

## Thérapeutique

# Les « surrogate marqueurs » dans le développement et le suivi des traitements anti-angiogéniques

Camille Grandclément, Christophe Borg

Service d'oncologie médicale et unité Inserm U645, CHU-Hôpital Jean Minjot, 25030 Besançon cedex

[<christophe.borg@efs.sante.fr>](mailto:christophe.borg@efs.sante.fr)

Lors du développement des cancers, les cellules tumorales ou stromales peuvent produire du VEGF, particulièrement en réponse à une hypoxie. Le VEGF peut agir comme un facteur de croissance autocrine (principalement *via* le signal induit par la liaison à VEGF-R2) ou pour les cellules endothéliales. Plusieurs stratégies d'inhibition de l'angiogenèse sont maintenant appliquées aux traitements de nombreux cancers. En parallèle de ce développement clinique, des programmes de recherche furent consacrés à l'identification de biomarqueurs pharmacodynamiques, qui pourraient caractériser précocement un effet anti-angiogénique efficace. De tels biomarqueurs permettraient : 1) de cibler la population pouvant bénéficier de ces traitements (enjeu clinique et pharmaco-économique) ; 2) des adaptations de doses ; 3) de détecter précocement les résistances aux traitements.

L'utilisation classique de la chimiothérapie s'est également accompagnée d'une recherche de paramètres facilitant la prédiction de l'efficacité ou de la toxicité des agents cytotoxiques.

De tels biomarqueurs sont classiquement utilisés pour le traitement des cancers des tumeurs germinales ( $\beta$ -HCG) ou des cancers de la prostate (PSA). La prescription des traitements anti-hormonaux

ou de l'herceptine repose également sur l'identification préalable des récepteurs ciblés par ces traitements, au sein du tissu tumoral. Hors, à ce jour, nous ne disposons pas de paramètres biologiques ou fonctionnels contribuant à la sélection ou à l'évaluation des traitements anti-angiogéniques.

Par ailleurs, les premières études soutenant la mise sur le marché du bevacizumab dans les cancers colorectaux métastatiques ont rapidement montré la nécessité d'identifier de nouvelles stratégies d'évaluation de ces biothérapies. Une première étude de phase II avait suggéré la supériorité du bevacizumab à une dose de 5 mg/kg comparativement à un traitement administré à 10 mg/kg. Au contraire, dans cette étude, la toxicité était dose dépendante [1]. Ces données soulignent le rôle nécessaire de « surrogate marqueurs » pour définir dès le développement des anti-angiogéniques en phase I/II, les doses biologiques efficaces, qui peuvent différer des doses maximales tolérées classiquement déterminées par les études de phase I. De plus, l'analyse de l'étude pivot de Hurwitz *et al.* a clairement établi que l'évaluation des critères RECIST s'avère insuffisante pour déterminer le bénéfice clinique. En effet, dans cette étude, le bevacizumab est également associé à un bénéfice en

terme de survie globale dans le groupe de patients n'ayant pas présenté de réponses objectives [2].

L'intérêt du ciblage thérapeutique des cellules de l'environnement tumoral, comme les cellules endothéliales, est l'absence d'instabilité génique dans ces cellules et donc potentiellement un moindre risque de résistance inductible. Néanmoins, dès 1997, Relf *et al.* ont suggéré qu'il existait une diversification des signaux angiogéniques lors de la progression des cancers [3]. La recherche de ces biomarqueurs n'allait pas être un chemin facile. Ceci suggérait également de développer des biomarqueurs dynamiques comme le dosage de molécules dans le sérum des patients ou l'utilisation de l'imagerie fonctionnelle, et non de recourir à l'évaluation des paramètres présents dans la tumeur primitive ou les biopsies initiales.

