

Bevacizumab et variations des CTC et CEC

François-Clément Bidard, Jean-Yves Pierga

Institut Curie, Université Paris Descartes

<francois-clement.bidard@curie.fr>

Les progrès technologiques de la dernière décennie ont permis de mettre au point des outils de détection cytologique des cellules tumorales circulantes (CTC) dans le sang des patients présentant des tumeurs épithéliales. La technique CellSearch® peut ainsi être utilisée en routine, d'après la FDA et sur la base de plusieurs études cliniques réalisées dans les années 2002-2006, dans les cancers mammaires, prostatiques et colorectaux métastatiques (M+). Il s'agit, d'après l'énoncé de l'autorisation légale d'« une aide au management de la chimiothérapie » dans ces différents cancers. L'utilisation en routine du bevacizumab, dans les cancers mammaires et colorectaux métastatiques est intervenue postérieurement à ces études initiales sur les CTC. Cette mise au point a pour but de faire une synthèse brève des observations réalisées avec cette méthode d'isolement des CTC, et qui permet aussi d'isoler en parallèle les cellules endothéliales circulantes (CEC), autre marqueur potentiel d'intérêt dans le contexte d'un traitement anti-angiogénique.

Technologie d'isolement des CTC et CEC, intérêt et limites

Pour les CTC, la technique CellSearch® nécessite un prélèvement sanguin de

7,5 mL sur tube spécial, qui est conservé à température ambiante et doit être analysé dans les 4 jours suivant le prélèvement. L'isolement consiste en un premier immuno-enrichissement des cellules EpCAM+ (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*), puis un marquage en triluorescence : DAPI (noyau), CD45 (antigène panleucocytaire) et cytokératines 8/18/19 (cytokératines épithéliales). À la fin, la validation manuelle ne retient comme CTC que les images DAPI+/CD45-/CK+ qui présentent une morphologie cellulaire. Cette technique est, comme déjà expliqué, le *gold standard* actuel et la seule à être approuvée par la FDA (mention « *In Vitro Diagnosis* »). Des améliorations techniques sont bien évidemment à attendre à moyen terme.

L'isolement des CEC par CellSearch®, qui doit avoir lieu dans les 3 jours après le prélèvement sanguin, repose sur le même principe : immuno-enrichissement par CD146, marquage par DAPI (+), CD45 (-) et CD 105 (+) (*figure 1*). Cette technique, validée par analyse du profil transcriptomique des cellules isolées [1] reste du domaine de la recherche (mention « *Research Use Only* »). Les techniques concurrentes utilisées pour l'isolement des CEC reposent pour la plupart sur l'utilisation de cytomètres en flux (FACS), outils plus sensibles et permettant d'isoler des sous-populations (comme celle

des progéniteurs) au sein des CEC, à un coût plus faible. Cependant, ces techniques sont actuellement essentiellement monocentriques, varient d'un centre à l'autre tant pour le matériel utilisé (machine FACS, anticorps...) que pour les antigènes utilisés et ne sont généralement pas diffusées en dehors de leur centre d'origine. En pratique, l'intérêt de la technique CellSearch® repose sur la possibilité de réaliser des études multicentriques (envoi des tubes à température ambiante par courrier), sans mise au point spécifique sur un appareil dédié, ainsi que la diffusion importante de cette technique (près de 10 automates en France, principalement utilisés pour les CTC).

CTC et chimiothérapie + bevacizumab

Cinq études cliniques dans lesquelles le bevacizumab a été utilisé en combinaison avec la chimiothérapie ont été rapportées jusqu'à présent. Les deux premières études correspondent aux études « pivotaux » rapportant l'intérêt des CTC dans le cancer colorectal métastatique en tant que facteur pronostique avant traitement, mais aussi en cours de traitement. Ces études sont résumées *tableau 1*. Dans ces deux larges études, les variations des CTC en cours de traitement ont été corrélées avec la survie sans progression des traitements entrepris. Néanmoins, si les taux de positivité avant traitement semblaient identiques, ceux-ci semblent rétrospectivement différents en cours de traitement. Plusieurs explications peuvent être avancées pour expliquer la chute du nombre de CTC en cours de traitement dans l'étude de Tol *et al.* [2] : meilleure réponse/survie en 1^{re} ligne, présence de cetuximab associé pour la moitié des patients, mais aussi utilisation systématique du bevacizumab. Ces différences n'ont toutefois pas été soulevées dans les articles correspondants.

La première étude sur les CTC soulevant directement la possibilité d'une diminution accrue des CTC liée à l'utilisation de bevacizumab en association avec la chimiothérapie a été l'étude française

Tableau 1. CTC et bevacizumab dans les cancers colorectaux M+.

