

Évaluation de la valeur prédictive de l'immuno-modulation induite par les anti-angiogéniques chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique

Simon Pernot

Service d'hépatogastro-entérologie et d'oncologie digestive et Inserm U970, PARCC, Hôpital européen Georges Pompidou, Paris, France
 <simon.pernot@egp.aphp.fr>

Rationnel de l'étude

Place des anti-angiogéniques dans le cancer colorectal métastatique (CCRm)

L'angiogenèse joue un rôle central dans la croissance tumorale et la formation de métastases, entraînant la formation d'un réseau de vaisseaux sanguins fournissant l'oxygène et les nutriments à la tumeur et permettant l'élimination des déchets. Différentes molécules anti-angiogéniques (AA) ont été développées ciblant essentiellement le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)-A (bevacizumab) ou ses récepteurs (sunitinib, sorafenib, axitinib).

Le bevacizumab a montré une efficacité dans le CCRm en 1^{re} et en 2^e ligne de traitement, et a donc obtenu en 2004 son autorisation de mise sur le marché dans cette pathologie, pour ces lignes de trai-

tement. Cependant, il n'existe à ce jour aucun facteur prédictif validé de réponse au bevacizumab.

Rôle du système immunitaire dans le cancer colorectal

Le système immunitaire joue un rôle dans le contrôle de la survenue et de la progression du CRC. Il a été montré que l'importance de l'infiltrat intra-tumoral lymphocytaire T CD8+ (cytotoxiques) d'une part, et CD45RO+ (mémoires) d'autre part, était un facteur pronostique important prédisant la récurrence et la survie des patients atteints de CRC [1]. Cependant, les tumeurs induisent des mécanismes d'échappement au système immunitaire qui semblent importants pour leur développement. La production de molécules immunosuppressives et l'induction de populations cellulaires suppressives telles que les cellules myéloïdes suppressives

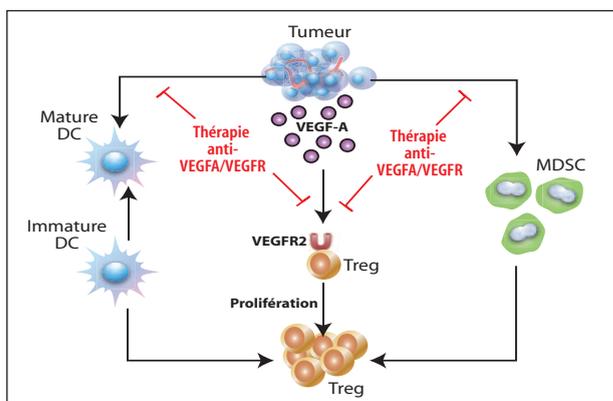


Figure 1. D'après Terme et al. *Oncoimmunology* 2013 ; 2 : e25156.

(MDSC), les lymphocytes exprimant le récepteur PD-1 et les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont au centre de ces mécanismes d'échappement [2]. Les Treg sont caractérisées par l'expression de CD3, CD4, CD25, et FOXP3. Ils inhibent la réponse immune anti-tumorale. Le rôle central des Treg dans la réponse immunitaire anti-tumorale a été démontré par l'administration d'un anticorps anti-CD25, permettant la déplétion des Treg, avant une greffe tumorale syngénique. La déplétion des Treg permettait à elle seule, dans ce modèle, une éradication complète de la tumeur [3].

Le nombre de Treg est augmenté dans le sang et dans les tumeurs de patients ayant un CRC ; des taux élevés de Treg sont généralement associés à un mauvais pronostic [4], suggérant un rôle important dans l'échappement tumoral à la réponse immunitaire chez l'homme.

Relation entre l'angiogenèse et l'immunité anti-tumorale

Au-delà de l'action sur le système vasculaire/endothélial des AA, il semble que les AA peuvent jouer sur les phénomènes d'échappement immunitaire [5]. Le VEGF sécrété par la tumeur bloque la maturation des cellules dendritiques (CD) via l'inhibition de NF- κ B [6, 7] (figure 1). Ces CD immatures ont alors la capacité d'induire préférentiellement le développement de Treg [8]. Le VEGF est également impliqué dans l'expansion des MDSC [9]. Différents travaux suggèrent que les molécules anti-angiogéniques pourraient aussi permettre de surmonter l'immunosuppression induite par les tumeurs.