## Recherche concernant les surrogate marqueurs biologiques

### Utilisation de biomarqueurs pour guider la décision thérapeutique initiale

La plus logique des hypothèses à éprouver était que l'expression du VEGF dans la tumeur traitée pouvait être associée à l'efficacité du bevacizumab. Jubb *et al.*

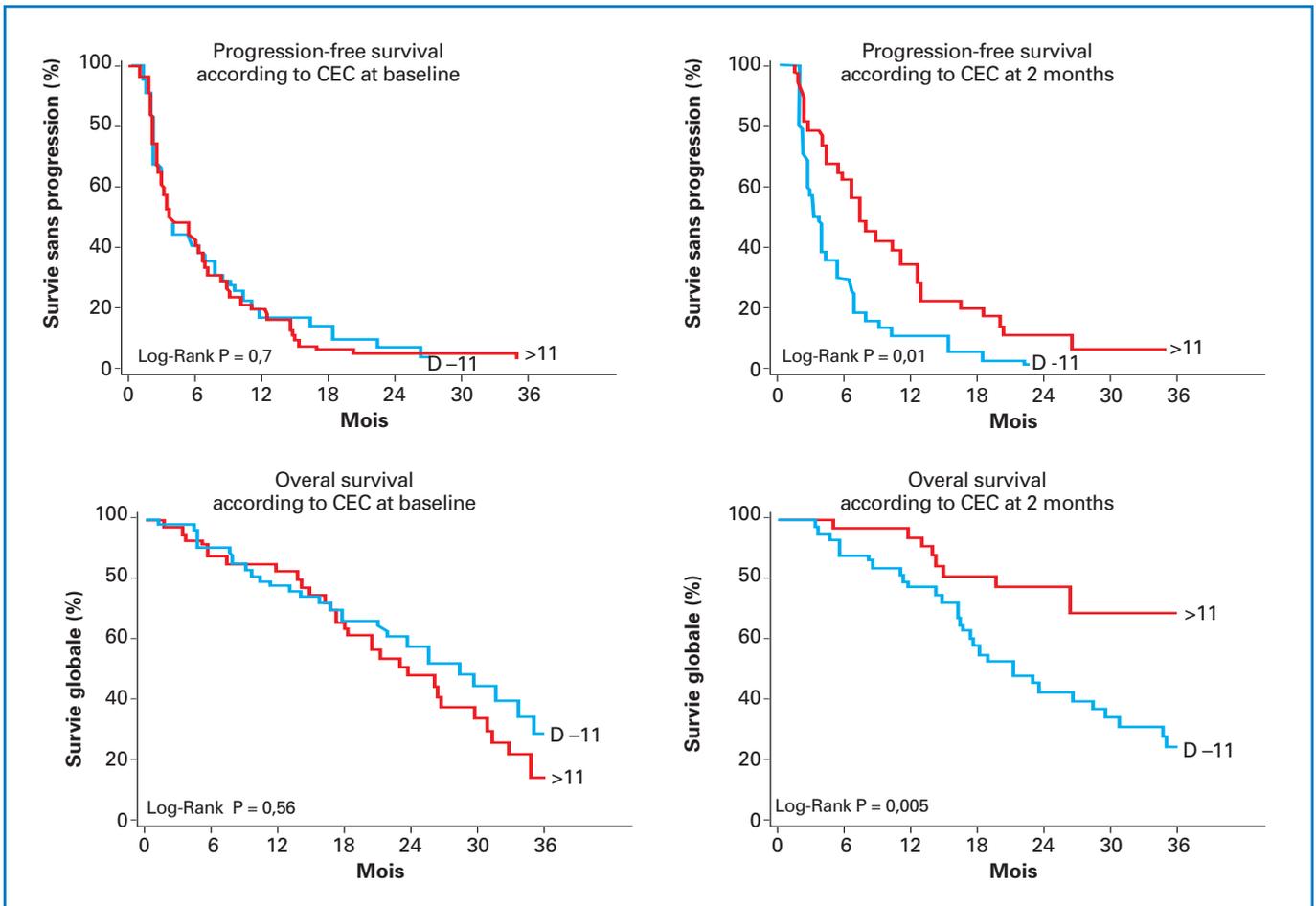
ont évalué l'influence sur l'efficacité du bevacizumab, de l'expression du VEGF (ARN et protéine) et de la thrombospondine 2 (molécule anti-angiogénique) [4]. Aucun de ces marqueurs ne s'est avéré corrélé au bénéfice clinique du bevacizumab dans les cancers colorectaux. De la même manière, la densité vasculaire au sein du prélèvement tumoral peut correspondre au potentiel angiogénique de la maladie. Dans cette même étude, une forte densité vasculaire intra-tumorale n'était pas corrélée au bénéfice clinique du bevacizumab. Une analyse de l'influence des mutations de k-ras, b-raf et p53 fut également menée sur cette cohorte de patients, sans pouvoir identifier de corrélation entre ces anomalies oncogéniques fréquentes dans les cancers colorectaux et l'efficacité du bevacizumab [5]. L'étude de l'expression du VEGF-A dans les cancers du sein ne semble pas avoir plus d'intérêt [6]. Wedam *et al.* ont évalué l'intérêt de l'étude de la présence du VEGF-R2 et de son statut de phosphorylation dans les formes inflammatoires de cancers du sein traités par bevacizumab. Cette étude immuno-histochimique a montré que le VEGF-R était phosphorylé également au sein des cellules tumorales, suggérant un rôle autocrine du VEGF-A. Cette hypothèse est confortée par l'apparition d'une apoptose tumorale et d'une diminution de la phosphorylation du VEGF-R2 après traitement par bevacizumab [7]. L'intérêt de l'analyse du statut de phosphorylation du VEGF-R2 au diagnostic ou après la première administration du bevacizumab, devra être confirmé. Il faudra valider cette hypothèse dans les autres cancers traités par anti-angiogéniques et comparer ce facteur aux paramètres classiques liés directement à l'angiogenèse.

