



HAL
open science

Utilisation clinique et évolution des biomarqueurs circulants à l'ère de l'oncologie personnalisée : des marqueurs protéiques aux scores clinicobiologiques

Alexandre Perrier, Pierre Hainaut, Alexandre Guenoun, Dinh-Phong Nguyen, Pierre-Jean Lamy, Fabrice Guerber, Frédéric Troalen, Jérôme Alexandre Denis, Mathieu Boissan

► To cite this version:

Alexandre Perrier, Pierre Hainaut, Alexandre Guenoun, Dinh-Phong Nguyen, Pierre-Jean Lamy, et al.. Utilisation clinique et évolution des biomarqueurs circulants à l'ère de l'oncologie personnalisée : des marqueurs protéiques aux scores clinicobiologiques. Bulletin du Cancer, 2022, 10.1016/j.bulcan.2021.11.010 . hal-03534190

HAL Id: hal-03534190

<https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-03534190v1>

Submitted on 19 Jan 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

En marche vers une oncologie personnalisée : l'apport des techniques génomiques et de l'intelligence artificielle dans l'usage des biomarqueurs tumoraux circulants

Alexandre Perrier¹, Pierre Hainaut², Alexandre Guenoun³, Dinh-Phong Nguyen³, Pierre-Jean Lamy^{4,5}, Fabrice Guerber⁶, Frédéric Troalen⁷, Jérôme Alexandre Denis⁸, Mathieu Boissan⁹

Reçu le 10 août 2021

Accepté le 17 décembre 2021

Disponible sur internet le :

1. Sorbonne Université, AP-HP, Département de Génétique, Hôpital Universitaire Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France
2. Institut pour l'Avancée des Biosciences, Inserm 1209 CNRS UMR 5309, Université Grenoble-Alpes et Centre Hospitalier Universitaire Grenoble-Alpes, 38700 La Tronche, France
3. KIRO, Marseille, France
4. Institut d'Analyse Génomique Imagenome, Biopathologie et Génétique des Cancers, Groupe Inovie, 34000 Montpellier, France
5. Clinique BeauSoleil, Languedoc Mutualité, Unité de Recherche Clinique, 34000 Montpellier, France
6. Laboratoire Oriade-Noviale-Biogroup, 38300 Bourgoin-Jallieu, France
7. Université Paris-Saclay, Département de Biologie et de Pathologie cliniques, Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France
8. Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Pitié-Salpêtrière-Charles Foix, Laboratoire de Biochimie Endocrinienne et Oncologique, Oncobiologie Cellulaire et Moléculaire, 75013 Paris, France
9. Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, AP-HP, Hôpital Tenon, Laboratoire de Biochimie et Hormonologie, 75020 Paris, France

Correspondance :

Mathieu Boissan, Sorbonne Université, Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, 75012 Paris, France.
mathieu.boissan@inserm.fr

Mots clés

Marqueurs tumoraux
Biopsie liquide
Scores clinico-biologiques
Intelligence artificielle
Valeur théranostique

■ Résumé

Les progrès technologiques, en particulier le développement du séquençage à haut débit, ont conduit à l'émergence d'une nouvelle génération de biomarqueurs tumoraux moléculaires. Ces nouveaux outils ont profondément modifié la prise en charge thérapeutique en oncologie avec une caractérisation moléculaire de plus en plus précise des tumeurs amenant à un ciblage thérapeutique personnalisé. La détection des cellules tumorales circulantes et/ou de l'ADN tumoral circulant dans des prélèvements sanguins, encore appelés « biopsies liquides », peut

DOI de l'article original :

<https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2021.11.010>

désormais fournir un instantané du profil génétique de la tumeur du patient grâce à une procédure alternative et moins invasive qu'une biopsie du tissu tumoral lui-même. Cette méthode de caractérisation moléculaire et de suivi de la maladie en temps réel facilite la recherche d'éventuelles rechutes, de l'émergence de résistances ou d'une nouvelle cible thérapeutique. À long terme, les biopsies liquides pourraient également fournir un moyen de détection précoce du cancer. Ces nouvelles approches nécessitent le traitement d'une quantité, toujours croissante, de données, en particulier cliniques, notamment dans l'optique d'élaborer des scores clinico-biologiques composites. L'utilisation de l'intelligence artificielle est un outil d'avenir dans ce domaine, mais elle soulève des questions éthiques et des implications pour l'organisation du système de santé qui devront être abordées.

Keywords

Tumor markers
Liquid biopsy
Clinicobiological scores
Artificial intelligence
Theranostic value

■ Summary

Moving towards a personalized oncology: The contribution of genomic techniques and artificial intelligence in the use of circulating tumor biomarkers

Technological advances, in particular the development of high-throughput sequencing, have led to the emergence of a new generation of molecular biomarkers for tumors. These new tools have profoundly changed therapeutic management in oncology, with increasingly precise molecular characterization of tumors leading to increasingly personalized therapeutic targeting. Detection of circulating tumor cells and/or circulating tumor DNA in blood samples –so-called 'liquid biopsies'– can now provide a genetic snapshot of the patient's tumor through an alternative and less invasive procedure than biopsy of the tumor tissue itself. This procedure for characterizing and monitoring the disease in real time facilitates the search for possible relapses, the emergence of resistance, or emergence of a new therapeutic target. In the long term, it might also provide a means of early detection of cancer. These new approaches require the treatment of ever-increasing amounts of clinical data, notably, with the goal of calculating composite clinical-biological predictive scores. The use of artificial intelligence will be unavoidable in this domain, but it raises ethical questions and implications for the health-care system that will have to be addressed.

Introduction

Le cancer est une maladie multifactorielle du génome, très hétérogène, et dont les caractéristiques sont propres à chaque type et sous-type de tumeur. Les dernières décennies de recherche en oncologie ont permis de rentrer dans l'ère moderne des sous-populations de cancers de plus en plus spécifiques et dont le profil génétique est défini. En effet, à ce jour, il existe plus de 200 types et sous-types de cancers différents qui varient considérablement sur le plan moléculaire. Grâce aux investissements massifs réalisés dans la recherche en génomique et aux avancées technologiques spectaculaires de cette dernière décennie comme le séquençage à haut débit, les anomalies moléculaires, à l'origine de nombreuses tumeurs, ont été identifiées et peuvent être désormais utilisées en clinique comme biomarqueurs. Ces nouveaux outils ont remis en cause le dogme du traitement identique à l'ensemble des patients atteints d'un cancer pour une localisation donnée. Aujourd'hui, dans un contexte de médecine de précision, ces marqueurs peuvent avoir une valeur diagnostique et pronostique mais ils sont surtout utiles pour leur

contribution théranostique qui permet d'adapter les thérapeutiques sur les bases d'un rationnel moléculaire depuis l'initiation d'un traitement et pendant toute la prise en charge.

Plusieurs actions ont été mises en place pour soutenir les principes de la médecine de précision : en France, dès le troisième Plan Cancer, suivi de la publication du décret n° 2021-119 du 4 février 2021 précisant la stratégie décennale de lutte contre les cancers (2021–2030), en Europe, avec le programme de recherche et d'innovation Horizon 2020, et aux États-Unis, avec la mise en place de la médecine de précision. L'ensemble de ces dispositifs devraient permettre un accès plus large en clinique à la révolution que représentent les biopsies liquides.

L'émergence d'une nouvelle génération de biomarqueurs circulants tumoraux

L'ADN tumoral circulant, les cellules tumorales circulantes, les micro-ARNs circulants... sont la source de nombreux biomarqueurs tumoraux qui ont émergé ces dernières années et se

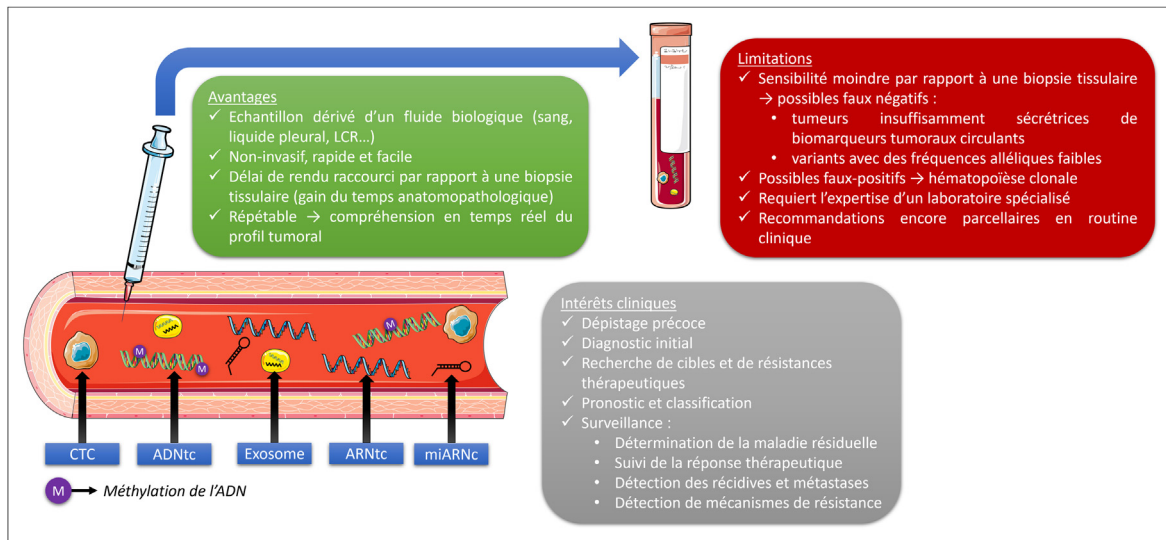


FIGURE 1

Principe, intérêts et limitations de la biopsie liquide en oncologie. CTC : cellule tumorale circulante ; ADNtc : ADN tumoral circulant ; ARNtc : ARN tumoral circulant ; miARNc : microARN circulant ; LCR : liquide céphalo-rachidien

sont avérés très prometteurs en oncologie dans la détection de cibles ou de résistances thérapeutiques, l'évaluation du pronostic, le suivi thérapeutique et la recherche d'éventuelles récurrences. Ils pourraient également être utilisés comme moyen de détection précoce du cancer.

