

Un sous-groupe de cancer gastrique positif au virus d'Epstein-Barr (EBV) identifié pour sa sensibilité à l'immunothérapie

A Subgroup of Gastric Cancer Positive for Epstein-Barr Virus (EBV) Identified for Its Sensitivity to Immunotherapy

D. Grazziotin-Soares · J.-P. Lotz

© Lavoisier SAS 2019

Résumé Plusieurs études ont montré une association entre l'infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV) et la survenue de nombreux cancers chez l'homme, dont certains carcinomes gastriques. Le potentiel oncogénique de l'EBV a été largement exploré, mais les mécanismes précis de la carcinogénèse ne sont pas complètement compris. Les protéines virales codées par EBV sont connues pour notamment déréguler des voies de signalisation de la réponse aux dommages de l'ADN (DDR). Cette inactivation du DDR entraîne alors un accroissement de l'instabilité génomique qui favoriserait la transformation cellulaire pour générer des cellules malignes. Dans un article récemment publié dans la revue *Nature Medicine*, une caractérisation moléculaire des tissus tumoraux et de l'ADN tumoral circulant (ADNtc) provenant de patients non sélectionnés atteints de cancer gastrique métastatique, traités par pembrolizumab, a été réalisée. Ces travaux ont montré que, dans la cohorte étudiée, une forte corrélation pouvait être établie entre la positivité de PD-L1, EBV(+) et MSI-H. Ces résultats suggèrent que le cancer gastrique EBV(+) pourrait être, à l'instar des tumeurs MSI-H, une cible à fort potentiel pour observer un bénéfice clinique de l'immunothérapie. Ainsi, le statut EBV pourrait servir, en clinique, de biomarqueur pour identifier les patients atteints de cancer gastrique, pouvant bénéficier ou non d'une immunothérapie. Au-delà de leur intérêt clinique, ces travaux ouvrent également la voie vers une meilleure caractérisation des mécanismes moléculaires sous-tendant ce phénomène.

Mots clés Virus d'Epstein-Barr · Immunothérapie · Cancer gastrique · Biomarqueurs · Instabilité génomique

D. Grazziotin-Soares · J.-P. Lotz (✉)
Service d'oncologie médicale et de thérapie cellulaire,
hôpital Tenon,
Alliance pour la recherche en cancérologie (ApreC),
institut universitaire de cancérologie (IUC),
AP-HP Sorbonne Université,
4, rue de la Chine, F-75970 Paris, France
e-mail : jean-pierre.lotz@aphp.fr

Abstract Several studies have shown an association between Epstein-Barr virus (EBV) infection and some human cancers such as a subgroup of gastric carcinomas. The oncogenic potential of EBV has been widely explored but the exact processes conducting carcinogenesis are not yet fully understood. EBV-encoded viral proteins are known to deregulate the DNA damage response (DDR) signaling pathways. DDR inactivation leads to genomic instability and promote cellular transformation to generate malignant cells. In a recently published article in *Nature Medicine*, a molecular characterization of tumor tissue and circulating tumor DNA (ctDNA) from non-selected patients with metastatic gastric cancer treated with pembrolizumab was conducted. This work showed that a strong correlation between PD-L1 positivity, EBV(+) and MSI-H could be established in the studied cohort. These results suggest that EBV(+) gastric cancer might, similarly to MSI-H tumors, be a target of high-potential for getting a clinical benefit of immunotherapy. Together, these data suggest that EBV status might thus serve as a clinical biomarker to identify patients with gastric cancer who would benefit from immunotherapy. Beyond their clinical interest, these works also pave the way for additional fundamental researches that will allow better characterizing the underlying molecular mechanisms.

Keywords Epstein-Barr virus · Immunotherapy · Gastric cancer · Biomarkers · Genomic instability

On estime que 15 à 20 % des cancers sont associés à une infection. Les bactéries et les parasites multicellulaires sont responsables d'une fraction non négligeable de ces cancers, mais la majorité d'entre eux semble être associée à une infection virale. Chaque année, au moins 1,3 million de nouveaux cas de cancer dans le monde, soit 10 à 12 % du nombre total de nouveaux diagnostics, sont probablement liés à une infection virale [1]. Bien que les cancers liés à de telles infections soient moins fréquents dans les pays développés, leur incidence augmente en raison du nombre croissant de patients

immunodéprimés par voie iatrogène (par exemple, les patients traités par des médicaments immunosuppresseurs), ou en raison de leur infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

