

Consensus de la Société Française d'Endocrinologie sur les effets secondaires endocriniens des nouvelles thérapies anti-cancéreuses

Avis d'experts sur les toxicités endocriniennes : précautions à prendre lors de la réalisation et de l'interprétation des dosages hormonaux sous immunothérapie*

Najiba Lahlou¹, Véronique Raverot²

¹ BPR-AS, Département d'Endocrinologie Spécialisée, Pannes

² Laboratoire d'endocrinologie, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, Groupement Hospitalier Est, CHU de Lyon

Mots clés : immunothérapie, dosage hormonaux, interférences

* Cet article est la version française de l'article ci-dessous, publié en anglais, dans les *Annales d'Endocrinologie: Ann Endocrinol (Paris)*. 2018 Jul 11. pii: S0003-4266(18)31182-X. doi: 10.1016/j.ando.2018.07.004. [Epub ahead of print]

Résumé

À côté des inhibiteurs de la tyrosine kinase et des inhibiteurs de mTOR, les nouvelles thérapies anti-cancéreuses recourent à des anticorps dirigés contre des récepteurs de la tyrosine kinase ou bloquant les points de contrôle de la réponse immunitaire anti-tumorale. Il s'agit toujours d'anticorps monoclonaux et leur dénomination commune internationale indique leur origine avant la finale « mab » : ainsi la dénomination se termine par o-mab pour les anticorps murins, par xi-mab pour les anticorps chimériques ; par zu-mab pour les anticorps humanisés et enfin par u-mab pour les anticorps humains. Lorsque les dosages prescrits font intervenir dans leur principe analytique des anticorps monoclonaux d'origine murine et lorsque l'anticorps thérapeutique contient des séquences murines, des interférences analytiques peuvent être redoutées si les patients développent des anticorps hétérophiles contre l'anticorps thérapeutique. L'anticorps hétérophile interférent est selon les cas un HAMA (anticorps anti-murins), un HACA (anticorps anti-chimérique) ou un HAHA (anticorps anti-anticorps humanisé). Il est donc recommandé, lorsque des immuno-essais sont prescrits à des patients sous immunothérapie, de s'assurer de la nature de l'anticorps thérapeutique, et s'il est susceptible de contenir des séquences murines de chercher à mettre en évidence la présence d'anticorps hétérophiles puis à les neutraliser.

Les nouvelles thérapies anti-cancéreuses reposent sur des principes très différents des chimiothérapies conventionnelles, qu'il s'agisse d'inhibiteurs de la tyrosine kinase, d'inhibiteurs de mTOR ou d'anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre une protéine portée par la cellule tumorale. Il existe actuellement une quinzaine d'inhibiteurs de tyrosine kinase : leur dénomination commune internationale DCI se termine par « ib » ou « inib ». La protéine mTOR est une protéine kinase sérine-thréonine spécifique qui régule la croissance et la survie cellulaire. La DCI de ces inhibiteurs,

qui sont utilisés dans un grand nombre de cancers solides, se termine par « -rolimus » ou « ib ». Il est important de noter que les inhibiteurs de la tyrosine kinase ou de mTOR ne sont pas des protéines et ne sont donc pas capables d'entraîner la production d'anticorps hétérophiles.

Il n'en est pas de même des anticorps utilisés en immunothérapie anti-tumorale. Il peut s'agir d'anticorps dirigés contre des récepteurs de la tyrosine kinase ou d'anticorps bloquant les points de contrôle de la réponse immunitaire anti-tumorale. Ces anticorps peuvent induire la production

par le patient d'anticorps hétérophiles, susceptibles de créer des interférences analytiques dans les immuno-essais. Le risque dépend du type d'anticorps mais aussi des techniques utilisées.