L'ADN circulant total et l'ADN tumoral circulant

L'ADN circulant total (cfDNA pour *cell-free DNA*) est retrouvé dans le plasma et d'autres fluides corporels tels que l'urine, le liquide céphalo-rachidien, le liquide pleural, la salive et tout autre liquide sous forme de courts fragments d'ADN double brin d'environ 160 paires de bases (soit de l'ordre de grandeur de la taille de l'ADN contenu dans un nucléosome). En condition physiologique dans le sang, l'ADNcf est libéré lors de la mort cellulaire par apoptose ou nécrose, ou par sécrétion active, et provient principalement de la lignée hématopoïétique avec des contributions minimales d'autres tissus [1,2]. Depuis sa première découverte chez l'homme en 1948 par Mandel et Metais, il a été démontré que l'ADNcf dans le sang reflète divers processus physiologiques comme la grossesse ou pathologiques tels que les maladies inflammatoires, la septicémie, les traumatismes, les accidents vasculaires cérébraux et le cancer, et sa concentration est dans certains cas corrélée avec la gravité de la maladie et le pronostic. Chez les patients cancéreux, une faible proportion de l'ADNcf dérive de cellules tumorales et fait référence à l'ADN tumoral circulant (ADNtc). L'ADNtc est défini comme la fraction de l'ADNcf qui porte au moins une altération génétique ou épigénétique liée à la tumeur. Certaines de ces altérations sont particulièrement pertinentes à rechercher pour comprendre le développement du cancer, sa progression et la résistance au traitement.

L'ADNtc peut être libéré par les cellules tumorales non seulement depuis la tumeur primaire mais aussi des métastases et contient ainsi des anomalies génomiques représentatives de celles du tissu tumoral d'origine. C'est la raison pour laquelle l'ADNtc constitue une représentation unique de l'ensemble du génome de la tumeur chez un patient donné [3]. Les méthodes actuelles de séquençage permettent de détecter les différents types d'altérations moléculaires dans l'ADNtc comme les mutations ponctuelles, les délétions ou les insertions (indels), les modifications du nombre de copies de certains gènes ou les réarrangements chromosomiques ainsi que les modifications épigénétiques. Il est possible de détecter ces anomalies génétiques à des fréquences alléliques très faibles. Certaines techniques récentes comme la PCR digitale sont en effet particulièrement sensibles [4].

Les cellules tumorales circulantes

Les cellules tumorales circulantes (CTCs) sont des cellules tumorales relarguées par la tumeur primaire et les métastases dans la circulation périphérique [5]. Il peut s'agir de clones ou sous-clones représentatifs de divers stades et sites de la maladie cancéreuse.

Les micro-ARNs

Les micro-ARNs (miARN) sont une famille de petites molécules d'ARN non-codants (19-22 nucléotides) qui participent à de nombreux processus physiologiques et pathologiques en inhibant la traduction ou par clivage des ARN messagers. Ces petites molécules peuvent facilement être sécrétées dans la circulation. L'expression de ces miARN est fréquemment dérégulée dans les cancers. De nombreux travaux ont par ailleurs documenté que

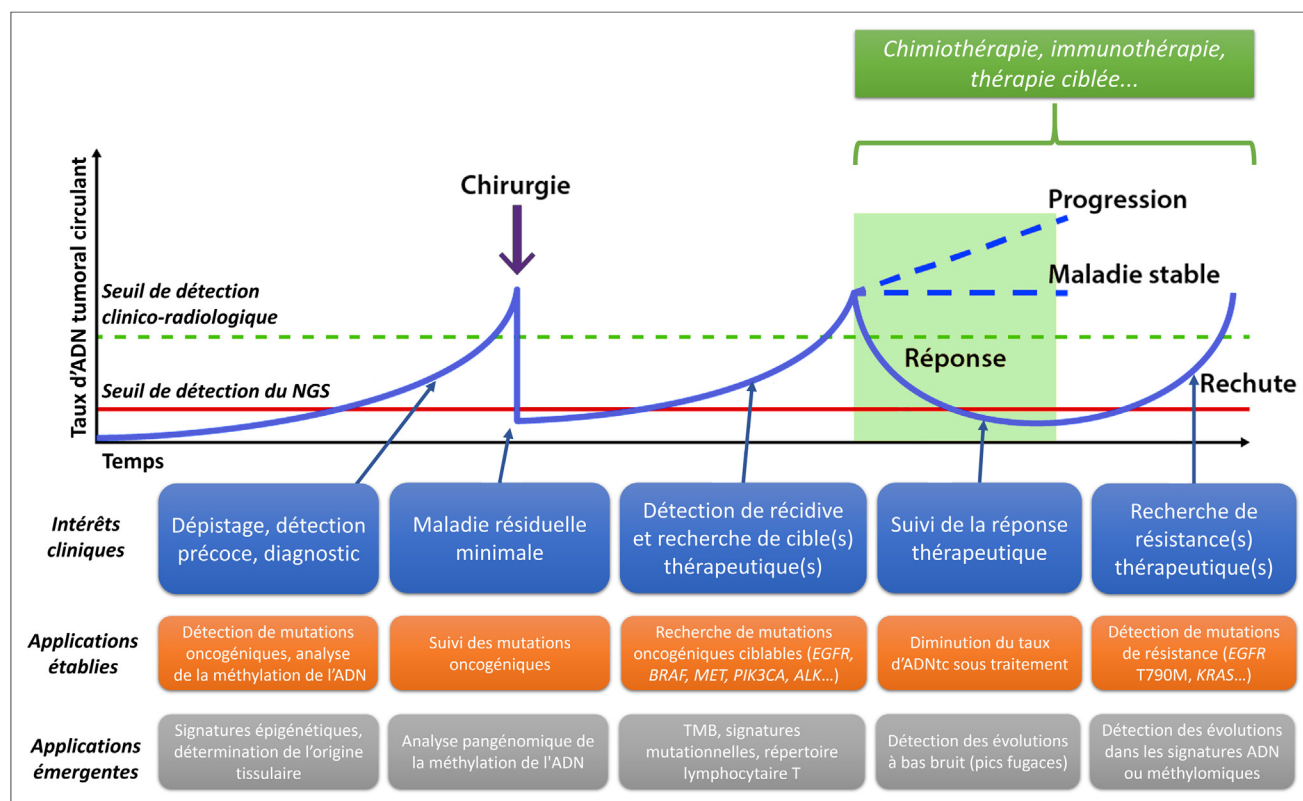


FIGURE 2

Applications cliniques des biopsies liquides au cours de la maladie cancéreuse. BRAF : proto-oncogène B-Raf ; EGFR : epithelial growth factor receptor (récepteur du facteur de croissance épidermique) ; NGS : next generation sequencing (séquençage à haut débit) ; TMB : tumor mutational burden (charge mutationnelle tumorale)

les miARN encapsulés au sein de petites vésicules lipidiques (exosomes) pouvaient intervenir à distance dans la reprogrammation du microenvironnement tumoral, notamment au cours de l'invasion et de la formation de la niche métastatique [6].

Applications cliniques des nouveaux biomarqueurs circulants tumoraux

La révolution de la biopsie liquide

Selon la définition du dictionnaire du NCI (*National Cancer Institute*), la biopsie liquide est « un test effectué sur un échantillon de sang pour la recherche de cellules cancéreuses ou de fragments d'ADN provenant d'une tumeur et circulant dans le sang ». Elle concerne généralement la détection de l'ADN tumoral circulant (ADNtc) et des cellules tumorales circulantes (CTCs) mais aussi de l'ARN tumoral circulant (ARNtc), des miARN circulants (miARNc) et des microvésicules telles que les exosomes [7] (figure 1). Grâce à la généralisation du séquençage haut débit, elle constitue une approche innovante et avantageuse en plein essor avec le développement croissant

d'applications dans la prise en charge en routine des patients atteints de pathologies néoplasiques [8]. Les biopsies liquides sont des sources alternatives de matériel tumoral fournissant un instantané génétique potentiellement plus large et plus complet sur la maladie cancéreuse que la biopsie tissulaire, qui peut être limitée à un sous-domaine topographique de la lésion. De plus, la biopsie liquide est non invasive (un simple prélèvement sanguin est nécessaire ou parfois même un échantillon urinaire peut suffire). Les résultats sont obtenus plus rapidement que ceux d'une biopsie tissulaire. Elle peut être répétée tout au long de la prise en charge, avant, pendant et après le traitement, afin de rechercher une cible thérapeutique adaptée, surveiller en temps réel l'évolution clonale et identifier l'émergence de sous-clones tumoraux pharmaco-résistants, détecter une éventuelle progression ou une récurrence (figure 2). ... En plus de sa signification qualitative (nature et type des lésions génomiques), elle peut aussi donner des indications quantitatives sur l'évolution et la dynamique de la maladie. Elle offre ainsi la possibilité aux oncologues d'intervenir

avant la détection standard radiologique de la progression de la maladie, et ainsi de réduire considérablement les taux de résistance thérapeutique, de récurrence et *in fine* de décès liés au cancer.