### Utilisation des biomarqueurs pour évaluer de manière dynamique l'efficacité thérapeutique

Le suivi de facteurs angiogéniques (VEGF, TSP1, TSP2, PIGF, bFGF, IL-8) sériques s'est globalement avéré décevant. Dans les cancers du côlon métastatiques, les taux sériques de VEGF ne sont pas corrélés au bénéfice clinique [8]. Les mêmes données furent observées dans le contexte du cancer du pancréas traité par gemcitabine et bevacizumab. Ceci semble indiquer une absence de valeur prédictive des taux sériques de VEGF-A indépendamment du modèle tumoral [9]. Néanmoins, plusieurs équipes ont observé une élévation des taux sériques de VEGF dans le plasma des patients traités par bevacizumab. Une hypothèse possible était la présence d'une interaction entre cet anticorps et le VEGF-A, modifiant la clairance de cette cytokine. Récemment, Loupakis *et al.* ont rapporté des dosages de VEGF-A réalisés après déplétion des immunoglobulines. Dans ces conditions, la déplétion des immunoglobulines n'influence pas les taux sériques de VEGF chez les volontaires sains. Cette technique révèle une diminution des taux de VEGF libre (non lié aux immunoglobulines) après traitement par bevacizumab [10]. Ces résultats préliminaires devront être confirmés et indiquent quels efforts devront être effectués pour mieux analyser de manière dynamique la valeur prédictive du VEGF sérique pour évaluer l'intérêt d'un traitement par bevacizumab. L'utilisation du sunitinib (inhibiteur de VEGF-R2, PDGFR $\beta$ , FLT3 et KIT), du BAY-57-9352 (inhibiteur de VEGF-R2 et PDGFR $\beta$ ) et du vatalanib (inhibiteur de VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3, PDGFR $\beta$  et KIT) est également associée à une augmentation du VEGF sérique

[11-13]. Dans cette dernière étude, les taux sériques de VEGF seraient possiblement corrélés à un bénéfice clinique, contrairement aux taux de bFGF [13]. Les taux sériques de la forme soluble du VEGF-R2 peuvent également diminuer de manière significative après traitement par sunitinib [11]. Il sera important de valider ces données dans les études portant sur des effectifs plus importants. Le suivi de ces biomarqueurs ne pourra se substituer aux critères RECIST que s'il existe une corrélation entre ces paramètres et le bénéfice clinique des agents anti-angiogéniques.

Considérant les enseignements issus de la recherche dans le domaine des maladies vasculaires, il s'avère que le suivi des cellules endothéliales (CE) dans le sang périphérique des patients pourrait constituer un biomarqueur d'intérêt. Werner *et al.* ont suivi une cohorte de 214 patients affectés par un accident vasculaire. Une analyse par cytométrie en flux a permis la quantification, dans le sang périphérique de ces patients, du nombre de progéniteurs endothéliaux (CEP : KDR+CD34+). Un taux élevé de CEP était associé à une meilleure revascularisation et à un moindre risque de mortalité de cause cardiovasculaire [14]. Les équipes de Kerbel et de Bertolini ont développé des stratégies de chimiothérapies métronomiques qui peuvent influencer l'angiogenèse dans plusieurs modèles précliniques. Cette équipe a évalué le taux de CE et de CEP dans le sang périphérique de 81 patientes présentant un cancer du sein métastatique et traitées par une chimiothérapie métronomique associant cyclophosphamide et méthotrexate. L'évaluation des CE n'a pas de valeur pronostique au diagnostic. En revanche, un taux de CE périphériques supérieur à 11/ $\mu$ L après 2 mois de traitement est associé à



