minimale et de déterminer l'intérêt potentiel de traitements adjuvants ;
- Il présente un intérêt pronostique ;
- Il a également un rôle dans le dépistage et la détection très précoce des cancers.

INTÉRÊT THÉRANOSTIQUE

Une étude prospective multicentrique en aveugle (106 patients ayant un cancer colorectal métastatique) a comparé l'analyse des mutations de *KRAS* et *BRAF* observées par la méthode standard d'analyse des tissus tumoraux et par une biopsie liquide utilisant une méthode quantitative basée sur la PCR (*polymerase chain reaction*) spécifiquement conçue pour analyser l'ADNlc.^[1] L'analyse de l'ADNlc a montré une spécificité et une sensibilité de 100 % pour la mutation *BRAF* V600E, et une spécificité de 98 % et une sensibilité de 92 % avec une valeur de concordance de 96 % pour les sept mutations ponctuelles de *KRAS* testées.^[1]

Une deuxième étude clinique multicentrique (11 centres en France) prospective et en temps réel, des mêmes auteurs, a évalué en aveugle l'utilité clinique de cette biopsie liquide dans le cadre de la prise en charge thérapeutique conventionnelle du cancer colorectal métastatique.^[2] La concordance et les délais d'obtention des résultats de l'ADNlc analysé par PCR quantitative en temps réel par rapport à ceux de l'analyse standard des tissus tumoraux ont été étudiés chez 140 patients atteints de ce cancer.^[2] L'ensemble des mutations de *BRAF* et *KRAS* ont été étudiées. Un plus grand nombre de mutations étaient identifiées par l'analyse de l'ADNlc en biopsie liquide par rapport aux résultats des biopsies tissulaires ; le délai d'obtention moyen des résultats de l'analyse sur le tissu tumoral était de 16 jours *versus* 2 jours pour l'analyse de l'ADNlc.^[2] Ces résultats suggèrent que l'analyse de l'ADNlc pourrait remplacer celle des tissus tumoraux dans la pratique, et soulignent l'utilité clinique de cette analyse qui réduit considérablement le temps de traitement et d'utilisation des données.^[2] En termes de concordance, le design de l'étude n'incluant pas de seuil de détection minimal de mutation à la différence de l'étude précédente,^[1] cette sensibilité augmentée s'est traduite par davantage de discordances entre les mutations retrouvées sur l'ADNlc et celles retrouvées sur les biopsies tissulaires, notamment pour *KRAS* exon 2 et pour *BRAF*.^[2] Ce constat soulève la question du seuil adéquat et de l'identification du « responsable » de la résistance aux anti-EGFR.

La même approche se retrouve à la base de l'étude prospective multicentrique RASANC qui s'est intéressée à la concordance des résultats entre biopsies liquides par séquençage de nouvelle génération et biopsies tissulaires quant aux mutations *RAS*.^[3] Cet essai qui a inclus un échantillon important de patients atteints de cancer colorectal avec métastases hépatiques (n=425, 77,4 % avec ADNlc évaluable) a observé une excellente concordance des résultats de l'une et de l'autre technique pour la détermination du statut *RAS* chez ces patients, avec un coefficient κ de 0,89 et une précision de 94,8 %.^[3] Ce résultat confirme l'intérêt de la biopsie liquide dans la pratique et valide l'utilisation de cette technologie pour l'analyse en routine des mutations *RAS* dans le cancer colorectal.^[3] Cette étude a également cherché à identifier des facteurs cliniques susceptibles d'être