Applications cliniques de l'ADN tumoral circulant

Recherche de cibles et de résistances thérapeutiques

Depuis 2016, la biopsie liquide fait partie de l'arsenal diagnostique comme alternative à la biopsie conventionnelle chez les patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules [9]. L'identification dans l'ADNtc de certaines mutations activatrices du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR, de l'anglais *Epidermal Growth Factor Receptor*) des patients cancéreux autorise la prescription d'une thérapie ciblée par un inhibiteur de l'activité tyrosine-kinase (ITK), et chez lesquels un échantillon de tissu tumoral n'est pas disponible [10]. Elle est également utilisée pour rechercher des mutations de résistance chez les patients sous ITK dans un contexte de progression ou de récurrence tumorale afin d'adapter au mieux le traitement. Une revue publiée récemment dans les *Annales de Biologie Clinique* fait le point sur les principales applications dans les cancers solides ainsi qu'en oncohématologie, même si celles-ci sont peu réalisées en routine en France [11]. Aux États-Unis, la FDA (*Food & Drug Administration*) a autorisé plusieurs tests à la recherche de cibles d'intérêt dans différents cancers comme *Guardant 360® CDx*, *FoundationOne Liquid® CDx*, *Therascreen® Qiagen*, *Cobas® EGFR Mutation Test v2 Roche* (*tableau I*)...

Détermination de la maladie résiduelle et du risque de récurrence

La différence fondamentale entre la cinétique des marqueurs tumoraux classiques et les marqueurs moléculaires des biopsies liquides est la demi-vie beaucoup plus courte de l'ADNtc (semaine/jours vs quelques heures). Dans le cancer du côlon, au stade III, il a été montré que la persistance d'ADNtc après chirurgie puis chimiothérapie adjuvante peut définir un sous-ensemble de patients qui restent à haut risque de récurrence [12]. Ces résultats sont extrêmement prometteurs même s'ils doivent être confirmés à plus grande échelle compte tenu du faible effectif. De plus, grâce au séquençage haut débit, les auteurs ont analysé l'ensemble de l'ADNtc pour ne pas être limité aux cibles habituelles telles que les mutations du gène *KRAS* qui ne représentent au mieux que la moitié des patients. Toutefois, la démonstration est suffisamment convaincante pour la poursuite des recherches en ce sens avec de nouvelles méthodes plus simples (méthylation de promoteurs, mesure de la taille de l'ADN circulant...) pour détecter au plus tôt après la chirurgie la persistance d'ADNtc et ainsi stratifier les patients avec un risque faible ou élevé de rechute afin d'adapter la surveillance et le traitement [13].

Suivi de la réponse thérapeutique et détection des récurrences

Des études récentes soulignent les applications cliniques prometteuses de l'ADNtc dans la surveillance de la réponse thérapeutique ainsi que dans la détection des récurrences. Ainsi, une étude a montré, par exemple, que les variations des taux d'ADNtc muté sur le gène *KRAS* de patients atteints d'un cancer du pancréas avancé étaient plus rapides et plus prononcées que les variations des marqueurs tumoraux protéiques [14]. Une diminution des taux d'ADNtc muté sur le gène *KRAS* pendant le traitement était un indicateur précoce de la réponse au traitement, alors qu'il n'y avait pas de corrélation significative entre la cinétique du CA 19-9, de l'ACE ou du CYFRA 21-1 et la réponse à la chimiothérapie au cours des quatre premières semaines de traitement. Les mesures répétées de l'ADNtc au cours du suivi ont semblé être supérieures aux marqueurs tumoraux protéiques dans la détection de la progression de la maladie (sensibilité : 83 %, spécificité : 100 %) [14].

Même si, à ce jour, les recommandations pratiques concernant le nombre, le planning de la mesure ainsi que les seuils pour les variations quantitatives de l'ADNtc ne sont pas encore largement validées, l'absence de détection ou la diminution significative de l'ADNtc après un traitement est en faveur d'un bénéfice clinique [15]. Dans le cadre du suivi thérapeutique, l'ADNtc semble donc prometteur comme marqueur de la dynamique tumorale et dans l'évaluation de la réponse thérapeutique ainsi que dans la détection d'une éventuelle récurrence pouvant amener à une modification de la prise en charge.

Dépistage précoce du cancer

Un nombre non négligeable de cancers solides de l'adulte peut être guéri par un acte chirurgical, sans recours à une thérapie systémique lorsqu'ils sont localisés, découverts à un stade précoce et accessibles à la résection. Une fois les métastases à distance apparues, l'excision chirurgicale est rarement curative. Un objectif majeur de la recherche en oncologie est donc la détection des cancers avant qu'ils ne métastasent vers des sites distants. Pour de nombreux cancers chez l'adulte, la fenêtre temporelle de développement des cancers peut s'étendre sur plusieurs années, voire des décennies [16-18]. Des lésions indolentes peuvent ainsi apparaître et persister sur de longues périodes avant de subir une expansion rapide souvent accompagnée d'un processus métastatique [19]. Ainsi, il existe une large fenêtre d'opportunité pour détecter de nombreux cancers avant le début de la formation ou l'expansion des métastases. Certains tests ont déjà été approuvés dans le dépistage précoce du cancer colorectal par la FDA notamment *Epi proColon test®* et *Cologuard test mt-sDNA screening test®* (*tableau I*).

Le test CancerSEEK, développé par un consortium d'experts américains et publié dans *Science* en 2018 [20], est une version sophistiquée et novatrice de biopsie liquide combinant des biomarqueurs protéiques et moléculaires pour la détection

A. Perrier, P. Hainaut, A. Guenoun, D-P Nguyen, P-J Lamy, F. Guerber, et al.

TABLEAU I

Liste des tests utilisant le principe de biopsie liquide et approuvés par la FDA en oncologie médicale

Nom du test	Technologie utilisée	Agrément	Intérêt(s)
Guardant 360® CDx <i>Guardant Health</i>	Test compagnon de 73 gènes détectés dans l'ADN circulant plasmatique	FDA	Multi cancer Statut mutationnel du gène <i>EGFR</i> chez les patients éligibles à un traitement par osimertinib ou amivantamab-vmjw (insertion exon 20) dans les CBNPC Statut mutationnel du gène <i>KRAS</i> avec recherche de la mutation G12C chez les patients éligibles à un traitement par sotorasib dans les CBNPC
FoundationOne Liquid® CDx <i>FoundationOne</i>	Test compagnon de 324 gènes détectés dans l'ADN circulant plasmatique	FDA	Multi cancer Statut mutationnel des gènes <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> et <i>ATM</i> chez les patients atteints d'un cancer de la prostate métastatique et résistant à la castration qui pourraient bénéficier d'un traitement par olaparib ou rucaparib et chez les patientes atteintes de cancer de l'ovaire éligibles à un traitement par rucaparib Identification des réarrangements du gène <i>ALK</i> chez les patients atteints de CBNPC éligibles au traitement par alectinib Identification des sauts de l'exon 14 du gène <i>MET</i> chez les patients atteints de CBNPC éligibles au traitement par capmatinib Détection des délétions de l'exon 19 du gène <i>EGFR</i> ou des substitutions de l'exon 21 (L858R) chez les patients atteints de CBNPC et éligibles à un traitement par géfitinib, osimertinib ou erlotinib Statut mutationnel du gène <i>PIK3CA</i> chez les patientes atteintes de cancer du sein éligibles au traitement par alpelisib
CellSearch® CTC <i>Menarini Silicon Biosystems</i>	Cellules tumorales circulantes d'origine épithéliale dans le sang total : CD45 ⁺ ; EpCAM ⁺ ; CK8, CK18 et/ou CK19 ⁺	FDA CE-IVD	Pronostic des cancers du sein, du colon et de la prostate métastatiques
Cobas® EGFR Mutation Test v2 <i>Roche</i>	PCR en temps réel sur ADN circulant plasmatique Test compagnon du gène <i>EGFR</i>	FDA	Statut mutationnel du gène <i>EGFR</i> chez les patients éligibles à un traitement par géfitinib, osimertinib ou erlotinib dans les CBNPC
Epi proColon test® <i>Epigenomics AG</i>	PCR en temps réel sur ADN circulant plasmatique Test compagnon du gène <i>SEPT9</i>	FDA CE-IVD	Dépistage précoce du cancer colorectal par détection de la méthylation du gène <i>SEPT9</i> dans le cancer colorectal
Cologuard test mt-sDNA screening test® , <i>Exact Sciences</i>	QuARST et immuno-essai : 7 mutations du gène <i>KRAS</i> , statut de la méthylation des gènes <i>BMP3</i> et <i>NDRG4</i> , hémoglobine dans les échantillons fécaux (<i>ACTB</i> comme témoin)	FDA	Dépistage précoce des sujets à risque de cancer colorectal

TABLEAU I (Suite).

Nom du test	Technologie utilisée	Agrément	Intérêt(s)
Therascreen® Qiagen	PCR en temps réel sur ADN circulant plasmatique Test compagnon des gènes <i>EGFR</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> , <i>FGFR</i>	FDA CE-IVD	Multi-cancer (différents kits) Statut mutationnel du gène <i>KRAS</i> dans les cancers colorectaux (patients éligibles au cetuximab ou panitumumab) ou dans les CBNPC avec une mutation G12 C (patients éligibles au sotorasib) Statut mutationnel du gène <i>BRAF</i> (mutation V600E) dans les cancers colorectaux (patients éligibles à l'encorafenib en combinaison au cetuximab) Statut mutationnel du gène <i>PIK3CA</i> dans les cancers du sein (patients éligibles à l'alpelisib) Statut mutationnel du gène <i>EGFR</i> dans les CBNPC (patients éligibles à l'afatinib, géfitinib...) Statut mutationnel des gènes <i>FGFR1-4</i> dans les cancers urothéliaux (patients éligibles à l'erdafitinib)
UroVysion® Abbott	FISH urinaire : Détection d'aneuploïdie des chromosomes 3,7,17 et de la perte du locus 9p21	FDA CE-IVD	Aide au diagnostic du cancer de la vessie