- L'administration d'anticorps monoclonaux anti-VEGF à des souris porteuses de tumeurs rétablit la maturation des CD [10] et diminue le nombre de CD immatures dans le sang périphérique de patients atteints de cancer [11].

- D'autre part, l'administration de sunitinib (un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase des récepteurs de VEGF, PDGF, SCF [KIT-L], FLT3-L) diminue le nombre de MDSC et de Treg dans le sang périphérique chez des patients atteints de cancer du rein et dans différents modèles murins [5, 12].

- Enfin, notre équipe a récemment mis en évidence une corrélation entre la diminution des Treg chez les patients traités par sunitinib et un allongement de la survie globale [13] suggérant que l'étude dynamique de certains paramètres immunitaires pourrait constituer un marqueur prédictif de réponse aux AA. Cependant le sunitinib inhibe de nombreuses cibles moléculaires (dont certaines sont d'ailleurs

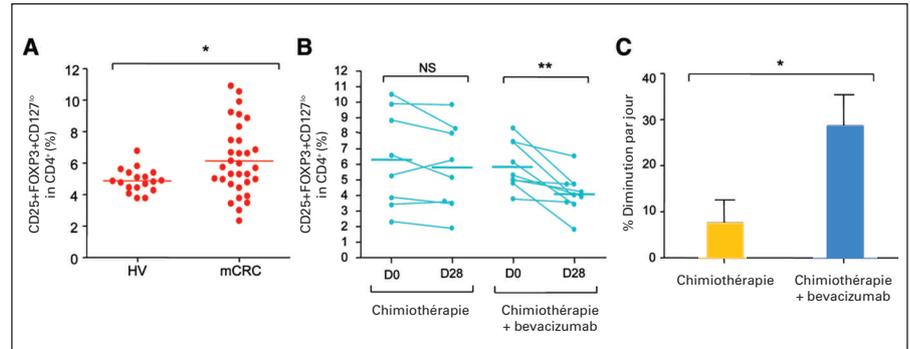


Figure 2. A. Les Treg (CD25+FOXP3+CD127^{lo}) sont augmentés dans le sang périphérique des patients ayant un cancer colorectal métastatique (mCRC), comparés aux volontaires sains (HV). B, C. Les Treg sont significativement diminués après 2 cycles de chimiothérapie + bevacizumab, mais ne le sont pas après chimiothérapie seule. D'après [14].

encore potentiellement inconnues), et les mécanismes impliqués dans cette immuno-modulation sont encore mal connus et controversés.

L'induction de Treg est favorisée par la présence de VEGF par différentes voies : 1. Blocage de la maturation des DC, entraînant l'induction préférentielle de Treg. 2. Induction de MDSC, favorisant l'induction de Treg.

3. Action directe du VEGF sur le VEGFR2, porté par une sous-population de Treg. Dans un travail plus récent, nous avons étudié l'effet immuno-modulateur des anti-angiogéniques dans un modèle murin de cancer colique (modèle CT26) [14]. Les Treg, augmentés dans les rates des souris porteuses de tumeurs, diminuaient après traitement par sunitinib ou anticorps anti-VEGFA (équivalent murin du bevacizumab) pour retrouver leur niveau physiologique, sans cependant affecter leur fonctionnalité. En revanche, après traitement par masitinib, inhibiteur multicible des tyrosine-kinases, proche du sunitinib, mais ne ciblant pas le VEGFR, les Treg n'étaient pas diminués. L'inhibition de l'axe VEGFA-VEGFR est donc suffisante pour induire cette immuno-modulation liée aux AA.

Nous avons aussi montré que l'administration de VEGF-A à des souris porteuses de tumeurs induisait la prolifération des Treg et que le blocage sélectif du VEGFR2 permettait une inhibition de la prolifération des Treg, alors que le blocage de VEGFR1 était sans effet sur celle-ci. *In vitro*, nous avons retrouvé également une prolifération des Treg exprimant le VEGFR. Ces résultats suggèrent le rôle prépondérant de la voie VEGF-A/VEGFR dans l'inhibition de la prolifération des Treg induits par la tumeur (figure 1).

