

Émergence de biomarqueurs de la réponse aux anti-angiogéniques

Bernard Lévy

Institut des Vaisseaux et du Sang, PARRC@HEGP, Inserm U965, Hôpital Lariboisière, Paris
bernard.levy@inserm.fr

En moins de 6 ans, l'introduction des nouveaux médicaments qui ciblent l'angiogenèse, essentiellement des anticorps dirigés contre le VEGF puis des inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase qui inhibent les voies de signalisation en aval du VEGF, a radicalement changé la pratique clinique. On pourrait s'attendre à ce que l'activité de médicaments élaborés pour inhiber des processus moléculaires bien identifiés soit évaluable par des marqueurs spécifiques relatifs à la cible visée. En réalité, la nature, la fiabilité et la représentativité des biomarqueurs de la réponse aux anti-angiogéniques restent encore largement à définir. Les principales difficultés pour évaluer l'efficacité des médicaments anti-angiogéniques tiennent aux différences liées aux types de tumeurs traitées, aux tissus et organes atteints, à leurs interactions éventuelles avec les différentes chimiothérapies, et à la variation de réponse aux anti-angiogéniques au cours du temps. Il est même courant de lire qu'il n'y a pas, aujourd'hui, de biomarqueur crédible de la réponse d'un patient ou d'une tumeur aux médicaments anti-angiogéniques.

Rakesh Jain écrivait il y a peu de temps dans *Nature Reviews Clinical Oncology* : « Il n'y a pas de biomarqueur validé pour sélectionner les patients qui répondront aux thérapies anti-angiogéniques » [1]. Cette phrase pourrait répondre, de manière négative mais expéditive, au titre de cet article ; cependant, même si aucun des biomarqueurs proposés n'a démontré, pour l'instant, une sensibilité et une spécificité suffisantes pour s'imposer dans la pratique clinique, il existe de nombreuses pistes que nous allons évoquer, certaines très sommairement, d'autres plus en détail [2-4]. L'auteur n'étant pas oncologue, il s'agit d'une revue de la littérature et en aucun cas d'un retour d'expérience.

Définitions, biais et pièges

Un biomarqueur est un paramètre qui peut être mesuré de manière objective et

qui peut servir d'indicateur à l'évolution d'un processus biologique normal ou pathologique ou à la réponse à une intervention thérapeutique, pharmacologique ou autre [5]. Les médicaments anti-angiogéniques ont montré des effets bénéfiques dans de nombreuses pathologies tumorales ; cependant, en raison d'effets secondaires non négligeables et de considérations économiques évidentes, il est important d'identifier un ou des marqueurs prédictifs de la réponse d'un patient à ces nouveaux agents. Une grande partie des réponses contradictoires apportées par la littérature tient à des problèmes méthodologiques plus ou moins faciles à identifier par le lecteur averti :

– la taille des échantillons et celle de l'étude étaient-elles suffisantes pour mettre en évidence un résultat statistiquement significatif ?

– les mesures du biomarqueur ont-elles été effectuées avant la première administration du traitement ? En d'autres termes : existe-t-il une mesure de la valeur basale du marqueur évalué ? Cette question semble triviale mais la réponse est souvent négative lorsqu'on analyse la littérature à ce sujet ;

– la variabilité de la valeur basale du paramètre, c'est-à-dire en l'absence de tout traitement, est-elle connue ? Il est évident que si la variabilité physiologique du biomarqueur pressenti est trop grande, il sera très difficile de s'en servir de manière prospective dans la pratique clinique ;

– les mesures ont-elles été faites dans des conditions de contrôle de qualité suffisantes (*Good Clinical Laboratory Practice*) ? Ce point est bien plus important que le simple respect d'une réglementation administrative plus ou moins autoritaire et contraignante. On sait par exemple que, dans un échantillon sanguin mal ou trop tardivement manipulé, l'activation des plaquettes *in vitro* libère de grandes quantités de PDGF et de VEGF. Par ailleurs, les concentrations plasmatiques des facteurs de croissance et en particulier du VEGF, sont très faibles et à la limite de la sensibilité des techniques de quan-

tification par ELISA. Les concentrations en VEGF circulant sont donc très différentes selon qu'elles sont plasmatiques ou sériques. De plus, dans un essai multicentrique, il suffit que le temps passé avant le dosage soit différent d'un centre à l'autre pour que l'essai soit ininterprétable.