CE-IVD : Certification Européenne des Dispositifs Médicaux de Diagnostics In Vitro ; FDA : Food & Drug Administration ; FISH : hybridation in situ en fluorescence ; CBNPC : cancer bronchique non à petites cellules ; PCR : polymérase chain reaction ; QuARTS : quantitative allele-specific real-time target and signal amplification

précoce du cancer. Le but d'un tel test est la possibilité d'être utilisé à grande échelle afin de permettre la détection de cancers encore peu développés et susceptibles d'être traités précocement. L'étude présentant le test CancerSEEK a été réalisée sur le plasma de 1 005 individus atteints de cancer non métastatique de stade I à III au moment de l'inclusion et de 812 individus sains [20]. Les huit cancers représentés étaient des cancers de l'ovaire, du foie, de l'estomac, du pancréas, de l'œsophage, du colon, du poumon, et du sein, qui correspondent à des cancers très fréquents dans les pays occidentaux et pour lesquels il n'existe pas de test sanguin permettant une détection précoce. Le test CancerSEEK consiste à rechercher des mutations par PCR multiplex, à partir de l'ADN tumoral circulant, des régions critiques des seize gènes les plus souvent impliqués dans les cancers, associé à la mesure des taux plasmatiques de huit biomarqueurs protéiques liés au cancer. Le test CancerSEEK utilisait un algorithme intégrant ces données génétiques et protéiques. CancerSEEK a permis de détecter 98 % des cancers de l'ovaire et du foie, entre 60 % et 70 % des cancers de l'estomac, du pancréas, de l'œsophage, du colon et du poumon et seulement 33 % des cancers du sein [20]. La sensibilité médiane globale parmi l'ensemble des cancers était de 70 % et la spécificité de 99 % (seulement sept faux positifs sur 812 témoins sains ont été détectés). Mais plus le stade du

cancer était précoce (stade I), plus la sensibilité médiane était faible (43 %) ; la sensibilité étant de 73 % pour les stades II et de 78 % pour les stades III. La sensibilité variait avec le type de cancer : ainsi celle-ci était proche de 100 % pour le cancer de l'ovaire mais inférieure à 40 % pour le cancer du sein. Un des intérêts de CancerSEEK est sa capacité à déterminer la localisation du cancer ; la sensibilité du test était de 83 % pour une localisation du cancer à deux sites anatomiques et de 63 % pour une localisation à un seul site anatomique. Sachant que les mutations génétiques ne sont généralement pas spécifiques d'un tissu, la plupart des informations de localisation des cancers ont été obtenues par le dosage des marqueurs protéiques sériques.

Bien que la performance de ce test sanguin soit prometteuse, l'étude présente cependant plusieurs limitations. Tout d'abord, dans cette étude, le groupe contrôle a été constitué d'individus sains. Or, un grand nombre de cancers chez l'adulte se développent dans des contextes métaboliques et immuno-inflammatoires (surpoids, obésité, diabète, syndrome métabolique, inflammation...). Les critères d'inclusion pour les individus sains étaient l'absence d'antécédent connu de cancer, de dysplasie de haut grade, de maladie auto-immune ou de maladie rénale chronique. Dans des études épidémiologiques sur des populations exposées, l'analyse de l'ADNtc a révélé l'existence de

mutations dans l'ADNtc comme résultat direct de la mutagenèse induite par le tabac ou par l'aflatoxine, sans indication de présence de cellules cancéreuses [21]. Ensuite, sa sensibilité pour la détection des lésions de stade précoce, recherchées en priorité, reste très limitée, avec un grand nombre de faux négatifs et est donc insuffisante pour formuler un diagnostic précoce systématique. Les sensibilités médianes du test sont aussi à nuancer car il existe une sous-représentation marquée du stade I (20 %) chez les patients présentant une tumeur. En outre, même si la spécificité indiquée est de 99,1 % (sept faux positifs sur 812 témoins sains), cela pose également le problème d'un test en population générale qui sera générateur d'un nombre non négligeable de faux positifs et donc d'un surdiagnostic. En définitive, malgré ces limitations, CancerSEEK se montre prometteur pour la détection précoce et le suivi des tumeurs à partir d'un simple échantillon de sang et son développement est sans doute un pas de plus vers un test de dépistage au moins dans un premier temps sur des populations ciblées à risque et peut-être à plus long terme dans la population générale.

Les tests basés sur la méthylation de l'ADN pourraient cependant surpasser les approches conventionnelles par recherche de mutations de l'ADN. En effet, les analyses de la méthylation de l'ADN sont d'un grand intérêt étant donné l'apparition précoce des événements de méthylation dans les tissus précancéreux, leur sensibilité potentielle importante, ainsi que leur spécificité tissulaire. Elles permettent également de s'affranchir des altérations de l'ADN très répandues en raison de processus non oncogéniques tels que l'hématopoïèse clonale, qui nécessite un séquençage simultané des leucocytes. En 2020, Liu *et al.* [22] ont analysé de façon prospective 6 689 échantillons sanguins, dont 2 482 patients cancéreux et 4 207 individus sains. Un algorithme, entraîné par apprentissage automatique ou *machine learning*, a été utilisé pour prédire la présence et le type du cancer en fonction des profils de méthylation de l'ADNtc. Le test ciblait environ un million des 30 millions de sites de méthylation du génome humain. L'analyse ciblée de la méthylation de l'ADNtc a eu la capacité de détecter et localiser simultanément plus de 50 types de cancer différents, y compris les cancers très agressifs pour lesquels il n'existe actuellement pas de méthode de dépistage validée. Par exemple, pour le cancer du pancréas, la sensibilité du test était de 63 % pour le stade I, 83 % pour le stade II, 75 % pour le stade III et 100 % pour le stade IV. Les cancers ont été détectés, tout stade confondu, avec une spécificité > 99 % et un taux de faux positifs < 1 %. La sensibilité des stades I à III était de 67,3 % pour un ensemble prédéfini de douze types de cancer et était de 43,9 % pour tous les types de cancer. Sans surprise, le taux de détection a augmenté avec le stade : de 39 % pour le stade I à 92 % pour le stade IV pour les cancers prédéfinis et de 18 % pour le stade I à 93 % pour le stade IV pour tous les cancers. Cette approche de méthylation ciblée a pu déterminer le tissu d'origine avec une

précision supérieure à 90 %. Ces données représentent une étape prometteuse vers la détection précoce de certains cancers agressifs, inaccessibles aux approches actuelles de dépistage. En juillet 2020, les premiers résultats préliminaires de l'étude PanSeer [23], basée également sur la méthylation de l'ADN avec l'analyse de 123 115 échantillons plasmatiques de sujets sains sont également prometteurs. Les auteurs affirment pouvoir détecter le cancer chez 95 % (IC à 95 % : 89 à 98 %) des personnes asymptomatiques diagnostiquées ultérieurement et ce jusqu'à quatre ans en avance sur la révélation clinique, bien que de futures études longitudinales soient nécessaires pour confirmer ce résultat. Cependant, les mêmes principes de prudence que ceux soulevés pour CancerSEEK doivent être pris en compte. En particulier, le statut de méthylation de l'ADNc de sujets souffrant de pathologies métaboliques et immuno-inflammatoires reste très mal connu. Comme pour le cas de tests basés sur la détection d'ADNtc muté, des études prospectives seront indispensables pour valider ces approches.

Applications cliniques des cellules tumorales circulantes

L'application clinique principale des CTCs, aujourd'hui acceptée dans la pratique médicale, est son utilisation comme facteur pronostic du cancer (tels que le cancer du sein, le cancer colorectal ou encore le cancer de la prostate), sur la base du dénombrement des CTCs [24-28].

D'autres pistes prometteuses sont en cours d'évaluation comme la détection de CTCs présentant certaines altérations moléculaires : les CTCs mutées sur le gène *KRAS* détectées par PCR digitale dans le cancer colorectal [29,30], les CTCs exprimant un variant d'épissage du récepteur des androgènes (AR-V7) avec pour conséquence une résistance thérapeutique dans le cancer de la prostate métastatique ainsi qu'un plus mauvais pronostic [31] ou encore les CTCs exprimant des ARN de fusion *ALK* ou *ROS1* dans le cancer du poumon non à petites cellules à un stade avancé [32]. L'analyse moléculaire d'un nombre limité de cellules tumorales voire de chaque cellule tumorale de façon spécifique (*single cell sequencing*) fait l'objet de nombreuses recherches et développements afin d'étudier l'agressivité tumorale et l'hétérogénéité tumorale (*voir paragraphe dédié ci-après*). Une autre innovation est l'utilisation de cultures cellulaires à partir de CTCs pour l'établissement de lignées cellulaires utiles à l'étude des mécanismes d'invasivité ou de sensibilité aux traitements [33,34].

Applications cliniques des micro-ARNs

Plusieurs études ont mis en évidence une association entre les miARN circulants et l'origine, la progression, la réponse thérapeutique et la survie des patients dans le cancer du sein, du poumon, du foie, du pancréas, du colon/rectum ou dans certains lymphomes [35]. Par ailleurs, les miARN circulants semblent permettre de définir des signatures moléculaires pour l'identification du tissu d'origine. Par exemple, dans le cancer du sein,

une étude comparative a montré que l'augmentation des niveaux de deux miARN circulants, miR-145 et miR-451, constituait un biomarqueur robuste pour distinguer le cancer du sein des témoins sains et de plusieurs autres types de cancer, avec des valeurs prédictives élevées (positive : 92 %, négative : 88 %) [36]. Ces résultats demandent une validation dans des études prospectives de puissance suffisante.

Quelles perspectives pour les biomarqueurs en médecine de précision ?