À ce jour, au moins cinq virus à ADN (le virus d'Epstein-Barr ou EBV, le HPV, l'herpès virus associé au sarcome de Kaposi KSHV ou HHV-8, le polyomavirus à cellules de Merkel ou MCV et le virus de l'hépatite B ou HBV) et trois virus à ARN (le virus lymphotrope T humain de type 1 ou HTLV-1, le virus de l'hépatite C ou VHC et le VIH) ont été associés à des cancers humains. Ces virus produisent leurs effets oncogéniques par des mécanismes distincts. Ils peuvent par exemple induire directement la transformation des cellules infectées en leur permettant de réguler leur croissance et leur survie. Alternativement, la reconnaissance des gènes viraux par les cellules hôtes peut initier la réponse aux dommages de l'ADN (DDR), processus dont de nombreux virus ont besoin pour se répliquer. L'activation soutenue de la voie DDR augmente alors l'instabilité génétique, ce qui induit une augmentation du taux de mutation et accélère l'acquisition d'altérations chromosomiques dans les cellules hôtes [2].

L'EBV est un virus omniprésent qui infecte la majeure partie de la population humaine. Cette infection peut être associée à de nombreux cancers humains — y compris un sous-ensemble des carcinomes gastriques. En 1990, des génomes d'EBV ont été détectés dans des carcinomes gastriques par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) [3] et d'hybridation in situ (HIS) ciblant l'acide ribonucléique codé par EBV1 (EBER1). Ces résultats ont alors indiqué que les carcinomes gastriques associés à l'EBV (EBVaGC) représentent environ 10 % de l'ensemble des carcinomes gastriques diagnostiqués dans le monde [4]. Sachant que les EBVaGC semblent issus de la prolifération monoclonale d'une cellule initiatrice infectée de manière persistante par l'EBV, l'infection par ce virus semble donc intervenir lors des stades précoces de la carcinogénèse gastrique [5]. Il a également été rapporté que l'inflammation de l'estomac favoriserait le recrutement des lymphocytes B infectés par EBV à proximité des épithéliums gastriques, ce qui augmenterait la fréquence d'infection des épithéliums par ce virus [6].

Le potentiel oncogénique de l'EBV a été largement exploré, mais les mécanismes précis de la carcinogénèse ne sont pas complètement compris. Des travaux ont néanmoins montré que l'EBV déclenche une DDR lors de la primo-infection et de la réactivation lytique [7]. Parmi les différentes hypothèses étudiées, le potentiel oncogénique de l'EBV pourrait être principalement lié à l'infection des lymphocytes B par le virus et à la production de protéines qui interféreraient avec le contrôle et la régulation du cycle cellulaire. Les cellules infectées, à l'inverse de cellules normales dont le temps de vie est limité, se diviseraient alors de façon incontrôlée. De plus, le virus disposerait de différentes stratégies afin d'éviter que les cellules infectées ne soient reconnues et

détruites par le système immunitaire. La combinaison de ces processus serait impliquée dans le développement de cancer associé à l'EBV.

À la suite des travaux réalisés dans le cadre du projet TCGA (The Cancer Genome Atlas), un sous-groupe de cancer gastrique avec positivité pour l'EBV a pu être identifié [8]. Ce sous-groupe, appelé EBV(+), présente des caractéristiques moléculaires de sensibilité à l'immunothérapie telles qu'une infiltration intra- ou péri-tumorale de cellules immunitaires et une amplification du locus du chromosome 9 contenant les gènes codant pour PD-L1 et PD-L2.

Récemment, dans un article publié dans la revue *Nature Medicine*, Kim et al. [9] ont présenté les résultats d'une analyse moléculaire des tissus tumoraux et de l'ADN tumoral circulant (ADNtc) provenant de 61 patients non sélectionnés atteints de cancer gastrique métastatique, traités dans le cadre d'un essai clinique de phase 2 par pembrolizumab. Leurs résultats ont amené à l'identification de biomarqueurs potentiellement utiles pour permettre la sélection des patients pouvant bénéficier ou non des inhibiteurs des points de contrôle immunitaire. Le statut de microsatellites, la positivité PD-L1, les variations dans l'ADN tumoral circulant et le statut EBV ont été explorés.