Production des anticorps monoclonaux (mab) à visée thérapeutique

Anticorps murins (o-mab, le « o » de *mouse* -ou de *souris*- signant la source de l'anticorps)

Depuis les travaux de Kohler et Milstein [1], on sait produire des anticorps monoclonaux murins en fusionnant des lym-

phocytes B murins, immunisés contre une protéine étrangère déterminée, avec des cellules de myélome capables de se multiplier indéfiniment.

Ce type d'anticorps a été utilisé en thérapeutique dès 1981. Cependant ces anticorps ont l'inconvénient d'induire systématiquement après l'administration au patient la production d'anticorps hétérophiles anti-souris (*Human Anti Mouse Antibodies ou HAMA*) qui viennent neutraliser dans une certaine mesure l'anticorps thérapeutique, et quelquefois vont jusqu'à avoir des effets délétères.

Leur présence n'est donc pas toujours associée à des symptômes, mais pour le biologiste la présence de HAMA dans le prélèvement a l'inconvénient de produire des interférences artéfactuelles dans les immuno-essais utilisant des anticorps réactifs d'origine murine, comme développé ci-dessous.

Font partie de cette classe d'anticorps : Bexxar®, Blincyto®, Orthoclone-Okt3®, Removab®, Zevalin®.

Anticorps chimériques (xi-mab, «xi» du grec chimère)

L'ingénierie moléculaire a permis de créer dès les années 80 des anticorps chimériques humain-souris (revue dans [2]) en fusionnant les gènes codant les régions variables d'un anticorps murin avec les régions constantes d'une immunoglobuline humaine. Ces anticorps chimériques conservent la spécificité et l'affinité de l'anticorps murin parental. Ils ont l'avantage d'avoir une demi-vie beaucoup plus longue que les anticorps murins et d'être mieux tolérés. Les traitements par xi-mab induisent moins d'effets secondaires pathologiques mais la production d'anticorps anti-murins est cependant toujours à craindre, et elle a pu être rapportée comme intense chez 40% des patients [3]. L'incidence pour le biologiste est importante car, si la probabilité d'une interférence des HAMAs dans les immuno-essais est diminuée par rapport aux traitements par o-mab, le risque reste présent.

Font partie de cette classe d'anticorps : Adcetris®, Erbitux®, Flixabi®,

Inflectra®, Mabthera®, Remicade®, Remsima®, Rituxan®, Rixaton®, Sylvant®, Truxima®.

Anticorps humanisés (zu-mab, où «zu» associe le «z» de *humanized* et le «u» de *human*)

L'humanisation consiste à transférer dans un cadre humain accepteur des acides aminés de régions CDR (*complementary determining regions*) provenant de l'anticorps monoclonal donneur d'origine murine [4]. Il faut évidemment sélectionner l'anticorps humain le plus approprié, tel que la majorité des acides aminés des régions charpentes soient identiques dans l'anticorps humain accepteur et l'anticorps murin donneur. Au total, les anticorps humanisés comprennent un minimum de séquences spécifiquement murines. Cependant, près de 10% des patients recevant un traitement par anticorps humanisé développent des anticorps anti-anticorps humanisé [3]. Cela signifie que l'on peut craindre une interférence par anticorps hétérophiles lorsqu'on doit pratiquer des immuno-essais chez des patients traités par zu-mab, y compris pendant le suivi [5]. Font partie de cette classe d'anticorps : Actemra®, Avastin®, Cimahe®®, Entyvio®, Gazyvaro®, Herceptin®, Keytruda®, Lemtrada®, Lucentis®, Mylotarg®, Perjeta®.

Anticorps humains (u-mab)

C'est pour l'instant l'étape ultime d'obtention d'anticorps à visée thérapeutique ne comportant que des séquences d'acides aminés présentes dans les immunoglobulines IgG humaines. Différents procédés ont été décrits, combinaison à partir de banques d'acides aminés de domaines variables et constants humains, ou utilisation de souris transgéniques. On doit s'attendre à ce que l'administration de tels anticorps n'induisse pas la production d'anticorps dirigés contre l'anticorps thérapeutique, et effectivement cela n'a pas été rapporté jusqu'ici. De plus, on peut supposer qu'un tel anticorps anti-anticorps humain induit par le traitement (si cela peut se produire), n'aura pas d'affinité pour l'anticorps murin utilisé comme réactif dans un immuno-es-

sai et donc n'introduira pas d'interférence dans les dosages.