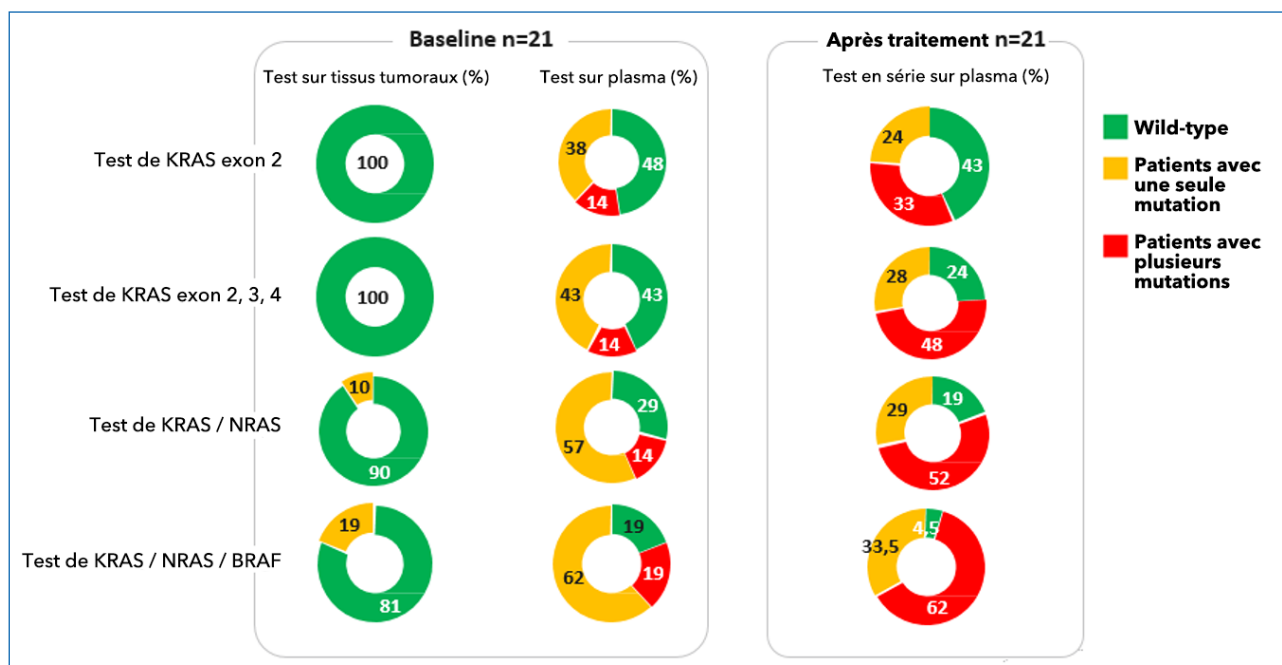
associés à l'efficacité de la détection des mutations *RAS* par l'ADNlc. Il a ainsi été observé que le taux de tests plasmatiques non conclusifs était plus important chez les patients avec carcinose péritonéale que chez ceux avec métastases hépatiques. L'absence de métastases hépatiques était le principal facteur clinique associé à des résultats non concluants d'ADNlc et inversement leur présence s'associait avec une très bonne sensibilité du test.^[3]

INTÉRÊT DES BIOPSIES LIQUIDES LONGITUDINALES DANS LE SUIVI DU TRAITEMENT

C'est grâce à la pratique des prélèvements sanguins de manière longitudinale qu'est détectée une évolution clonale des tumeurs sous traitement, facteur potentiel de résistance. Dans une étude rétrospective en aveugle, des prélèvements sanguins étaient pratiqués avant traitement, à 8 jours du second et du quatrième cycle de chimiothérapie, et en fin de traitement chez 46 patients atteints d'un cancer colorectal, devenus réfractaires au cétuximab ou au dasatinib en association avec la chimiothérapie par FOLFOX.^[4] L'étude de l'ADNlc dans les échantillons de plasma (79 échantillons différents au total) a montré que chez les 21 patients considérés *wild-type* en termes de *KRAS* exon 2 (*KRAS* non muté) au test sur tissus tumoraux, seuls 48 % l'étaient au test sur plasma avant traitement (**Figure 1**).^[5] Lorsqu'ont été multipliés les tests de mutation (*KRAS* exons 2, 3 et 4, *NRAS* ou *BRAF*), il est apparu des différences entre les résultats obtenus au niveau des tissus et ceux de l'ADNlc au cours du traitement, peu de patients restant *wild-type* à la fois sur *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* en fin de traitement par cétuximab (**Figure 1**).^[5] Chez les patients ayant eu plusieurs prélèvements sanguins au cours de leur traitement, le taux de mutation apparaît bas au départ, ne concernant qu'une seule mutation. Suite à une période de diminution ou de stabilité, de multiples nouvelles mutations se développent au cours du traitement, notamment par une pression sélective de celui-ci, révélant un modèle évolutif convergent.^[5]

Figure 1. Distribution du statut des mutations RAS / BRAF à partir de l'analyse de l'ADNlc avant et après traitement par anticorps anti-EGFR.^[5]

Traduit de la référence [5], *Clin Cancer Res*, 2017, 23, 4578-4591, Thierry et al, *Circulating DNA demonstrates convergent evolution and common resistance mechanisms during treatment of colorectal cancer*, avec permission de l'AACR.