Avec l'avancée des connaissances dans l'oncogénèse d'une part, et les progrès technologiques avec notamment le séquençage à haut débit d'autre part, nous assistons à l'émergence d'une nouvelle génération de biomarqueurs tumoraux moléculaires. Ils annoncent un grand bouleversement des anciennes classifications des cancers. En oncologie, la recherche actuelle sur les biomarqueurs est structurée par trois grandes tendances qui, conjuguées les unes aux autres, définissent un horizon proche pour le développement de nouvelles générations de biomarqueurs pour le diagnostic précoce, pour la prédiction et la détection de la rechute et de la résistance ainsi que pour le ciblage thérapeutique. Ces grandes tendances sont l'analyse intégrative de l'hétérogénéité tumorale, l'exploitation multi-omique de la biopsie liquide et le recours aux données de santé pour caractériser les trajectoires personnalisées de chaque patient [37]. Le dénominateur commun à ces trois tendances est leur recours à des données de très grandes dimensions et à l'intelligence artificielle, définissant un nouveau modèle de médecine numérique, avec des implications majeures pour l'éthique médicale et l'organisation des réseaux de soins [38].

L'importance de l'hétérogénéité tumorale

Plus que toute autre caractéristique phénotypique ou moléculaire, la progression des cancers est liée à la capacité de la tumeur à s'adapter de façon dynamique à son environnement tissulaire et immunitaire pour faire émerger des phénotypes résilients et résistants aux thérapies. Ce processus est à présent communément compris comme une manifestation du darwinisme à l'échelle cellulaire : dans un écosystème sous intense pression (immunitaire, métabolique, homéostatique), la sélection naturelle au sein de la tumeur va favoriser les cellules capables d'exprimer la plus grande plasticité adaptative et la plus grande capacité à transformer leur environnement [39]. Cette définition s'applique parfaitement à la formation des métastases, qui dépendent d'interactions complexes entre la dynamique propre aux cellules cancéreuses et les contraintes de la niche micro-environnementale où la métastase se développe. Il en découle, en principe, que plus une tumeur est hétérogène et dynamique au plan moléculaire et cellulaire, plus elle est potentiellement agressive et résiliente [40,41]. Il est donc essentiel de développer des approches robustes pour mesurer et évaluer l'hétérogénéité tumorale.

Le recours massif au séquençage de l'ARN et du génome permet de dresser un profil intégratif de l'hétérogénéité individuelle des tumeurs. Dans le cas de l'adénocarcinome pancréatique, un cancer avec un taux de survie à cinq ans inférieur à 7 %, une analyse combinée du génome (par séquençage de l'ADN), du transcriptome (par RNASeq, séquençage de l'ARN messenger) et de l'infiltrat immunitaire intra-tumoral (par immunohistochimie) a permis de démontrer que la survie à long terme était liée à l'émergence de néoantigènes reconnus par le système immunitaire du patient [42]. La prédiction correcte des néoantigènes requiert non seulement l'identification précise de nouveaux épitopes créés par les remaniements génomiques propres à la tumeur mais aussi la prédiction de leur immunogénicité spécifique en fonction du répertoire HLA du patient. En combinant à cette prédiction, l'analyse transcriptomique pour caractériser l'infiltration et l'activation des cellules T CD8+ il devient possible de prédire sur la biopsie de la tumeur primaire la probabilité de survie du patient à cinq ans. Cette approche, appliquée de façon rétrospective aux mélanomes et aux cancers du poumon recrutés dans des essais cliniques d'immunothérapie de phase II, a permis de proposer un modèle de « fitness » néoantigénique permettant de classer les répondeurs et les non-répondeurs de façon très précise [43].

Pour analyser l'hétérogénéité tumorale, le séquençage des biopsies tumorales entraîne une perte importante d'information car le profil moléculaire ainsi défini représente une moyenne établie sur un grand nombre de cellules. Le développement de méthodes de séquençage à très haute résolution permet à présent de contourner cet obstacle en identifiant des variations génomiques ou transcriptomiques associées à de petites populations cellulaires au sein d'une lésion, voire à chaque cellule spécifique (*single cell sequencing*) [44]. Le séquençage des cellules individuelles requiert la préparation de suspension de cellules isolées, leur séparation par tri, la préparation de bibliothèques d'ADN (ou d'ADNc dans le cas de l'analyse du transcriptome) et leur séquençage en masse. Plusieurs méthodes standardisées sont aujourd'hui commercialisées, couvrant l'ensemble du processus. L'analyse bio-informatique permet d'identifier et de quantifier les caractéristiques génomiques et transcriptomiques propres à chaque cellule ou population de cellules. Ce type d'approche permet de détecter l'émergence précoce de cellules potentiellement plus agressives au sein d'une tumeur et de retracer la phylogénie clonale entre plusieurs domaines d'une tumeur et ses métastases. Elle est également applicable aux cellules tumorales circulantes récoltées à partir du plasma, pour lesquelles elle s'avère particulièrement informative en distinguant les cellules à fort potentiel métastatique au sein de groupes dominés par des cellules sénescents ou bénignes [45]. Du fait de leur développement rapide, les technologies « cellule unique » ont la capacité de devenir la référence pour la recherche de biomarqueurs prédictifs de la réponse aux immunothérapies et de la prédiction du risque de rechute. L'identification de

sous-populations cellulaires est également facilitée par le développement de la cytométrie de masse (Cytof), qui permet de séparer plus d'une centaine de types cellulaires par tri cytométrique de cellules marquées par des anticorps couplés à des marqueurs de masse spécifique [46]. Ces recherches font apparaître un nouveau concept pour l'identification de biomarqueurs en oncologie : il ne s'agit plus d'identifier des marqueurs applicables de façon reproductible à des groupes de patients de façon à définir une stratification d'intérêt thérapeutique, mais de détecter à un temps « t » de la maladie, un ensemble de traits moléculaires uniques prédictifs de l'évolution d'un patient donné. Nous assistons ici véritablement à la naissance d'une médecine génomique à l'échelle de l'individu.

L'exploitation multi-omique de la biopsie liquide

L'utilisation de la biopsie liquide comme source de biomarqueurs pour les tumeurs solides est une approche en plein essor. En effet, cette source a la particularité d'offrir une fenêtre d'exploration simultanée sur un ensemble de paramètres tels que la réponse immuno-inflammatoire, le métabolisme, le relargage dans le sang de structures spécifiquement produites par la tumeur et la dissémination de micro-métastases [47]. Aujourd'hui, une question centrale pour la recherche sur les biopsies liquides est de comprendre la nature des processus cellulaires par lesquels ces produits dérivés de la tumeur sont exprimés dans la circulation. À côté de produits de dégradation des cellules cancéreuses, les tumeurs et leur microenvironnement produisent des microvésicules lipidiques chargées en molécules actives dont certaines ont un rôle signalétique. C'est le cas en particulier des exosomes, une catégorie de vésicules produites à l'intérieur de la plupart des cellules par un processus de maturation endosomale [48]. Les exosomes sont des corpuscules de petite taille (30-120 nm), entourés par une bicouche lipidique, porteurs de récepteurs et de facteurs de signalisation et contenant des acides nucléiques d'origine cellulaire (ADN, ARN, miARN, longs ARN non-codants). Nous savons à présent que ces structures ont des rôles signalétiques, agissant comme des transporteurs (« cargos ») d'éléments de programmation épigénétique de la cellule cancéreuse vers son microenvironnement [48]. L'isolation et la caractérisation des exosomes permettront ainsi de capturer un ensemble de signaux moléculaires produits par les tumeurs et potentiellement porteurs d'informations sur la façon dont les cellules tumorales interagissent avec leur environnement local ou à distance. L'analyse globale des exosomes combine plusieurs technologies à très haut débit : la génomique, la métabolomique et plus particulièrement la lipidomique pour analyser la composition membranaire, ainsi que la protéomique.

En plus du décryptage des exosomes, la métabolomique et la protéomique sont des techniques de choix pour la découverte de nouveaux biomarqueurs en oncologie. L'analyse du « protéome profond » (*deep proteome*) du plasma permet de

détecter simultanément plusieurs centaines des peptides informatifs [49,50]. L'analyse du métabolome s'avère particulièrement prometteuse car elle offre une fenêtre d'exploration sur les adaptations métaboliques propres aux cellules cancéreuses. De plus, les techniques d'analyse du métabolisme (spectrométrie de masse, spectroscopie par résonance magnétique nucléaire dite « RMN ») sont relativement faciles à mettre en œuvre dans le contexte de chaînes d'analyse à haut débit. Il est envisageable, dans un proche avenir, de distinguer des « signatures métaboliques » des cancers, aussi précises et robustes que celles actuellement obtenues par séquençage du génome.

Données de santé, big data et biomarqueurs

De plus en plus, l'analyse moléculaire prend une dimension personnalisée qui ne trouve son sens que si les informations recueillies peuvent être mises en regard de l'évolution de la maladie propre à chaque patient [51]. Ceci demande de documenter les événements cliniques de façon extrêmement détaillée et standardisée, une démarche rendue possible par les progrès de l'imagerie médicale et des objets connectés permettant d'acquérir en temps réel des informations sur toute une série de paramètres physiopathologiques. L'histoire médicale du patient –révélatrice du contexte dans lequel le cancer se développe– apporte également un éclairage majeur : comorbidités, expositions environnementales, facteurs de risque, historique familial, modalités d'accès (ou de non-accès) aux offres de dépistage et aux soins. Ces données, autrefois difficiles à rassembler et à structurer, sont aujourd'hui collectées de façon systématique dans les dossiers patients électroniques et dans les données informatisées des assureurs de santé, publics ou privés [52]. À noter que les grands établissements français de santé se préparent actuellement à cette révolution en mettant en place des solutions informatiques performantes exploitant les données clinico-biologiques d'un nombre très important de patients. Citons par exemple le projet d'Entrepôt de Données de Santé (EDS) de l'Assistance Publique Hôpitaux de Paris prévoyant une interopérabilité entre les différents hôpitaux de l'institution.