**Figure 1.** Valeur prédictive de l'évolution du taux de cellules endothéliales circulantes et de leur viabilité dans une cohorte de patientes traitées pour un cancer du sein métastatique par chimiothérapie métronomique. D'après Mancuso *et al.* [15].

une meilleure survie sans progression et à une meilleure survie globale (figure 1). Les auteurs ont montré par la suite que la majorité des CE circulantes ont un phénotype apoptotique [15]. Willett *et al.* ont étudié ce paramètre dans une cohorte de 12 patientes traitées pour un cancer du rectum par bevacizumab. Douze jours après la première injection de bevacizumab, les auteurs observèrent également une diminution du nombre de CE viables dans le sang périphérique [16]. L'avantage théorique de cette méthode est de considérer un paramètre lié au système endothélial et donc potentiellement indépendant de l'oncogenèse et du

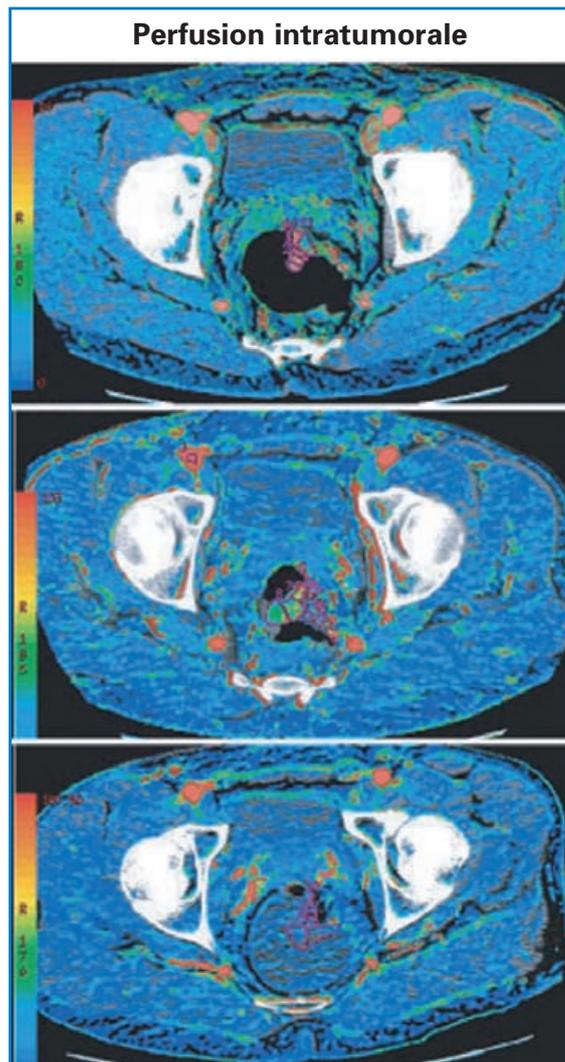
modèle tumoral. Cependant, l'étude des cellules endothéliales circulantes présente plusieurs limites. Cette analyse s'effectue par cytométrie en flux, sur du matériel cellulaire. Les temps de manipulation sont importants, possiblement coûteux, et la reproductibilité doit être clairement établie. La détection des ARN messagers spécifiques des cellules endothéliales circulantes (codant par exemple pour la VE-cadhérine) pourrait être une alternative accessible à un grand nombre de centres. Le caractère prédictif de la mesure du nombre de copies de ces ARN messagers nécessite encore une étape de validation.