Dans le cas du traitement par anti-EGFR du cancer colorectal métastatique, la conséquence stratégique serait le schéma suivant : dans un premier temps une absence de mutation ou un faible nombre de cellules mutées *RAS*, avec une sensibilité probable à un agent anti-EGFR, suivie au cours du traitement par la destruction de la majorité des cellules *RAS wild-type* et l'apparition d'un clone *RAS*-muté. Celui-ci devenant prépondérant pourrait être diminué par un traitement sans anti-EGFR donnant la possibilité de réintroduire ultérieurement un anti-EGFR.^[6]

Ce schéma est le principe que l'on retrouve à la base de l'étude italienne CRICKET de « rechallenge » (ou ré-administration).^[7] Cette étude a évalué de manière prospective, chez des patients avec cancer colorectal métastatique *RAS* et *BRAF wild-type*, sous chimiothérapie par FOLFOX, ayant reçu cétuximab + irinotécan en première ligne puis du bévacizumab en seconde ligne du fait d'une résistance au premier traitement, l'activité de cétuximab + irinotécan réintroduit en troisième ligne.^[7] Les auteurs ont analysé les données de l'ADNlc de manière translationnelle et observé de meilleurs résultats de PFS (*progression-free survival* ou survie sans progression) et de survie globale lors de la ré-administration du traitement chez les patients restés *wild-type* que chez ceux présentant des mutations.^[7]

Ces observations, à confirmer sur de plus grandes séries, suggèrent de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation d'un traitement par anticorps anti-EGFR à arrêter puis à réintroduire en fonction de l'évolution du statut *RAS* sous traitement, déterminé par biopsie liquide.

INTÉRÊT DANS LA DÉTECTION PRÉCOCE DES RÉCIDIVES ET DE LA MALADIE RÉSIDUELLE MINIME

La détection de la maladie résiduelle minime constitue l'une des applications les plus intéressantes de l'ADNlc. L'ADN porteur de mutations somatiques est hautement spécifique sur le plan tumoral et peut donc, en théorie, fournir des marqueurs optimaux. Cependant, par rapport au nombre de fragments normaux d'ADNlc, le nombre de fragments de gènes mutants circulants est faible, ce qui rend difficile leur détection et leur quantification avec une sensibilité suffisante pour une utilisation clinique significative.^[8] Dans l'étude de Diehl et al,^[8] une approche hautement sensible a été appliquée pour quantifier l'ADNlc chez 18 sujets (162 échantillons de plasma) sous thérapie multimodale pour cancer colorectal. Les auteurs rapportent une différence en termes de survie sans récurrence entre les sujets avec des niveaux d'ADNlc postopératoire détectables et les sujets dont les niveaux d'ADNlc postopératoire étaient indétectables ($P = 0,006$). Ces résultats suggèrent que les mesures d'ADNlc peuvent être utilisées pour surveiller de manière fiable l'évolution tumorale chez des sujets cancéreux subissant une chirurgie ou une chimiothérapie.^[8]

Une revue de Crowley et al^[9] s'est intéressée à l'utilisation clinique des mutations détectables par biopsie liquide après le diagnostic, dans l'évaluation du pronostic, et dans la détection précoce de la maladie résiduelle et de la récurrence. Les auteurs proposent l'étude de l'ADNlc et la surveillance des anomalies moléculaires spécifiques à la tumeur comme substitut aux biopsies traditionnelles dans une perspective de détection de signes de rechute précoce et de prédiction de la réponse aux traitements et du développement d'une résistance acquise.^[9]

Une grande étude australienne, menée sur une cohorte prospective de 230 patients (1046 échantillons de plasma) atteints d'un cancer du côlon de stade II résecté, a montré que la détection de l'ADNlc (test de séquençage postopératoire) pouvait identifier une maladie résiduelle minimale et prédire une récurrence.^[10] Les résultats de l'étude montrent que chez les patients non traités par chimiothérapie adjuvante, lorsque ce test en postopératoire était considéré négatif (ADNlc-négatif) le taux de récurrence était très faible (9,8 %) ; en revanche chez les 14 patients ayant encore un ADNlc-positif en postopératoire, le taux de survie était très faible, avec 79 % de ces patients ayant récidivé au cours d'un suivi médian de 27 mois.^[10] Un résultat similaire était retrouvé après résection des métastases hépatiques.^[10] Les auteurs en concluent que la détection de l'ADNlc après résection d'un cancer du côlon de stade II a la capacité d'identifier les patients les plus à risque de récurrence et contribue à la décision quant au traitement adjuvant.^[10]