Le recours à l'intelligence artificielle ouvre des perspectives totalement inédites pour intégrer de façon très innovante les données moléculaires avec les données caractérisant la trajectoire spécifique de chaque patient. Ceci n'est pas sans poser des questions fondamentales pour l'éthique médicale. Quels sont les critères et les conditions d'accès à ces informations ? Comment permettre au patient de garder le contrôle d'informations personnelles et caractérisant son identité ? Comment éviter que les données massives ainsi collectées ne soient séquestrées par des opérateurs technologiques et industriels surpuissants et utilisées pour des intérêts économiques particuliers ? La prise en compte de ces dimensions est le fondement du concept de « médecine 4P » : Préventive, Prédicative, Personnalisée et Participative [53]. Cette approche de la médecine

moléculaire se fonde sur un contrat singulier entre le patient et l'ensemble des acteurs de la santé, lui donnant les leviers nécessaires pour être l'acteur décisionnel de son plan de traitement personnalisé. L'avenir des biomarqueurs en oncologie ne dépend donc pas seulement d'avancées technologiques : il engage également des choix de politique de santé et de considérations éthiques et sociétales.

Apport de l'intelligence artificielle dans l'élaboration de scores composites clinico-biologiques

En parallèle des développements cliniques et médicaux sur les marqueurs tumoraux, le secteur de l'intelligence artificielle a connu des avancées majeures ces dernières décennies [54]. Nous avons assisté à l'essor des algorithmes de *machine learning*, ou d'apprentissage automatique. Cette discipline consiste à utiliser des principes mathématiques et statistiques avancés pour extraire l'information utile et pertinente contenue dans un jeu de données. La branche la plus récente du *machine learning*, appelée *deep learning* [55], ou apprentissage automatique profond, permet de créer des algorithmes complexes pouvant reproduire des raisonnements avancés et d'extraire de l'information de différents types de données.

Ces algorithmes constituent l'extension naturelle des scores diagnostiques et pronostiques (score ROMA, index *phi*...). En effet, l'élaboration des scores repose sur l'analyse de paramètres biologiques donnés, couplée à la connaissance médicale et scientifique des chercheurs et cliniciens, et permet de déterminer la formule pertinente pour éclairer sur un diagnostic ou un pronostic donné. Toutefois, la mise en place d'un score nécessite d'analyser un volume de données de plus en plus important et de nature de plus en plus complexe. L'intelligence artificielle et plus particulièrement le *machine learning* et le *deep learning* ont déjà fait leurs preuves dans l'exploitation de données de cette nature et de ce volume dans d'autres domaines. Ces technologies pourraient décupler les capacités diagnostiques et pronostiques des marqueurs tumoraux, soit en identifiant des sous-catégories de patients parmi lesquels la performance d'un marqueur tumoral serait meilleure, soit en combinant un marqueur tumoral à d'autres paramètres biologiques et sources d'information afin d'augmenter les performances de ce dernier. En effet, l'identification d'un sous-ensemble d'individus, parmi lesquels la performance diagnostique et/ou pronostique d'un marqueur tumoral serait optimale, permettrait de réduire significativement la quantité de faux positifs inhérente à certains marqueurs tumoraux comme le PSA ou le CA-125. Or, il est aujourd'hui avéré que cette tâche est difficilement réalisable sur la seule évaluation clinique et histopathologique ; dans le cadre du cancer de la prostate par exemple, les patients avec la même présentation clinique et histologique peuvent avoir des profils moléculaires et des évolutions radicalement différents [56].

De plus, le volume d'informations et le nombre de marqueurs disponibles sont en constante augmentation. Plus important encore, ces dernières années ont vu l'émergence de bases de données de santé plus complètes et structurées, intégrant pour un même patient une multitude de sources d'information. Il est donc désormais possible d'intégrer ces données hétérogènes dans une approche transversale parfois qualifiée de « multi-vues » [57], incluant notamment des données cliniques, biologiques, génomiques, radiologiques et environnementales. En conséquence d'une telle augmentation en quantité et en variété de la donnée, il devient de plus en plus difficile de créer des scores manuellement, capables d'intégrer la multitude de paramètres enregistrés. C'est pourquoi ces scores de nouvelle génération, réalisés à partir de *machine learning* peuvent être particulièrement adaptés à l'exploitation de cette typologie de données, et permettent de faciliter par exemple l'identification de sous-ensembles pertinents d'individus, ou de réaliser sur un panel varié d'autres tâches comme l'identification de nouveaux biomarqueurs [57-59].

Au-delà de l'expansion du volume de données, la biologie et plus spécifiquement les marqueurs tumoraux restent un domaine d'application délicat. Il est en effet difficile pour le cerveau humain d'appréhender simultanément les variations inter-individuelles et extra-individuelles [60], qui se manifestent dans chacun des biomarqueurs, en même temps que leurs impacts sur le diagnostic.

Il est encore plus difficile d'intégrer l'ensemble de ces informations et connaissances dans des scores. Comme évoqué dans l'article « Utilisation clinique et évolution des biomarqueurs circulants à l'ère de l'oncologie personnalisée : des marqueurs protéiques aux scores clinico-biologiques » par Perrier *et al.* [61] de cette même issue, le lien entre le diagnostic et la cinétique des marqueurs tumoraux reste extrêmement complexe à modéliser et nécessite l'ajout d'autres facteurs pour arriver à des spécificités et sensibilités acceptables [55]. De plus, les signaux faibles dans la cinétique des biomarqueurs tumoraux associés au profil biologique global du patient ne sont, à ce jour, pas considérés dans la plupart des scores. Les algorithmes de *machine learning*, appliqués sur un large panel de patients, sont quant à eux capables de distinguer les paramètres mais aussi les variations les plus pertinentes à suivre pour l'ensemble des pronostics ou des diagnostics ainsi que pour le suivi thérapeutique [58].

L'apprentissage automatique peut ainsi intervenir dans l'élaboration de scores diagnostiques et/ou pronostiques, par l'intégration d'une multitude de sources de données telles que des marqueurs biologiques mais aussi les antécédents cliniques du patient. La généralisation de cet usage permettrait d'améliorer des marqueurs qui, pris isolément, offrent de modestes performances tels que le PSA et le CA-125 [62,63]. Pour le cancer de la prostate, par exemple, l'intelligence artificielle pourrait aider à dépister les patients les plus à risque. Le développement d'un

modèle de réseau neuronal dense a amélioré, par exemple, la précision du diagnostic dans le dépistage du cancer de la prostate [64]. Les résultats de cette étude démontrent l'utilité des méthodes d'apprentissage automatique dans la stratification du risque de cancer de la prostate lors de l'utilisation de paramètres biochimiques [64]. Cette approche a déjà été expérimentée en utilisant des données d'imagerie notamment dans le cancer du sein [65] et le mélanome [66].

Du fait du volume et de la variété grandissante des données disponibles mais aussi de la complexité des processus biologiques dans les différents types de cancer, les algorithmes capables d'analyser des millions de cas par seconde dépasseront de fait les performances des scores actuels. En utilisant plus d'informations à notre disposition, la sensibilité et spécificité de ces algorithmes de *machine et deep learning* dépasseront celles des scores connus à ce jour [59]. Il existe aujourd'hui un nombre grandissant de recherches démontrant la supériorité de ces algorithmes face aux méthodes plus traditionnelles. Même les scores les plus aboutis tels que CancerSEEK® cité plus haut, qui se fondent sur des modèles linéaires, peuvent être améliorés à l'aide d'algorithmes de *deep learning* [20,67].

Toutefois, si une multitude d'algorithmes de *machine learning* ont été développés et publiés ces dernières années, peu d'entre eux sont utilisés en pratique courante malgré les performances affichées. Il reste encore un certain nombre de verrous à lever, comme la standardisation des nomenclatures et des résultats de biologie. Une fois résolus, ils permettront une réimplantation simplifiée des algorithmes qui facilitera leur utilisation auprès des professionnels de santé. Envisager que ces algorithmes soient intégrés au parcours de soins est déjà une réalité. Avec le temps, ils compléteront les outils du clinicien et seront des alliés de choix pour lui permettre, dans un temps limité, de poser des diagnostics précis, suivre l'efficacité thérapeutique de manière plus fine, et prévenir certaines pathologies. Le diagnostic serait alors posé en fonction du profil biologique complet du patient et accompagnerait le clinicien dans le choix des traitements optimaux, pour maximiser les chances de rémission. Le parcours de soins deviendra alors véritablement « personnalisé ».

Les biomarqueurs prédictifs de la réponse à l'immunothérapie

L'immunothérapie anticancéreuse est l'une des avancées médicales les plus importantes de ces dix dernières années dans le traitement contre le cancer. Grâce aux avancées récentes de la recherche en immunothérapie anticancéreuse, le rôle fondamental des points de contrôle immunitaire a été mis en lumière. C'est une étape déterminante puisque cette découverte est à l'origine d'une nouvelle génération de traitements considérés aujourd'hui comme le cœur de l'immunothérapie anticancéreuse par les oncologues. Au cours de la dernière décennie, deux points de contrôles ont fait l'objet de développements

cliniques qui ont complètement transformé la prise en charge thérapeutique de certains cancers, tels que le mélanome non-résécable et/ou métastatique. La protéine 4 associée aux lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4) est un point de contrôle (*checkpoint*) négatif de l'activation antigénique des cellules T, qui permet d'inhiber l'activation des cellules T naïves en se liant avec plus d'affinité que la molécule co-stimulatrice CD28 aux ligands partagés CD80 et CD86 sur les cellules présentatrices d'antigènes dans le ganglion lymphatique. La stratégie thérapeutique consiste à lever l'action freinatrice de CTLA-4 afin de renforcer et stimuler la présentation au système immunitaire des néo-antigènes sécrétés par la tumeur. Un anticorps monoclonal contre le CTLA-4, l'ipilimumab, a été le premier agent approuvé pour le traitement du mélanome métastatique, ayant démontré un bénéfice de survie dans un essai randomisé de phase III [68]. Un autre point de contrôle actionnable en clinique est le récepteur PD-1, présent à la surface des lymphocytes T cytotoxiques (LTC CD8 +) et dont le ligand PD-L1 est localisé à la surface des cellules tumorales. L'interaction PD-1/PD-L1 est à l'origine de l'anergie des LTC suivie de leur mort cellulaire par apoptose. Cette interaction peut être bloquée par des anticorps monoclonaux inhibiteurs ciblant soit le point de contrôle (PD-1) soit son ligand (PD-L1) et empêchant ainsi l'interaction PD-1/PD-L1. Ceci a pour conséquence de lever le frein du système immunitaire permettant ainsi aux LTC de pouvoir reconnaître les cellules cancéreuses et de les éliminer. En 2021, cinq inhibiteurs de l'interaction PD-1/PD-L1 sont disponibles en France, dont trois anticorps monoclonaux anti-PD-L1, l'atézolizumab, le durvalumab et l'avélumab, et deux anticorps monoclonaux anti-PD-1, le nivolumab et le pembrolizumab. D'autres inhibiteurs sont en développement comme le zimberelimab. Ces anticorps ont démontré leur efficacité en induisant une réponse thérapeutique prolongée par rapport aux chimiothérapies conventionnelles de référence notamment dans le mélanome métastatique. Dans le cancer du poumon non à petites cellules, ces anticorps sont également une arme thérapeutique même si seule une fraction d'entre eux peut bénéficier de l'immunothérapie.