## Utilisation de l'imagerie fonctionnelle

Le développement récent de l'imagerie fonctionnelle permet maintenant la réalisation d'études ancillaires qui préciseront la valeur de ces techniques pour guider les décisions thérapeutiques. L'échographie associée à l'injection de produit de contraste à tropisme vasculaire fut évaluée dans des études de phases I et II. Cette technique peut détecter une diminution de la vascularisation après injection d'agents anti-angiogéniques comme le sunitinib [11]. La DCE-IRM (*dynamic contrast-enhanced*

magnetic resonance imaging) peut mesurer des paramètres corrélés à la perfusion vasculaire et à la perméabilité capillaire. Cette technique a été évaluée en parallèle de plusieurs phases I/II incluant des anti-angiogéniques. Comme l'échographie de contraste, la DCE-IRM peut identifier des modulations de la vascularisation intra-tumorale précocement après l'administration de médicaments anti-angiogéniques. Morgan *et al.* ont montré qu'une réduction de plus de 40 % du Ki (constante liée à la vascularisation tumorale et à la perméabilité vasculaire) après traitement par vatalanib était un facteur prédictif de la survenue d'une réponse objective [17]. Les études rapportées par Wedam dans les cancers inflammatoires du sein [7] et par Willett dans les cancers du rectum [16] confirment l'observation d'une diminution de la vascularisation intra-tumorale, évaluée par DCE-IRM, après traitement par bevacizumab (dès J12 dans cette dernière étude, *figure 2*). Le PET-SCAN utilisant du FDG ne s'est pas avéré contributif pour des évaluations précoces. Dans l'étude de Willett *et al.*, le PET-SCAN utilisant du FDG montrait une diminution de l'incorporation de FDG 6 à 7 semaines après la fin du traitement. Aucune modification n'était observable à J12.

Le développement de ces techniques impose plusieurs contraintes à prendre en considération. Un travail important à mener concerne la standardisation des techniques d'acquisition et d'analyse, la formation d'un nombre important d'opérateurs ou la mise en place de réseaux facilitant le transfert et l'interprétation



**Figure 2. Évaluation par DCE-IRM de l'effet du bevacizumab sur la perfusion d'un cancer du rectum. D'après Willett *et al.* [16].**

standardisée des données d'imagerie fonctionnelle. Les paramètres mesurés pour prédire l'efficacité des traitements pourront différer en fonction des molécules utilisées, mais également du site des métastases. Dans la lignée des études de Wedam et de Willett, le rôle de ces techniques dans l'ajustement rapide des thérapies dans un contexte néoadjuvant sera probablement un développement pertinent. L'utilisation de ces techniques pour évaluer des maladies métastatiques affectant plusieurs sites (hépatiques et osseux par exemple) sera plus difficile. Il faudra particulièrement déterminer si les patients pour lesquels une modification vasculaire n'est pas observée, bénéficient ou non des anti-angiogéniques en terme de survie sans progression ou de survie globale.

Ainsi, le développement de paramètres biologiques ou fonctionnels permettant la sélection ou l'évaluation des traitements anti-angiogéniques est un enjeu majeur qui nécessite l'implication constante de nos unités dans la recherche clinique évaluant cette problématique.

## Références

1. Kabbinar F, *et al.* *J Clin Oncol* 2003 ; 21 : 60-5.
2. Mass R, *et al.* *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : abst 3514.
3. Relf M, *et al.* *Cancer Res* 1997 ; 57 : 963-9.
4. Jubb AM, *et al.* *J Clin Oncol* 2006 ; 24 : 217-27.
5. Ince WL, *et al.* *J Natl Cancer Inst* 2005 ; 97 : 981-9.
6. Hillan KH, *et al.* *J Clin Oncol* 2003 ; 21 : 284S.
7. Wedam SB, *et al.* *J Clin Oncol* 2006 ; 24 : 769-77.
8. Holden SN, *et al.* *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : abst 3555.
9. Kindler HL, *et al.* *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 8033-40.
10. Loupakis F, *et al.* *J Clin Oncol* 2007 ; 1816-8.
11. Faivre S, *et al.* *J Clin Oncol* 2006 ; 24 : 25-35.
12. Christensen O, *et al.* *Eur J Clin Pharmacol* 2005 ; 61 : 704.
13. Drevs J, *et al.* *Ann Oncol* 2005 ; 16 : 558-65.
14. Werner N, *et al.* *N Engl J Med* 2005 ; 353 : 999-1007.
15. Mancuso P, *et al.* *Blood* 2006 ; 108 : 452-9.
16. Willett CG, *et al.* *Nat Med* 2004 ; 10 : 145-7.
17. Morgan RS, *et al.* *J Clin Oncol* 2003 ; 21 : 3955-64.