Il existe encore un débat à propos du prélèvement sur lequel effectuer les dosages biologiques des facteurs de croissance : on utilise le plus souvent du sérum malgré le biais apporté par l'activation plaquettaire ; on dosera alors le VEGF plasmatique et le VEGF libéré *ex vivo* par les plaquettes [6] ; encore faut-il en être conscient et manipuler tous les échantillons dans les mêmes conditions.

On peut classer les marqueurs des anti-angiogéniques en cinq grandes catégories :

- les marqueurs provenant du tissu tumoral,
- ceux liés à des dosages plasmatiques ou sanguins,
- les marqueurs génétiques,
- les marqueurs utilisant les techniques d'imagerie,
- les facteurs indirects comme l'apparition d'une hypertension artérielle.

Dans ce numéro de *VEGF Actu*, nous ne traiterons que des trois premières catégories : marqueurs tissulaires, marqueurs circulants et marqueurs génétiques. L'utilisation des techniques d'imagerie et de paramètres indirects sera exposée dans le numéro d'automne de la revue.

Les marqueurs tissulaires tumoraux prédictifs de l'activité des inhibiteurs de l'angiogenèse

La caractérisation anatomo-pathologique et immuno-histochimique d'un prélèvement tissulaire est, dans la majorité des cancers, la clé du diagnostic tumoral. L'utilisation des pièces histologiques pour le dosage d'éventuels marqueurs de l'efficacité des inhibiteurs de l'angiogenèse est logique et, en principe, prometteuse. Il faut cependant garder en mémoire que

la biopsie ne représente souvent qu'une petite proportion de la masse tumorale et qu'elle peut ne pas être représentative de celle-ci.

Depuis plus de 10 ans, de nombreuses études ont été menées pour étudier la relation entre la densité microvasculaire dans la tumeur et la durée de survie des patients. Les principaux acteurs de l'angiogenèse étant le VEGF et son récepteur VEGF-R2, il était logique d'analyser les valeurs de la densité microvasculaire tumorale et celle des récepteurs VEGF-R2 et VEGF-R2 phosphorylés considérés comme marqueurs prédictifs de l'efficacité des inhibiteurs de VEGF. Quelques études portant sur un petit nombre de patients étaient prometteuses ; cependant, une analyse sur des échantillons de plus grande taille a fourni des résultats décevants [7]. On a proposé d'autres marqueurs prédictifs des effets des anti-VEGF comme le taux de prolifération des cellules endothéliales dans la tumeur, le nombre de cellules myéloïdes ou mésenchymateuses dans et autour des vaisseaux tumoraux. Les résultats sont encore partiels et discutés. Une voie intéressante pourrait être celle de la quantification des récepteurs VEGF-R2 phosphorylés dans la tumeur, en particulier dans le cancer du sein [8]. Les résultats préliminaires sont positifs ; il existe cependant plusieurs obstacles à la diffusion et à l'évaluation de ce marqueur : il n'existe pas (encore) d'anticorps parfaitement spécifiques des récepteurs R2 phosphorylés du VEGF et le marquage des récepteurs nécessite une fixation et une manipulation extrêmement rapides après la biopsie. Il faudra attendre une étude multicentrique suffisamment large et techniquement irréprochable pour conclure. Il faudra ensuite savoir si ce marqueur, s'il était montré qu'il est fiable et sensible, peut être utilisé en routine clinique.

Biomarqueurs circulants de l'activité des inhibiteurs de l'angiogenèse

Intuitivement, on imagine que la valeur de la concentration sanguine de VEGF avant traitement devrait être très utile pour prévoir la réponse au traitement anti-angiogénique de tumeurs qui répondent en général bien à un inhibiteur de l'angiogenèse (rein, ovaire, foie). En toute logique, l'un des tous premiers biomarqueurs circulants proposés a été la concentration plasmatique du VEGF-A. Cependant, la plupart des essais ont été négatifs et l'essai E4599, conduit chez des patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules, a été le seul à montrer la valeur