	Cohen et al. [2]	Tol et al. [3]
Situation	1 ^{re} à 3 ^e M+	1 ^{re} ligne M+ (étude CAIRO II)
N patients	430	467
% ≥ 3 CTC/7,5 mL avant traitement	26 %	29 %
% de patients recevant du bevacizumab en combinaison	56 % NB : pas de randomisation	100 % NB : 50 % recevaient aussi du cetuximab
% ≥ 3 CTC/7,5 mL après 3-5 semaines de traitement	12 %	5 %

Tableau 2. CTC et bevacizumab dans les cancers du sein M+.

	Cristofanilli et al. [4]	Nolé et al. [5]	Etude Athena [6]
Situation	Toute ligne M+	Toute ligne M+	1 ^{re} ligne M+
N patients	75 (set de validation)	80	67
% ≥ 5 CTC/7,5 mL avant traitement	49 %	61 %	46 %
% de patients recevant du bevacizumab en combinaison	0 %	0 %	100 %
% ≥ 5 CTC/7,5 mL en cours de traitement	22 % (à 6 semaines)	30 % (à 5 semaines)	12 % (à 6 semaines)

ancillaire de l'étude de phase IV Athena. Les études précédemment publiées sur la valeur pronostique des CTC étaient relativement unanimes, et rapportaient que les CTC étaient, dans le cancer du sein métastatique, un facteur associé à la survie sans progression. Cela était validé, que les CTC soient dosées avant le début de la chimiothérapie ou en cours de chimiothérapie. Dans l'étude Athena, les CTC étaient bien un facteur pronostique à l'inclusion, mais elles ne l'étaient plus en cours de traitement. Après examen, il s'est avéré que le nombre de CTC en cours de traitement était inhabituellement bas (tableau 2), suggérant un effet propre du bevacizumab, sans que cette chute des CTC ne se traduise par une survie sans progression particulièrement allongée. Plus récemment, deux autres études sur le cancer du sein et bevacizumab ont été

rapportées au congrès de San Antonio. En *poster-discussion*, l'étude ancillaire CTC de l'essai Beverly02 [7] (bevacizumab + trastuzumab + chimiothérapie néoadjuvante des cancers du sein inflammatoires HER2+) a montré à nouveau une chute des CTC en cours de traitement apparemment plus importante que dans les précédentes études néoadjuvantes Remagus02 et Geparquattro, qui ne comportaient pas de bevacizumab. En l'absence de randomisation, il est toutefois prématuré de conclure au rôle propre du bevacizumab. En présentation orale, l'étude IC 2006-04 (1^{re} ligne M+ [8]) a rapporté elle aussi des taux de négativation plus importants des CTC en présence de bevacizumab ($p = 0,04$; 77 % vs 62 % aux cycles 3-4).

Au total, et malgré l'absence d'étude randomisée, ces différentes études suggèrent qu'il existe, au-delà d'une potentielle amélioration de la PFS, une disparition « trop rapide » des CTC lors de l'utilisation combinée de bevacizumab avec la chimiothérapie. En pratique, les variations de CTC en cours de ce type de traitement sont donc à considérer avec précaution

pour guider « le management » des traitements (mais, fin 2010, les CTC n'ont d'AMM qu'en Amérique du Nord). Du côté biologique, si la disparition des CTC sous trastuzumab peut s'expliquer facilement, toutes les hypothèses sont ouvertes avec les anti-angiogéniques : simple traduction d'un effet antitumoral fort ? « Normalisation » endothéliale avec diminution de l'intravasation ? Induction de la transition épithélio-mésenchymateuse avec diminution de l'expression des cytokératines 8/18/19 et/ou d'EpCAM par les CTC ? Les hypothèses sont nombreuses...

CEC et chimiothérapie + bevacizumab

Les données quantitatives de la littérature sont hétérogènes, tant sur le comptage des CEC avant traitement qu'en cours de traitement. Comme déjà mentionné, il existe de multiples techniques d'isolement différentes se focalisant parfois sur une sous-population de CEC, variant souvent d'une étude à l'autre. Les contextes cliniques sont eux-aussi très hétérogènes dans les études : patients métastati-

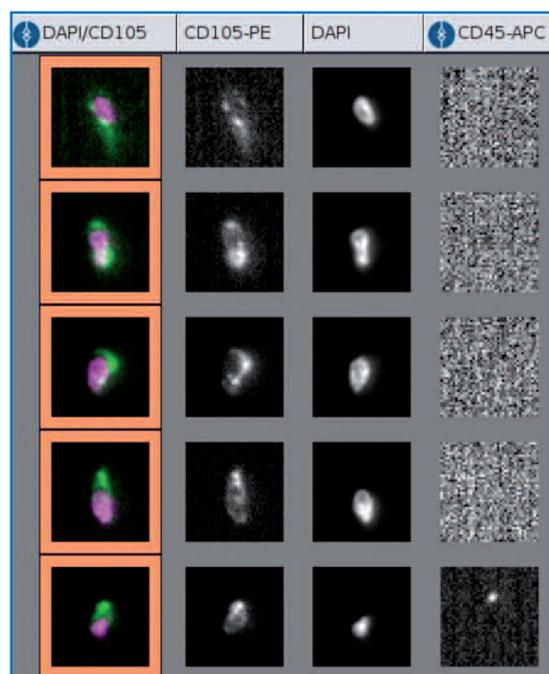


Figure 1. Exemples de CEC. Après immunosélection CD146+, il s'agit des cellules DAPI+/CD105+/CD45-.