Font partie de cette classe d'anticorps : Arzerra®, Cyramza®, Opdivo®, Prolia®, Vertibix®, Xgeva®, Yervoy®.

Comme on peut le constater dans les listes données ci-dessus et dans le tableau (page suivante), la syllabe définissant l'origine de l'anticorps (o, xi, zu et u) n'apparaît jamais dans le nom de spécialité, d'où la nécessité de toujours se reporter à la dénomination commune internationale (DCI) pour savoir à quelle classe d'anticorps on a affaire [6]. Le recensement année par année de 1997 à 2014 des molécules thérapeutiques approuvées par la FDA [7] montre qu'il y a de plus en plus de zu-mab et u-mab à la disposition des oncologues. Mais cela ne préjuge pas de la fréquence de l'emploi des molécules plus anciennes, comme les xi-mab et les o-mab.

Production des anticorps pour immuno-essai

Antisérum polyclonaux

Les dosages biologiques par immuno-essai ont été inventés en 1959 par Berson et Yallow [8] pour doser l'insuline en utilisant comme réactif le sérum d'un diabétique qui avait développé des anticorps anti-insuline. L'insuline utilisée alors en thérapeutique n'étant pas d'origine humaine. Depuis, on a pu obtenir des antisérum contre n'importe quelle protéine et contre des molécules non protéiques comme les stéroïdes, à condition de les complexer à une protéine. Le réactif obtenu est un mélange d'anticorps provenant de clones lymphocytaires différents, et donc un réactif polyclonal, qu'il est possible de purifier plus ou moins pour optimiser l'affinité et la spécificité.

Ces antisérum sont à la base des dosages par immuno-compétition où la concentration de l'antisérum est minimale pour que l'analyte entre en compétition avec le traceur pour les sites de fixation à l'anticorps. Comme ils sont générés chez des animaux vivants, leur production dépend de la taille et de la longévité de l'animal, qui est soit un lapin, soit une chèvre ou

un autre mammifère de taille appréciable, mais généralement pas une souris.

En conséquence, il y a peu de risque qu'un antisérum anti-souris (HAMA) induit chez un patient par un traitement o-mab, xi-mab ou hu-mab, produise une interférence gênante dans les immuno-essais utilisant des anticorps polyclonaux d'origine lapin ou chèvre.

Anticorps monoclonaux

Comme dit plus haut, la production des anticorps monoclonaux a été conçue par Kohler et Milstein dès 1975 et ces anticorps ont rapidement été utilisés pour construire des immuno-essais. Il se trouve que l'affinité de ces anticorps, produits de cellules hybrides, est presque toujours inférieure à celle des antisérums polyclonaux sélectionnés pour monter un immuno-essai. Aussi, la plupart du temps, les anticorps monoclonaux ne sont pas utilisés en immunocompétition, mais en immunométrie, où la concentration des anticorps est très élevée par rapport à celle de l'analyte, et notamment en immunométrie « 2 sites », dite « sandwich », où l'analyte est exposé à deux anticorps monoclonaux différents spécifiques chacun d'un site immunogénique déterminé de l'analyte. Cela implique que l'analyte doit avoir une certaine taille pour éviter l'encombrement stérique des deux anticorps réactifs, soit en fait la taille d'un peptide d'au moins 10 amino-acides.