Dans cet essai clinique (NCT#02589496), une biopsie tissulaire suivie d'un séquençage de l'exome complet (WES, *whole exome sequencing*) a été réalisée sur l'ensemble des patients afin de déduire le sous-type TCGA (The Cancer Genome Atlas) et la charge mutationnelle des tumeurs. Puis, le séquençage de l'ARN a été réalisé afin de catégoriser les tumeurs des patients selon les signatures moléculaires précédemment identifiées dans le contexte du cancer gastrique [10]. Un test de positivité à l'EBV de la tumeur primaire a également été réalisé avec profilage de l'ADN viral. Enfin, les patients ont été suivis longitudinalement au travers d'une série de collecte de leur ADNtc plasmatique. L'objectif primaire de cette étude a été de corréler les résultats cliniques observés avec les biomarqueurs génomiques et moléculaires identifiés.

L'étude a été conduite entre mars 2016 et février 2017. L'âge médian des patients était de 57 ans (26 à 78), et la majorité des patients étaient des hommes (70,5 %). Tous les patients étaient d'origine coréenne. Parmi eux, 32 patients (52,5 %) ont reçu le pembrolizumab comme traitement de deuxième ligne et 29 (47,5 %) l'ont reçu en troisième ligne. Deux tiers des patients présentaient plus de deux sites métastatiques. Six patients (9,8 %) ont été confirmés EBV(+) et sept (11,5 %) étaient MSI-H. À la date finale retenue pour l'analyse des résultats en lien avec le traitement, les évaluations des réponses étaient disponibles pour 57 patients (93,4 %) avec un suivi médian de 16,2 mois.

Des réponses complètes (RC) ont été observées chez trois patients (4,9 % ; IC 95 % : [1,3–13,7]), 12 patients ont atteint une réponse partielle confirmée (RP) [19,7 % ; IC 95 % : [10,6–31,8)] et 20 patients (32,8 % ; IC 95 % : [21,3–46,0])

avaient une maladie stable. Un taux de réponse globale (ORR) de 24,6 % (IC 95 % : [14,7–37,3]) et un taux de contrôle de la maladie (DCR) de 57,4 % (IC 95 % : [44,1–70,0]) ont été observés. Les trois patients avec RC avaient des réponses durables de plus de six mois et étaient encore en rémission au moment de l'analyse. Parmi les 12 patients atteints de RP, huit ont présenté plus de 50 % de réduction de la charge tumorale mesurée par les critères RECIST 1.1. La durée médiane de la réponse parmi ceux avec une RP était de 7,2 mois (1,5–13,0).

En parallèle au suivi clinique, les auteurs ont analysé les réponses en termes de positivité PD-L1 et de la charge mutationnelle. Pour l'analyse de PD-L1, ils ont utilisé le score CPS qui a été défini comme le nombre de cellules marquées PD-L1 (cellules tumorales, lymphocytes, macrophages) divisé par le nombre total de cellules tumorales viables, multiplié par 100. Les échantillons ont été considérés comme positifs lorsqu'il présentait un score CPS supérieur ou égal à 1. Parmi les 55 patients pour lesquels le score CPS PD-L1 a pu être déterminé (valeur limite CPS de 1 %), les ORR pour PD-L1(+) [$n = 28$] versus PD-L1(-) [$n = 27$] étaient respectivement de 50,0 % (14 sur 28) et de 0,0 % ($p < 0,001$). Afin d'évaluer la charge mutationnelle dans les tumeurs, l'ADNtc a été utilisé et caractérisé par WES. L'ADNtc a été séquencé en utilisant un kit commercial évaluant le statut mutationnel d'un panel de 73 gènes (Guardant360). Cette méthode a montré une concordance générale importante avec la charge mutationnelle évaluée directement par séquençage tissulaire (régression linéaire $r^2 = 0,54$). La charge mutationnelle mesurée avant le début du traitement et immédiatement après le début du traitement par séquençage de l'ADNtc a pu être corrélée avec une bonne réponse clinique au pembrolizumab [11]. En effet, les quatre patients qui ont présenté une augmentation de leur taux d'ADNtc ont en effet tous subi une progression de la maladie dans les 100 jours (SSP médiane, 66 versus 123 j) qui ont fait suite au début du traitement. À l'inverse, les patients qui ont présenté une diminution de leur taux d'ADNtc ont démontré des améliorations significatives dans DCR (92 versus 25 %, $p = 0,009$), ORR (58 versus 0 %, $p = 0,0486$) et PFS (médiane, 123 versus 66 j : $p = 0,029$).

De façon remarquable, la réponse au pembrolizumab a été associée, dans cette étude, à la positivité à l'EBV mais aussi à une instabilité des microsatellites élevée. Sur les sept patients atteints de cancer gastrique MSI-H, six ont obtenu une réponse spectaculaire (trois RC, trois RP), tandis qu'un patient était réfractaire au pembrolizumab. De manière intéressante, les six patients atteints de cancer gastrique EBV(+) ont obtenu une RP avec une durée médiane de réponse de 8,5 mois.