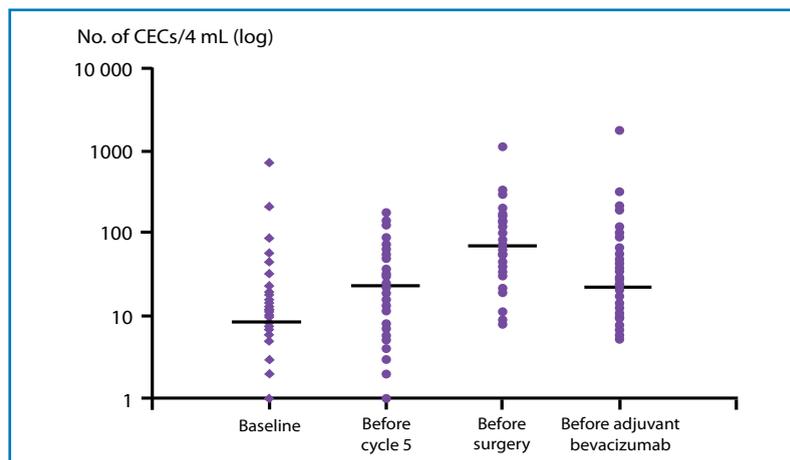


Figure 2. Cinétique des CEC (étude Beverly02, n = 52 patients). Le dernier point de prélèvement est survenu environ 8 semaines après l'arrêt du bevacizumab. Echelle logarithmique. D'après [7].

ques ou non, traitement par chimiothérapie « standard » et/ou « métronomique », associé ou non à divers agents anti-angiogéniques. Un ultime niveau de complexité est apporté par la cinétique apparemment complexe des CEC en réponse à l'injection d'un traitement, avec des variations précoces ou plus ou moins tardives des différentes sous-populations [9]. Si l'on se limite aux données issues de la technique CellSearch®, deux des études précédemment citées pour les CTC ont été aussi l'occasion d'étudier de manière synchrone les CEC en cours de traitement par chimiothérapie + bevacizumab dans le cancer du sein. Ces deux études, Athena en situation métastatique et Bervely02 en néoadjuvant, montrent des taux similaires de CEC à l'inclusion et ne retrouvent aucune corrélation entre CEC et CTC. En cours de traitement, les CEC augmentent de manière progressive et régulière, selon des concentrations et une cinétique qui semblent superposables. Dans l'étude Beverly 02, cette augmentation se poursuit par une diminution au dernier point de l'étude, prélevé environ 8 semaines après la dernière injection de bevacizumab (figure 2). Les niveaux de CEC en cours de traitement ont été diversement corrélés avec le bénéfice clinique des traitements : avec le temps jusqu'à progression (ATHENA) et avec l'obtention d'une réponse complète pathologique (Beverly02). Ces études exploratoires sont bien évidemment à confirmer avant toute application clinique éventuelle.

Conclusion

Les CEC et CTC permettent d'avancer dans notre compréhension du mécanisme de la métastase d'une part, et celui de l'angiogénèse d'autre part. Ces cellules font partie des biomarqueurs potentiellement prédictifs de l'efficacité des anti-angiogéniques en association ou non avec la chimiothérapie.

Conflits d'intérêts : essais cliniques (J.-Y. Pierga, Roche), interventions ponctuelles (J.-Y. Pierga, F.-C. Bidard, Roche).

Références

1. Smirnov DA, et al. *Cancer Res* 2006 ; 66 : 2918-22.
2. Cohen SJ, et al. *J Clin Oncol* 2008 ; 26 : 3213-21
3. Tol J, et al. *Ann Oncol* 2010 ; 21 : 1006-12.
4. Cristofanilli M, et al. *N Engl J Med* 2004 ; 351) : 781-91.
5. Nolé F, et al. *Ann Oncol* 2008 ; 19 : 891-7.
6. Bidard FC, et al. *Ann Oncol* 2010 ; 21 : 1765-71.
7. Pierga JY, et al. SABCs 2010 ; Abst PD04-07.
8. Pierga JY, et al. SABCs 2010 ; Abst 6-5.
9. Farace F, et al. *Bull Cancer* 2007 ; 94 (Suppl) : S254-9.