Comme ces anticorps monoclonaux réactifs sont pratiquement toujours développés à partir de lymphocytes murins, une interférence analytique est toujours à craindre dans les dosages réalisés sur des prélèvements provenant de patients traités par un mab contenant des séquences murines. Récemment ont pu être sélectionnés des anticorps monoclonaux d'affinité suffisante pour construire un immuno-essai par compétition en vue du dosage d'une hormone stéroïde. Ce qui veut dire qu'il faudra aussi craindre des interférences par anticorps hétérophiles antisouris dans le dosage de certains stéroïdes sur des prélèvements de patients sous immunothérapie, sauf si on dose le stéroïde par spectrométrie de masse.

Le tableau (page ci-contre) répertorie par ordre alphabétique et sous leur nom commercial les anticorps monoclonaux actuellement autorisés en oncologie.

Interférences des anticorps anti-mab dans les immuno-essais

Des interférences sont à craindre chez les patients développant des anticorps contre l'anticorps thérapeutique, plus précisément contre les sites non-humains de ces anticorps, et dans un dosage utilisant comme réactifs des anticorps d'origine murine, c'est-à-dire en fait, dans les dosages d'hormones utilisant au moins un anticorps monoclonal. L'anticorps interfèrent pourra être selon les cas un HAMA (anticorps contre des antigènes murins), un HACA (anticorps contre des antigènes chimériques) ou un HAAA (anticorps contre des antigènes humanisés) [3].

Les publications faisant état des effets secondaires des traitements par anticorps monoclonal signalent parfois la proportion de sujets développant de tels anticorps. Si l'on se rapporte aux revues citées plus haut, on peut pour simplifier dire que la probabilité de trouver des anticorps anti-mab thérapeutiques chez un patient traité est de l'ordre de 90% après o-mab, 40% après xi-mab, 10% après zu-mab, et sans doute 0% après u-mab. Cependant aucune publication ne rapporte de données concernant les interférences analytiques possibles et on ne peut que les décrire en tenant compte de ce que l'on sait des mécanismes des immuno-essais.

Les anticorps anti-souris développés chez un patient peuvent créer essentiellement deux types d'interférences :

- Soit l'anticorps induit s'accroche simultanément aux deux anticorps réactifs, réalisant un faux sandwich. Dans ce cas, le signal est celui d'un taux élevé et donc le résultat sera un faux taux fort de l'analyte à mesurer.
- Soit l'anticorps induit est en telle quantité dans le prélèvement qu'il sature tous les sites des anticorps réactifs, au point qu'aucun sandwich n'est possible. En conséquence le signal fourni est très faible et le résultat sera un faux taux bas de l'analyte.

Ce type d'interférence peut être neutralisé par un prétraitement de l'échantillon avec des HAMA blockers (type tube HBT, ou *Heterophilic Blocking Tubes*) avant l'immuno-dosage.

Cela ne préjuge pas de l'occurrence d'autres interférences sans rapport avec le traitement immunothérapeutique, comme les interférences avec les composants du signal utilisé dans l'immunoessai (streptavidine, biotine...). Ces dernières interactions peuvent provoquer une majoration ou une minoration du résultat, et peuvent concerner un ou plusieurs paramètres du même axe endocrinien. Elles sont souvent fournisseur-dépendantes et sont en général démasquées en changeant de système analytique.

Ainsi, chez un patient traité par un mab contenant des séquences murines, on peut suspecter une interférence analytique aussi bien devant un taux faible que devant un taux fort obtenu par immuno-essai, ce qui sous-entend que l'on dispose de valeurs de référence appropriées.