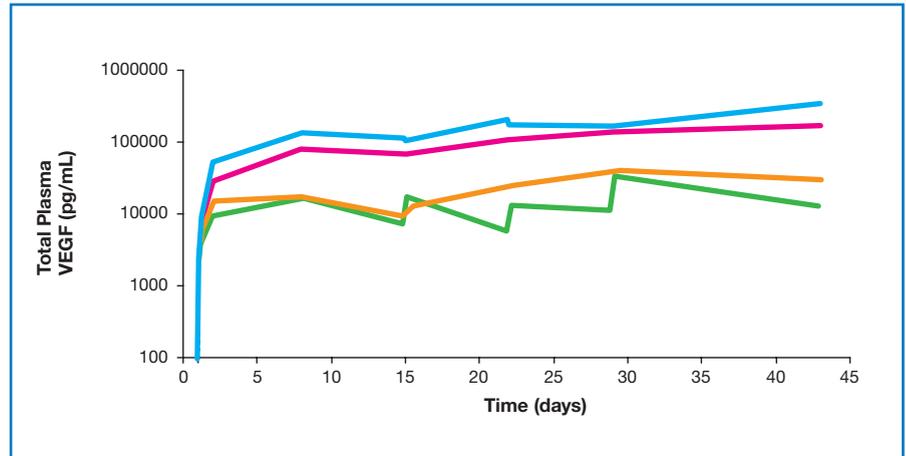


Figure 1. Concentration plasmatique en VEGF pour des doses de bevacizumab de 0,3 mg/kg (vert) ; 1 mg/kg (orange) ; 3 mg/kg (rouge) et 10 mg/kg (bleu). D'après [11].

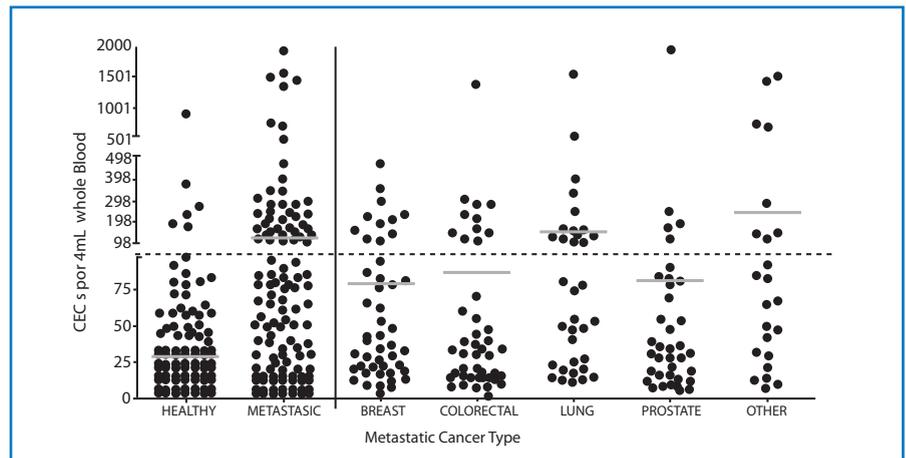


Figure 2. Nombre de cellules endothéliales circulantes dans 4 mL de sang périphérique veineux de 255 sujets sains et de 206 patients atteints de carcinome métastaté. La ligne horizontale pointillée représente la limite supérieure de la normale (97 CECs/4 mL de sang). D'après [13].

pronostique du taux plasmatique de VEGF-A avant traitement [9]. Toutefois, ces études sont, pour la plupart, ininterprétables en raison d'échantillons trop faibles et/ou de valeurs des concentrations plasmatiques de VEGF très faibles, dans une zone où les kits de dosage par ELISA ne sont ni linéaires ni sensibles [10]. Les essais de phase I du bevacizumab démontraient une augmentation très rapide, suivie d'une stabilisation prolongée, de la concentration plasmatique de VEGF après administration du médicament [11] (figure 1). On retrouve la même tendance chez les patients traités par des inhibiteurs de tyrosine kinases.