Ces molécules ont révolutionné la place de l'immunothérapie anticancéreuse et sont considérées comme une innovation thérapeutique majeure en oncologie. Cependant, de nombreux patients ont un bénéfice limité en termes de réponse et de survie. Cela a rapidement conduit à étudier les thérapies combinées pour améliorer les taux de réponse. La recherche de nouveaux biomarqueurs prédictifs de la réponse à l'immunothérapie et d'éventuelles résistances secondaires est donc cruciale. A ce jour, l'expression de PD-L1 est le seul marqueur validé en routine, malgré d'importantes limitations, en partie dues à la difficulté de définir des seuils d'expression significatifs. D'autre part, le profilage moléculaire apporte des informations précieuses montrant par exemple qu'une charge mutationnelle tumorale ou TMB (nombre de mutations sur le nombre de bases

séquencées avec des disparités dans le mode de calcul) élevée et le statut MSI (instabilité des microsatellites) étaient associés à des taux de réponse plus élevés dans presque tous les types de cancer. Une application prometteuse de l'ADNtc est l'estimation du TMB et du statut MSI, évalués généralement après réalisation du séquençage de l'exome (WES) ou du génome entier (WGS) en NGS (*next-generation sequencing*) sur la biopsie liquide. Le TMB sanguin (bTMB) semble correspondre au TMB, et il a déjà été validé en pratique clinique pour certains types de cancer comme le cancer de la prostate [69] ou le cancer du poumon non à petites cellules [70]. La détection MSI basée sur l'ADNtc à l'aide de la technologie *Guardant 360® CDx* s'est avérée hautement concordante avec les tests basés sur les tissus et représente un test validé analytiquement et cliniquement dans ce domaine [71].

La progression du cancer vers les phénotypes invasifs et les interactions cellulaires dans le microenvironnement tumoral qui entravent la surveillance immunitaire reposent sur des réseaux complexes de régulation. Les modifications épigénétiques telles que les modifications des marques des histones et de la structure de la chromatine, l'altération du statut de méthylation de l'ADN au niveau de promoteurs spécifiques et les changements dans l'expression des microARN peuvent altérer le phénotype cellulaire et remodeler le microenvironnement tumoral permettant aux cellules de croître et d'échapper à la surveillance immunitaire [72]. Ce sont donc des pistes intéressantes à explorer comme des biomarqueurs de la résistance à l'immunothérapie.

Conclusion

Grâce aux progrès technologiques et avec le développement croissant des techniques moléculaires, notamment de

séquençage à haut débit, nous assistons à une mutation technologique avec l'émergence d'une multitude de nouveaux biomarqueurs moléculaires qui peuvent guider la prise en charge thérapeutique de façon de plus en plus spécifique notamment avec les thérapies ciblées. Ces biomarqueurs tumoraux sont désormais détectables de façon non invasive grâce aux biopsies liquides et permettent la détection de cibles thérapeutiques pertinentes mais pourront également être utilisés, à l'avenir, à la fois dans le dépistage de masse, la détection précoce et le diagnostic d'un cancer mais aussi dans le pronostic, le suivi de la maladie, l'évaluation de l'efficacité thérapeutique et la détection de résistances thérapeutiques. Les biologistes et les cliniciens doivent s'approprier les avantages et les limitations des biopsies liquides par rapport aux biopsies tissulaires afin de les intégrer de façon efficace en routine clinique notamment en établissant des recommandations, encore parcellaires à ce jour. Par ailleurs, l'utilisation d'associations de biomarqueurs afin d'établir des scores clinico-biologiques est une des voies majeures émergentes en oncologie clinique qui permet d'obtenir de meilleures performances. L'agrément de ces nouveaux tests et scores par une instance officielle et dans un cadre nosologique précis, est un préalable obligatoire à leur mise en application (selon le type, le stade du cancer, en dépistage primaire ou secondaire...).

Dans ce contexte, une médecine de précision, individualisée et efficiente s'annonce grâce aux nouveaux outils moléculaires génomiques, métabolomiques, métagénomiques... exploités de concert avec les données cliniques et d'imagerie grâce à l'intelligence artificielle.

Déclaration de liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat Res* 2007;635(2-3):105-17.
- [2] Pantel K, Alix-Panabières C. Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res* 2013;73(21):6384-8.
- [3] Keller L, Belloum Y, Wikman H, Pantel K. Clinical relevance of blood-based ctDNA analysis: mutation detection and beyond. *Br J Cancer* 2021;124(2):345-58.
- [4] Denis JA, Nectoux J, Lamy P-J, Sciellour CRL, Guermouche H, Alary A-S, et al. Développement des analyses moléculaires par PCR digitale pour la pratique clinique: principes, mise en œuvre pratique et recommandations. *Annales de Biologie Clinique* 2018;76(5):505-23.
- [5] Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med* 2012;63:199-215.
- [6] Martins VR, Dias MS, Hainaut P. Tumor-cell-derived microvesicles as carriers of molecular information in cancer. *Curr Opin Oncol* 2013;25(1):66-75.
- [7] Poulet G, Massias J, Taly V. Liquid biopsy: general concepts. *Acta Cytol* 2019;63(6):449-55.
- [8] Chen M, Zhao H. Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Hum Genomics* 2019;13(1):34.
- [9] Rolfo C, Mack PC, Scagliotti GV, Baas P, Barlesi F, Bivona TG, 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.
- [10] Lamy P-J, van der Leest P, Lozano N, Becht C, Duboeuf F, Groen HJM, et al. Mass spectrometry as a highly sensitive method for specific circulating tumor DNA Analysis in NSCLC: a comparison study. *Cancers (Basel)* 2020;12(10):E3002.
- [11] Denis JA, Perrier A, Nectoux J, Lamy P-J, Alary A-S, Sarafan-Vasseur N, et al. Développement des analyses moléculaires par PCR digitale pour la pratique clinique: positionnement, applications actuelles et perspectives. *Annales de Biologie Clinique* 2019;77(6):619-37.
- [12] Tie J, Cohen JD, Wang Y, Christie M, Simons K, Lee M, et al. Circulating tumor DNA analyses as markers of recurrence risk and benefit of adjuvant therapy for stage III colon cancer. *JAMA Oncol* 2019;5(12):1710-7.