Les valeurs de référence

Par définition, les valeurs de référence sont obtenues à partir d'un échantillon bien sélectionné de la population dite de référence, prenant en compte notamment le sexe et l'âge. Les limites de l'intervalle de référence doivent être calculées par la méthode des percentiles plutôt qu'à partir de la moyenne et de l'écart-type, car la distribution des valeurs individuelles est rarement gaussienne. Ainsi seront établies les bornes inférieure et supérieure en calculant les percentiles 2,5 et 97,5 si l'on désire un intervalle incluant 95% des sujets supposés normaux, ou les percentiles 5 et 95 si l'on se contente de 90%. Il est bon de se rappeler également que chaque borne est affectée d'un intervalle de confiance définissant l'incertitude, dont l'ampleur dépend de la taille de l'échantillon qui a servi à les établir. Autant dire qu'affirmer qu'une valeur est supérieure ou inférieure à la « normale » n'est possible qu'avec précaution.

Pour un paramètre hormonal donné, il n'y a pas pour l'instant d'intervalle de référence

Tableau. Anticorps monoclonaux utilisés en oncologie, par ordre alphabétique du nom commercial (la syllabe en rouge dans la dénomination internationale DCI identifie la nature de l'anticorps comme indiqué dans la partie Production des anticorps monoclonaux (mab) à visée thérapeutique). LNH, lymphome non hodgkinien.

Nom déposé	DCI	Cible	Indications	1 ^{re} AMM
Actemra®	Tocilizumab	Interleukine-6	Maladie de Castelman	2009
Adcetris®	Brentuximab	CD30	Lymphome hodgkinien	2011
Arzerra®	Ofatumumab	CD20	Leucémie lymphoïde	2009
Avastin®	Bevacizumab	VEGF	Cancer colorectal, ovaire, poumon, rein, glioblastome	2004
Bexxar®	Tositumomab	CD20	LNH	2003
Blinicyto®	Blinatumomab	CD19 et CD3	Leucémies aiguës	2017
Cimaher®	Nimotuzumab	EGFR	Gliome du tronc	2004
Cyamza®	Ramucirumab	Récepteur du VEGF	Cancer gastrique	2014
Entyvio®	Vedolizumab	Intégrine alpha4beta7	Maladie de Crohn	2014
Erbix®	Cetuximab	EGFR	Cancer colorectal, cancer ORL	2004
Flixabi®	Infliximab	TNFalpha	Maladie de Crohn	1998
Gazyvaro®	Obinutuzumab	CD20	Lymphomes	2013
Herceptin®	Trastuzumab	HER2	Cancer du sein	1998
Inflectra®	Infliximab	TNFalpha	Maladie de Crohn	1998
Keytruda®	Pembrolizumab	PD1	Mélanome	2014
Lemtrada®	Alemtuzumab	CD52	Leucémies lymphoïdes	2013
Lucentis®	Ranibizumab	VEGF-A	Néovascularisations choroïdiennes	2006
Mabthera®	Rituximab	CD20	LNH, leucémies	1997
Mylotarg®	Gemtuzumab	CD33	Leucémie myéloïde	2014
Orthoclone-Okt3®	Muromomab	CD3	Transplantation rénale	1986
Opdivo®	Nivolumab	PD1-récepteur	Mélanome, cancer bronchique, carcinome rénal, lymphome	2015
Perjeta®	Pertuzumab	HER2	Cancer du sein	2012
Prolia®	Dénosumab	RankL	Métastases osseuses	2011
Remicade®	Infliximab	TNFalpha	Maladie de Crohn	1998
Removab®	Catumaxomab	EpCAM et CD3	Ascites malignes	2009
Remsima®	Infliximab	TNFalpha	Maladie de Crohn	1998
Rituxan®	Rituximab	CD20	LNH, leucémies	1997
Rixaton®	Rituximab	CD20	LNH, leucémies	1997
Sylvant®	Siltuximab	Interleukine-6	Maladie de Castelman	2014
Truxima®	Rituximab	CD20	LNH, leucémies	1997
Vectibix®	Panitumumab	EGFR	Cancer colorectal	2006
Xgeva®	Dénosumab	RankL	Métastases osseuses	2010
Yervoy®	Ipilimumab	CTLA4	Mélanomes avancés	2011
Zevalin®	Ibritumomab	CD20	Lymphomes	2002

universel valable quel que soit l'immuno-essai utilisé. Les écarts entre réactifs commerciaux sont souvent importants, comme on peut le constater en examinant les résultats des contrôles inter-laboratoires nationaux de ProBioQual ou internationaux du *College of American Pathologists (CAP)* ou du *National External Quality Assurance Scheme britannique (NEQAS)*.