Le VEGF plasmatique, dont les concentrations plasmatiques augmentent en fonction des doses de bevacizumab, est probablement d'origine extracellulaire :

on suppose que les patients atteints de cancer ont une quantité importante de VEGF séquestrée dans la matrice extracellulaire. Le traitement par anticorps anti-VEGF mobiliserait ce VEGF qui deviendrait alors circulant. Il est tentant de supposer que la concentration plasmatique en VEGF pourrait être un bon marqueur prédictif de l'efficacité du bevacizumab. Malgré des résultats positifs dans une petite étude [12], cette hypothèse n'a pas été confirmée par la suite. D'autres études seraient nécessaires pour tester correctement cette hypothèse dans des cohortes de patients de taille suffisante.

Les cellules endothéliales circulantes (CEC) sont libérées par les vaisseaux normaux ou, plus probablement tumoraux. Les cellules progénitrices endothé-

liales circulantes (CPEC) proviennent, elles, de la moelle osseuse. On retrouve, chez le sujet sain, environ 1 à 20 CPEC par millilitre de sang périphérique et une concentration plus élevée en cas de processus tumoral avancé [13].

Dans les quelques études, dans lesquelles les concentrations de CEC et de CPEC circulantes ont été mesurées après administration d'anti-angiogéniques, un traitement efficace normalise ces valeurs alors que la progression de la maladie ne s'accompagne pas d'une diminution du nombre de CEC [14, 15]. Des taux élevés de CEC, avant traitement, chez les patients atteints de cancer du sein seraient un marqueur de réponse aux anti-angiogéniques [16].

Il faut souligner que les problèmes méthodologiques du dosage de CEC et des CPEC ne sont pas résolus de manière identique par tous les laboratoires et que nous sommes encore loin, dans ce domaine, de dosages de routine. Leroyer *et al.*, dans ce numéro de *VEGF Actu*, proposent l'utilisation du dosage des microparticules circulantes comme biomarqueur de l'activité tumorale et des effets des anti-angiogéniques. Un consensus commence à s'établir sur les techniques d'identification et de quantification de ces éléments cellulaires circulants : CEC, CPEC et microparticules. Un essai méthodologiquement rigoureux et de taille suffisante serait bien utile pour confirmer, ou non, l'intérêt de l'utilisation de ces biomarqueurs circulants faciles à prélever et à contrôler dans la durée.

Marqueurs génétiques de l'efficacité des anti-angiogéniques

L'angiogenèse est un phénomène dépendant du sujet et de son patrimoine génétique ; l'efficacité de son inhibition pharmacologique devrait également en dépendre.

Peu d'auteurs ont étudié la relation entre l'évolution clinique sous anti-VEGF et les polymorphismes des gènes du VEGF et de ses récepteurs, en recherchant des SNP associés aux paramètres cliniques (SNP : *single nucleotide polymorphism*).

Chez les patientes atteintes de cancer du sein métastatiques traitées par paclitaxel et bevacizumab, les génotypes VEGF-2578 AA et VEGF-1154 AA (deux polymorphismes localisés au niveau du promoteur du gène du VEGF-A) étaient associés à une meilleure survie sans progression et au taux de réponse au bevacizumab mais pas à la durée de survie globale [17]. Dans une autre étude chez des patientes atteintes de cancer de l'ovaire traitées

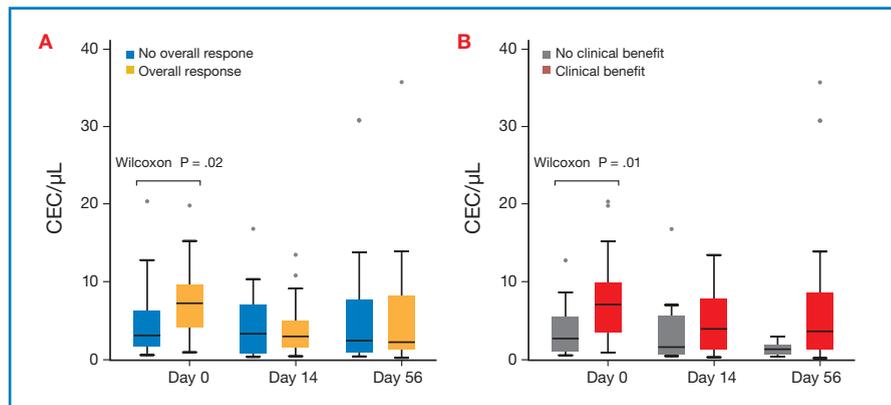


Figure 3. Réponse au traitement de patientes atteintes de cancer du sein avancé traitées par capecitabine (1 500 mg/j) et cyclophosphamide (50 mg/j) et bevacizumab (10 mg/kg toutes les 2 semaines). **A.** Colonnes bleues : pas de réponse globale, colonnes jaunes : réponse globale. **B.** Colonnes grises : pas de bénéfice clinique ; colonnes rouges : amélioration clinique. D'après [16].