Le même résultat a été retrouvé dans une étude américaine, utilisant une autre technologie en postopératoire avec un échantillon de 145 patients atteints d'un cancer colorectal stade II (n = 86) et stade III (n = 59).^[11] Les auteurs confirment que l'analyse de l'ADNlc peut détecter une maladie résiduelle minimale dans un délai court après la résection complète de la tumeur, et identifier avec précision les patients à haut risque de récurrence dans les cancers colorectaux de stade II et III. Ils suggèrent notamment que la détection de la maladie résiduelle minimale via le séquençage de l'ADNlc peut permettre la personnalisation des stratégies de traitement adjuvant, notamment éviter une chimiothérapie à des patients qui ne la nécessitent pas.^[11]

INTÉRÊT PRONOSTIQUE

L'analyse de l'ADNlc s'entend en termes qualitatifs sur le type de mutations, et en termes quantitatifs, le taux d'ADNlc total étant clairement corrélé au volume tumoral. Manifestement ce taux peut constituer un index pronostique, notamment chez les patients métastatiques.

Les données d'une étude de Messaoudi et al,^[12] évaluant la survie globale chez 97 patients atteints de cancer colorectal métastatique, fournissent les premières preuves qualitatives et quantitatives en faveur de l'analyse multiparamétrique de l'ADNlc pour l'évaluation pronostique des patients. Dans le cadre de cette étude les principales mutations *KRAS* exon2 et *BRAF* V600E (paramètres qualitatifs) étaient déterminées ainsi que, simultanément et en une seule fois par PCR quantitative multimarqueurs, la concentration totale d'ADNlc, celle d'ADNlc mutant, la proportion d'ADNlc mutant et l'indice d'intégrité de l'ADNlc (paramètres quantitatifs).^[12] Les patients présentant des niveaux élevés d'ADNlc ont montré une survie globale significativement plus courte que ceux présentant de faibles taux (18,07 mois versus 28,5 mois, $P < 0,0087$). De plus, une analyse multivariée a révélé qu'un niveau élevé d'ADNlc est un facteur pronostique indépendant ($P < 0,034$).^[12]

L'étude PLACOL fait le même constat. Les auteurs ont observé une médiane de survie très différente selon les taux d'ADNlc.^[13] Les patients ayant une concentration d'ADNlc élevée (> 10 ng/mL) avant le premier cycle de chimiothérapie avaient une survie globale plus courte que ceux ayant une concentration faible ($\leq 0,1$ ng/mL) : 6,8 vs 33,4 mois ($P < 0,0001$).^[13] Ces résultats indiquent clairement une relation entre le volume tumoral, l'extension tumorale et le taux d'ADNlc.

L'étude prospective de phase II PRODIGE-14 a testé l'intensification de la chimiothérapie pour réséquer des métastases hépatiques non résécables initialement.^[14] Cet essai a notamment étudié la validité clinique de la détection des cellules tumorales circulantes (CTC) par Cellsearch[®] et des mutations *KRAS* sur l'ADNlc, évaluées par biopsie liquide PCR, à l'inclusion, après 4 semaines de traitement et avant résection des métastases hépatiques chez 153 patients avec cancer colorectal métastatique.^[14] Chez les patients ayant un taux de mutations *KRAS* non détectées avant chirurgie, le taux de résection R0/R1 était beaucoup plus important par rapport à ceux ayant un taux d'ADNlc muté détecté avant chirurgie (85 % versus 15 %) ; 64% de ces derniers ne pouvaient pas subir de résection de leurs métastases hépatiques.^[14] L'évolution du taux d'ADNlc se présente donc comme un indicateur à prendre en compte dans la décision de chirurgie résectrice des métastases.

INTÉRÊT POTENTIEL DANS LE DÉPISTAGE DU CANCER

L'intérêt de l'ADNlc et de l'ensemble des techniques développées autour de ce paramètre réside essentiellement dans leur rôle potentiel dans le dépistage du cancer.