Il faut donc s'en tenir, si l'on utilise des réactifs commerciaux, aux valeurs de référence fournies par le fabricant, en espérant qu'elles sont bien définies, comme rappelé plus-haut, ou à celles établies par le laboratoire si ses biologistes en ont eu la possibilité.

Recommandations de bonne pratique

Pour exécuter en sécurité par immuno-essai une prescription de dosages biologiques sur le prélèvement d'un patient sous traitement par anticorps monoclonal, certaines précautions sont nécessaires, et un échange entre l'endocrinologue prescripteur et le biologiste référent devra avoir lieu au moindre doute concernant un résultat. Il faudra ainsi :

1. Confronter le résultat obtenu avec l'intervalle de référence approprié fourni par le fabricant des réactifs utilisés ou établi in situ.
2. Devant une discordance clinico-biologique, s'informer de la nature de l'anticorps administré : murin (o), chimérique (xi), humanisé (zu), ou humain (u).

En effet, la probabilité d'interférence dans un immuno-essai utilisant comme réactif un ou des anticorps développés chez la souris décroît de quasi 100% s'il s'agit d'un o-mab, à probablement 0% s'il s'agit d'un u-mab.

3. Si le taux du paramètre mesuré est suspecté artificiellement bas, confronter à la clinique et au besoin explorer d'autres fonctions sécrétoires.
4. Si le taux du paramètre mesuré est suspecté artificiellement élevé, il est possible de :
 - vérifier le parallélisme par dilutions successives. L'absence de parallélisme pouvant signifier la présence d'une interférence ;
 - chercher la présence dans le sang circulant d'un anticorps dirigé contre les anticorps réactifs utilisés devant un résultat discordant avec le reste du bilan biologique et/ou avec la clinique. Cette recherche s'effectue en précipitant les immunoglobulines supposées présentes (technique de précipitation par PEG quand une dilution est permise) ou en les neutralisant sur des tubes HBT (si l'on cherche à mesurer des hormones libres, qu'on ne peut pas diluer) et en réitérant le dosage après cette opération. L'identification de l'anticorps détecté lors de cette étape n'est pas réalisée en routine, car elle met en oeuvre des techniques plus sophistiquées comme le western blot, par exemple.

5. Devant un résultat discordant avec le reste du bilan biologique et/ou avec la clinique, préférer les techniques de dosages par spectrométrie de masse aux dosages par immuno-essai, pour s'affranchir des anticorps réactifs et donc des interférences potentielles.

Remerciements : le texte a été relu et commenté par les Drs Fatma Chebbi et Marc Roger, que les auteurs tiennent particulièrement à remercier pour leurs critiques et suggestions.

N. Lahlou, V. Raverot
najiba.lahlou@free.fr

RÉFÉRENCES

1. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256:495-97.
2. Hudson PJ, Souriau C. Engineered antibodies. *Nat Med* 2003; 9:129-34.
3. Hwang WYK, Foote J. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods San Diego Calif* 2005; 36:3-10.
4. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 1986; 321:522-25.
5. Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, Blumhardt LD, Rice GPA, Libonati MA, et al. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2003; 348:15-23.
6. Scheen AJ. [New advances in therapeutic use of monoclonal antibodies]. *Rev Med Liege* 2009; 64:253-56.
7. Marabelle A, Gray J. Tumor-targeted and immune-targeted monoclonal antibodies: Going from passive to active immunotherapy. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62:1317-25.
8. Yalow RS, Berson SA. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* 1959; 184 (Suppl 21):1648-49.