par cyclophosphamide et bevacizumab [18], les patientes porteuses du génotype A/A ou A/T du nucléotide -251 du gène de l'interleukine 8 (IL-8) avaient un taux de réponse au traitement plus faible (19 % ; 0 %) que les patientes homozygotes T/T (50 % ; $P = 0,006$) ; les patientes porteuses du génotype C/C ou C/T du nucléotide +785 du gène de récepteur de chimio-cinase CXCR2 avaient une survie sans progression de 7,4 mois, alors que les patientes homozygotes T/T pour le même SNP avaient une survie sans progression de 3,7 mois ($P = 0,026$) ; enfin, les patientes ayant le génotype C/T du SNP +936 du gène du VEGF-A avaient une survie sans progression moyenne plus longue (11,8 mois) que celles porteuses du polymorphisme C/C (5,5 mois) ou T/T (3,5 mois) ($P = 0,06$). Ces résultats sont certes intéressants mais ils demandent confirmation dans d'autres études et nécessitent une meilleure compréhension de la relation structure-fonction de ces différents polymorphismes associés au pronostic et à la réponse au traitement anti-angiogénique.

En conclusion de cette première partie de la revue portant sur les biomarqueurs de l'efficacité des médicaments anti-angiogéniques, le bilan est prometteur mais objectivement maigre. Malgré l'abondance des hypothèses testées, aucune technique, aucun marqueur ne s'impose clairement comme un facteur prédictif sensible et spécifique de l'efficacité des médicaments anti-angiogéniques. La raison en est souvent que les essais n'ont pas eu l'envergure et la rigueur nécessaires pour être conclusifs. Nous traiterons, le trimestre prochain, de deux autres grandes caté-

gories de marqueurs prédictifs : celles liées aux techniques d'imagerie et celles faisant appel à des marqueurs indirects des effets des anti-angiogéniques comme l'hypertension artérielle par exemple.

Conflits d'intérêts : intervention ponctuelle pour Roche.

Références

- Jain RK, *et al.* *Nature Rev Clin Oncol* 2009 ; 6 : 327-38.
- Jubb AM, *et al.* *Lancet Oncol* 2010 ; 11 : 1172-83.
- Murukesh N, *et al.* *Br J Cancer* 2010 ; 102 : 8-18.
- Michael A, *et al.* *Int J Cancer* 2010 ; 127 : 1251-8.
- Atkinson AJ, *et al.* *Clin Pharmacol Ther* 2001 ; 69 : 89-95.
- George ML, *et al.* *Clin Cancer Res* 2000 ; 6 : 3147-52.
- Jubb AM, *et al.* *J Clin Oncol* 2006 ; 24 : 217-27.
- Wedam SB, *et al.* *J Clin Oncol* 2006 ; 24 : 769-77.
- Dowlati A, *et al.* *Clin Cancer Res* 2008 ; 14 : 1407-12.
- Yang JC, *et al.* *N Engl J Med* 2003 ; 349 : 427-34.
- Jayson GC, *et al.* *Eur J Cancer* 2005 ; 41 : 555-63.
- Siegel AB, *et al.* *J Clin Oncol* 2008 ; 26 : 2992-8.
- Rowand JL, *et al.* *Cytometry A* 2007 ; 71 : 105-13.
- Willett CG, *et al.* *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 8136-9.
- Beerepoot LV, *et al.* *Ann Oncol* 2005 ; 15 : 139-45.
- Dellapasqua S, *et al.* *J Clin Oncol* 2008 ; 26 : 4899-905.
- Schneider BP, *et al.* *J Clin Oncol* 2008 ; 26 : 4672-8.
- Schultheis AM, *et al.* *Clin Cancer Res* 2008 ; 14 : 7554-63.