Moulière et al^[15] ont observé des degrés différents de taux d'ADNlc entre des patients avec cancer colorectal à tous les stades et des sujets sains. Pour l'approche de l'ADNlc, cette étude a utilisé une méthode multi-marqueurs (Intplex[®]) qui permet une analyse non invasive sensible et spécifique de l'ADNlc tumoral.^[15]

Les auteurs soulignent le fait que cet outil pourrait aisément être introduit dans les procédures des laboratoires de cancérologie,^[15] présentant ainsi un potentiel intéressant dans la perspective d'une médecine personnalisée dans le dépistage et la prise en charge du cancer colorectal.

Diverses autres études s'intéressent à l'utilisation de ces méthodes pour le dépistage et des résultats sont attendus.

RÉFÉRENCES (Les références soulignées renvoient aux abstracts correspondants sur PubMed)

- [1] [Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. Nat Med 2014; 20:430-435.](#)
 - [2] [Thierry AR, El Messaoudi S, Mollevi C, Raoul JL, Guimbaud R, Pezet D, et al. Clinical utility of circulating DNA analysis for rapid detection of actionable mutations to select metastatic colorectal patients for anti-EGFR treatment. Ann Oncol 2017; 28:2149-2159.](#)
 - [3] [Bachet JB, Bouché O, Taieb J, Dubreuil O, Garcia ML, Meurisse A, et al. RAS mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: the AGEO RASANC prospective multicenter study. Ann Oncol 2018; 29:1211-1219.](#)
 - [4] [Parseghian CM, Parikh NU, Wu JY, Jiang ZQ, Henderson L, Tian F, et al. Dual inhibition of EGFR and c-Src by Cetuximab and Dasatinib combined with FOLFOX chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. Clin Cancer Res 2017; 23:4146-4154.](#)
 - [5] [Thierry AR, Pastor B, Jiang ZQ, Katsiampoura AD, Parseghian C, Loree JM, et al. Circulating DNA demonstrates convergent evolution and common resistance mechanisms during treatment of colorectal cancer. Clin Cancer Res 2017; 23:4578-4591.](#)
 - [6] [Goldberg RM, Montagut C, Wainberg ZA, Ronga P, Audhuy F, Taieb J, et al. Optimising the use of cetuximab in the continuum of care for patients with metastatic colorectal cancer. ESMO Open 2018; 3\(4\):e000353.](#)
 - [7] [Cremolini C, Rossini D, Dell'Aquila E, et al. Rechallenge for patients with RAS and BRAF wild-type metastatic colorectal cancer with acquired resistance to first-line Cetuximab and Irinotecan. A Phase 2 single-arm clinical trial. JAMA Oncol 2019; 5:343-350.](#)
 - [8] [Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. Nat Med 2008; 14:985-90.](#)
 - [9] [Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: Monitoring cancer-genetics in the blood. Nat Rev Clin Oncol 2013; 10:472-84.](#)
 - [10] [Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. Sci Transl Med 2016; 8:346ra92.](#)
 - [11] [Diehn M, Alizadeh AA, Adams H-P, Lee JJ, Klassen S, Palma JF, et al. Early prediction of clinical outcomes in resected stage II and III colorectal cancer \(CRC\) through deep sequencing of circulating tumor DNA \(ctDNA\). J Clin Oncol 2017; 35:3591.](#)
 - [12] [El Messaoudi S, Mouliere F, Du Manoir S, Bascoul-Mollevi C, Gillet B, Nouaille M, et al. Circulating DNA as a strong multimarker prognostic tool for metastatic colorectal cancer patient management care. Clin Cancer Res 2016; 22:3067-3077.](#)
 - [13] [Garlan F, Laurent-Puig P, Sefrioui D, Siauve N, Didelot A, Sarafan-Vasseur N, et al. Early Evaluation of Circulating Tumor DNA as Marker of Therapeutic Efficacy in Metastatic Colorectal Cancer Patients \(PLACOL Study\). Clin Cancer Res 2017; 23:5416-5425.](#)
 - [14] [Bidard FC, Kiavue N, Ychou M, Cabel L, Stern MH, Madic J, et al. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA Detection in Potentially Resectable Metastatic Colorectal Cancer: A Prospective Ancillary Study to the Unicancer Prodige-14 Trial. Cells 2019; 8\(6\). pii: E516.](#)
 - [15] [Mouliere F, El Messaoudi S, Pang D, Dritschilo A, Thierry AR. Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. Mol Oncol 2014; 8:927-941.](#)
-