A. Perrier, P. Hainaut, A. Guenoun, D-P Nguyen, P-J Lamy, F. Guerber, et al.

- [13] Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure. *Nat Rev Clin Oncol* 2019;16(7):409-24.
- [14] Kruger S, Heinemann V, Ross C, Diehl F, Nagel D, Ormanns S, et al. Repeated mutK-RAS ctDNA measurements represent a novel and promising tool for early response prediction and therapy monitoring in advanced pancreatic cancer. *Ann Oncol* 2018;29(12):2348-55.
- [15] Cescon DW, Bratman SV, Chan SM, Siu LL. Circulating tumor DNA and liquid biopsy in oncology. *Nat Cancer* 2020;1(3):276-90.
- [16] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science* 2013;339(6127):1546-58.
- [17] Yachida S, White CM, Naito Y, Zhong Y, Brosnan JA, Macgregor-Das AM, et al. Clinical significance of the genetic landscape of pancreatic cancer and implications for identification of potential long-term survivors. *Clin Cancer Res* 2012;18(22):6339-47.
- [18] Jones S, Chen W-D, Parmigiani G, Diehl F, Beerenwinkel N, Antal T, et al. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(11):4283-8.
- [19] Vogelstein B, Kinzler KW. The path to cancer -three strikes and you're out. *N Engl J Med* 2015;373(20):1895-8.
- [20] Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 2018;359(6378):926-30.
- [21] Villar S, Le Roux-Goglin E, Gouas DA, Plymoth A, Ferro G, Boniol M, et al. Seasonal variation in TP53 R249S-mutated serum DNA with aflatoxin exposure and hepatitis B virus infection. *Environ Health Perspect* 2011;119(11):1635-40.
- [22] Liu MC, Oxnard GR, Klein EA, Swanton C, Seiden MV, Consortium CCGA. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA. *Ann Oncol* 2020;31(6):745-59.
- [23] Chen X, Gole J, Gore A, He Q, Lu M, Min J, et al. Non-invasive early detection of cancer four years before conventional diagnosis using a blood test. *Nat Commun* 2020;11(1):3475.
- [24] Scher HI, Jia X, de Bono JS, Fleisher M, Pienta KJ, Raghavan D, et al. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. *Lancet Oncol* 2009;10(3):233-9.
- [25] Cohen SJ, Punt CJA, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2009;20(7):1223-9.
- [26] Mu Z, Wang C, Ye Z, Austin L, Civan J, Hyslop T, et al. Prospective assessment of the prognostic value of circulating tumor cells and their clusters in patients with advanced-stage breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2015;154(3):563-71.
- [27] Pang S, Li H, Xu S, Feng L, Ma X, Chu Y, et al. Circulating tumour cells at baseline and late phase of treatment provide prognostic value in breast cancer. *Sci Rep* 2021;11(1):13441.
- [28] Riethdorf S, Müller V, Loibl S, Nekljudova V, Weber K, Huober J, et al. Prognostic impact of circulating tumor cells for breast cancer patients treated in the neoadjuvant "Geparquattro" trial. *Clin Cancer Res* 2017;23(18):5384-93.
- [29] Denis JA, Lacorte J-M. Détection des mutations RAS dans les cellules tumorales circulantes: applications au cancer colorectal et perspectives. *Annales de Biologie Clinique* 2017;75(6):607-18.
- [30] Denis JA, Patroni A, Guillem E, Pépin D, Benali-Furet N, Wechsler J, et al. Droplet digital PCR of circulating tumor cells from colorectal cancer patients can predict KRAS mutations before surgery. *Mol Oncol* 2016;10(8):1221-31.
- [31] Bastos DA, Antonarakis ES. CTC-derived AR-V7 detection as a prognostic and predictive biomarker in advanced prostate cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2018;18(2):155-63.
- [32] Ross K, Pailler E, Faugeron V, Taylor M, Oulhen M, Auger N, et al. The potential diagnostic power of circulating tumor cell analysis for non-small-cell lung cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2015;15(12):1605-29.
- [33] Cayrefourcq L, Mazard T, Joosse S, Solassol J, Ramos J, Assenat E, et al. Establishment and characterization of a cell line from human circulating colon cancer cells. *Cancer Res* 2015;75(5):892-901.
- [34] Soler A, Cayrefourcq L, Mazard T, Babayan A, Lamy P-J, Assou S, et al. Autologous cell lines from circulating colon cancer cells captured from sequential liquid biopsies as model to study therapy-driven tumor changes. *Sci Rep* 2018;8(1):15931.
- [35] Cui M, Wang H, Yao X, Zhang D, Xie Y, Cui R, et al. Circulating MicroRNAs in cancer: potential and challenge. *Front Genet* 2019;10:626.
- [36] Ng EKO, Li R, Shin VY, Jin HC, Leung CPH, Ma ESK, et al. Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer detection. *PLOS ONE* 2013;8(1):e53141.
- [37] Ioannidis JPA, Khoury MJ. Evidence-based medicine and big genomic data. *Hum Mol Genet* 2018;27(R1):R2-7.
- [38] Ngiam KY, Khor IW. Big data and machine learning algorithms for health-care delivery. *Lancet Oncol* 2019;20(5):e262-73.
- [39] Greaves M. Evolutionary determinants of cancer. *Cancer Discov* 2015;5(8):806-20.
- [40] Andor N, Graham TA, Jansen M, Xia LC, Aktipis CA, Petritsch C, et al. Pan-cancer analysis of the extent and consequences of intratumor heterogeneity. *Nat Med* 2016;22(1):105-13.
- [41] Kikutake C, Yoshihara M, Sato T, Saito D, Suyama M. Pan-cancer analysis of intratumor heterogeneity associated with patient prognosis using multidimensional measures. *Oncotarget* 2018;9(102):37689-99.
- [42] Balachandran VP, Oksza M, Zhao JN, Makarov V, Moral JA, Remark R, et al. Identification of unique neoantigen qualities in long-term survivors of pancreatic cancer. *Nature* 2017;551(7681):512-6.
- [43] Oksza M, Riaz N, Makarov V, Balachandran VP, Hellmann MD, Solovyyov A, et al. A neoantigen fitness model predicts tumour response to checkpoint blockade immunotherapy. *Nature* 2017;551(7681):517-20.
- [44] Rantalainen M. Application of single-cell sequencing in human cancer. *Brief Funct Genomics* 2018;17(4):273-82.
- [45] Huang L, Ma F, Chapman A, Lu S, Xie XS. Single-cell whole-genome amplification and sequencing: methodology and applications. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2015;16:79-102.
- [46] Maby P, Corneau A, Galon J. Phenotyping of tumor infiltrating immune cells using mass-cytometry (CyTOF). *Methods Enzymol* 2020;632:339-68.
- [47] Zhang X, Li B. Updates of liquid biopsy in oral cancer and multiomics analysis. *Oral Dis* 2021. <http://dx.doi.org/10.1111/odi.14064>.
- [48] Martins VR, Dias MS, Hainaut P. Tumor-cell-derived microvesicles as carriers of molecular information in cancer. *Curr Opin Oncol* 2013;25(1):66-75.
- [49] Landegren U, Hammond M. Cancer diagnostics based on plasma protein biomarkers: hard times but great expectations. *Mol Oncol* 2021;15(6):1715-26.
- [50] Li Y, Xun D, Li L, Wang B, Lv J, Liu H, et al. Deep dive on the proteome of human body fluids: a valuable data resource for biomarker discovery. *Cancer Genomics Proteomics* 2021;18(4):549-68.
- [51] Hood L, Friend SH. Predictive, personalized, preventive, participatory (P4) cancer medicine. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8(3):184-7.
- [52] Booth CM, Karim S, Mackillop WJ. Real-world data: towards achieving the achievable in cancer care. *Nat Rev Clin Oncol* 2019;16(5):312-25.
- [53] Tian Q, Price ND, Hood L. Systems cancer medicine: towards realization of predictive, preventive, personalized and participatory (P4) medicine. *J Intern Med* 2012;271(2):111-21.
- [54] Rajkumar A, Dean J, Kohane I. Machine learning in medicine. *N Engl J Med* 2019;380(14):1347-58.
- [55] LeCun Y, Bengio Y, Hinton G. Deep learning. *Nature* 2015;521(7553):436-44.
- [56] Cucchiara V, Cooperberg MR, Dall'Era M, Lin DW, Montorsi F, Schalken JA, et al. Genomic

- markers in prostate cancer decision making. *Eur Urol* 2018;73(4):572–82.
- [57] Li Y, Wu F-X, Ngom A. A review on machine learning principles for multi-view biological data integration. *Brief Bioinform* 2018;19(2):325–40.
- [58] van IJzendoorn DGP, Suzhai K, Briaire-de Bruijn IH, Kostine M, Kuijjer ML, Bovée JVMG. Machine learning analysis of gene expression data reveals novel diagnostic and prognostic biomarkers and identifies therapeutic targets for soft tissue sarcomas. *PLoS Comput Biol* 2019;15(2):e1006826.
- [59] Huang S, Cai N, Pacheco PP, Narrandes S, Wang Y, Xu W. Applications of support vector machine (SVM) learning in cancer genomics. *Cancer Genomics Proteomics* 2018;15(1):41–51.
- [60] McPherson RA, Pincus MR. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods E-Book. Elsevier Health Sciences; 20111769.
- [61] Perrier A, Hainaut P, Pierre-Jean Lamy PJ, Guenoun A, Nguyen DP, et al. Utilisation clinique et évolution des biomarqueurs circulants à l'ère de l'oncologie personnalisée : des marqueurs protéiques aux scores clinico-biologiques. *Bull Cancer* 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bulcan.2021.11.010>.
- [62] Churpek MM, Yuen TC, Winslow C, Meltzer DO, Kattan MW, Edelson DP. Multicenter comparison of machine learning methods and conventional regression for predicting clinical deterioration on the wards. *Crit Care Med* 2016;44(2):368–74.
- [63] Quesada JA, Lopez-Pineda A, Gil-Guillén VF, Durazo-Arvizu R, Orozco-Beltrán D, López-Domenech A, et al. Machine learning to predict cardiovascular risk. *Int J Clin Pract* 2019;73(10):e13389.
- [64] Perera M, Mirchandani R, Papa N, Breemer G, Effeindzourou A, Smith L, et al. PSA-based machine learning model improves prostate cancer risk stratification in a screening population. *World J Urol* 2021;39(6):1897–902.
- [65] McKinney SM, Sieniek M, Godbole V, Godwin J, Antropova N, Ashrafian H, et al. International evaluation of an AI system for breast cancer screening. *Nature* 2020;577(7788):89–94.
- [66] Shofty B, Artzi M, Shtrozberg S, Fanizzi C, DiMeco F, Haim O, et al. Virtual biopsy using MRI radiomics for prediction of BRAF status in melanoma brain metastasis. *Sci Rep* 2020;10(1):6623.
- [67] Wong K-C, Chen J, Zhang J, Lin J, Yan S, Zhang S, et al. Early cancer detection from multianalyte blood test results. *iScience* 2019;15:332–41.
- [68] Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363(8):711–23.
- [69] Qiu P, Poehlein CH, Marton MJ, Laterza OF, Levitan D. Measuring tumor mutational burden (TMB) in plasma from mCRPC patients using two commercial NGS assays. *Sci Rep* 2019;9(1):114.
- [70] Wang Z, Duan J, Cai S, Han M, Dong H, Zhao J, et al. Assessment of blood tumor mutational burden as a potential biomarker for immunotherapy in patients with non-small cell lung cancer with use of a next-generation sequencing cancer gene panel. *JAMA Oncol* 2019;5(5):696–702.
- [71] Willis J, Lefterova MI, Artyomenko A, Kasi PM, Nakamura Y, Mody K, et al. Validation of microsatellite instability detection using a comprehensive plasma-based genotyping panel. *Clin Cancer Res* 2019;25(23):7035–45.
- [72] Perrier A, Didelot A, Laurent-Puig P, Blons H, Garinet S. Epigenetic mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Biomolecules* 2020;10(7):1061.