Les auteurs ont, ensuite, analysé les réponses en termes de positivité PD-L1 par CPS. Parmi les 55 patients pour lesquels l'analyse de PD-L1 était réalisable (seuil de CPS de

1 %), les ORR pour PD-L1(+) [$n = 28$] contre PD-L1(-) [$n = 27$] étaient respectivement de 50,0 % (14 sur 28) et 0 % ($p < 0,001$). Ensemble, les ORR étaient de 50,0 % dans les cancers gastriques PD-L1(+), de 85,7 % dans les cancers gastriques MSI-H et de 100 % dans le cancer gastrique EBV(+). Enfin, sur les six répondeurs EBV(+), un patient qui a présenté un cancer gastrique avec plusieurs lésions hépatiques a subi une chirurgie curative après avoir reçu huit cycles de pembrolizumab. Il est à noter qu'ici les statuts EBV(+) et MSI-H s'excluaient mutuellement.

Ensemble, ces travaux montrent que, dans la cohorte étudiée, une forte corrélation entre la positivité de PD-L1 et d'EBV(+) pouvait être établie comme cela est déjà le cas entre PD-L1 et MSI-H. Ces résultats suggèrent que le cancer gastrique EBV(+) pourrait être, à l'instar des tumeurs MSI-H, une cible à fort potentiel pour observer un bénéfice clinique de l'immunothérapie. Sur la base de ces observations, les auteurs concluent que les statuts MSI-H et EBV(+) peuvent être, en plus de la positivité de PD-L1 mesurée par IHC, des biomarqueurs fiables et robustes pour prédire la réponse des patients à l'immunothérapie.

Pour conclure, il est intéressant de mentionner que le statut EBV a également été exploré par d'autres groupes de recherche qui ont pu montrer que les cancers gastriques EBV(+) avec une charge mutationnelle faible pourraient constituer un sous-groupe de tumeurs de type MSS qui répondraient à l'immunothérapie [12]. Panda et al. ont en effet pu récemment identifier un patient atteint d'un cancer gastrique métastatique présentant un bénéfice clinique significatif du traitement avec l'avélumab, un anticorps anti-PD-L1. Cette tumeur ne montrait pourtant aucun signe de charge de mutation élevée ni d'anomalie de réparation, mais était fortement positive pour la présence d'ARN codé par l'EBV.

Ces données suggèrent que le statut EBV devrait être testé en routine clinique afin d'identifier les patients, atteints de cancer gastrique, pouvant bénéficier ou non d'une immunothérapie. Au-delà de leur intérêt clinique, ces travaux ouvrent également la voie vers une meilleure caractérisation des mécanismes moléculaires sous-tendant ce phénomène.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt.

Références

1. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, et al (2012) Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* 13:607–15
2. Hollingworth R, Grand RJ (2015) Modulation of DNA damage and repair pathways by human tumour viruses. *Viruses* 7:2542–91
3. Burke AP, Yen TS, Shekitka KM, Sobin LH (1990) Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Mod Pathol* 3:377–80

4. Shibata D, Weiss LM (1992) Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* 140:769–74
5. Young LS, Rickinson AB (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4:757–68
6. Iizasa H, Nanbo A, Nishikawa J, et al (2012) Epstein-Barr virus (EBV)-associated gastric carcinoma. *Viruses* 4:3420–39
7. Hau PM, Tsao SW (2017) Epstein-Barr virus Hijacks DNA damage response transducers to orchestrate its life cycle. *Viruses* 9:341
8. TCGA, Cancer Genome Atlas Research Network (2014) Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 513:202–9
9. Kim ST, Cristescu R, Bass AJ, et al (2018) Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition in metastatic gastric cancer. *Nat Med* 24:1449–58
10. Cristescu R, Mogg R, Ayers M, et al (2017) Mutational load (ML) and T-cell-inflamed microenvironment as predictors of response to pembrolizumab. *J Clin Oncol* 35 (suppl,1-1)
11. Raja R, Kuziora M, Brohawn PZ, et al (2018) Early reduction in ctDNA predicts survival in patients with lung and bladder cancer treated with durvalumab. *Clin Cancer Res* 24:6212–22
12. Panda A, Mehnert JM, Hirshfield KM, et al (2018) Immune activation and benefit from avelumab in EBV-positive gastric cancer. *J Natl Cancer Inst* 110:316–20