Enfin, nous avons montré que ces phénomènes étaient retrouvés chez des patients atteints de CCRm traités par bevacizumab. En effet, les Treg étaient significati-

vement diminués chez les patients ayant reçu 2 cycles de chimiothérapie associée à du bevacizumab en 1^{re} ligne, alors que le nombre de Treg n'était pas modifié chez les patients traités par chimiothérapie seule. Une diminution de plus de 10 % des Treg était retrouvée chez 2/3 des patients environ (figure 2). Le faible nombre de malades étudiés ne permettait pas de juger de l'impact de cette diminution des Treg sur le devenir des patients.

Patients et méthodes

Patients

Ce projet est réalisé à partir de l'étude COBEQOL, qui a pour but d'étudier la qualité de vie des patients traités par bevacizumab en première ligne d'un CCRm. Cette étude prospective prévoit d'inclure 320 patients dans 12 centres français en 3 ans. Sont inclus dans cette étude des patients atteints de cancer colorectal métastatique recevant en première ligne de traitement de la chimiothérapie systémique (FOLFOX, FOLFIRI) associée à du bevacizumab. Les patients ayant une lymphopénie avant traitement sont exclus. Les données cliniques et biologiques, dont les principaux facteurs pronostiques connus (âge, sexe, TNM, etc.), sont recueillies aux dates de prélèvement. Les données d'efficacité du traitement sont recueillies, comme l'évolution des marqueurs et la réponse radiologique, selon les critères RECIST 1.1, ainsi que la date de progression et la date de décès. Une note d'information et la signature d'un consentement validé par le CPP sont requises pour chaque patient.

Immuno-phénotypage

Ces patients seront prélevés avant tout traitement à J0 puis à J28, afin de déterminer la modulation des cellules immu-

Bourse

nitaires après 2 cycles de traitement. Les prélèvements sont réalisés en même temps que ceux nécessités par le traitement.

Après séparation sur Ficoll (Sigma-Aldrich, USA), les cellules mononucléées du sang périphérique seront marquées avec une combinaison d'anticorps CD3, CD4, CD25, CD127, FOXP3. Les Treg sont définis comme des cellules CD3⁺/CD4⁺/CD25^{hi}/CD127^{lo}/FOXP3⁺. Leur prolifération sera également étudiée grâce à un marquage au Ki67. Ces marquages seront analysés sur LSRII (BD Biosciences).

Pour chaque prélèvement, du plasma est congelé pour dosages ultérieurs de cytokines et facteurs de croissance angiogénique.

Analyse statistique

Avec les hypothèses suivantes :

- 2/3 des patients auront une diminution des Treg de plus de 10 % ;
- 1/3 des patients auront une diminution des Treg de moins de 10 %, et en supposant que la valeur médiane de survie sans progression sera de 6,5 mois pour les patients ayant une diminution des Treg de moins de 10 %, et de 10,5 mois pour les patients ayant une diminution des Treg de plus de 10 % (HR = 0,62),

avec un risque d'erreur alpha bilatéral de 5 %, il sera nécessaire d'observer 143 événements (progression ou décès quelle que soit la cause) pour avoir une puissance de 80 %.

En incluant les patients avec un recul minimal de 24 mois, il sera alors nécessaire d'inclure 152 patients.

En outre, après l'enregistrement de 143 événements, il sera possible de créer un modèle de Cox multivarié incluant 14 variables pour rechercher un effet indépendant des Treg.

État d'avancement et résultats attendus

Les inclusions dans l'étude COBEQOL ont débuté en avril 2013 et sont en cours. Les résultats de ce travail pourraient permettre de mettre en évidence un facteur prédictif de la réponse au bevacizumab chez les patients atteints de CCRm, afin de mieux prescrire cette molécule dans le futur. De plus, ces résultats nous permettront de compléter nos connaissances sur les effets immunologiques des AA.

Enfin, si la diminution des Treg sous traitement AA est confirmée chez les patients atteints de CRCm, ces résultats pourraient permettre de développer de nouvelles

stratégies thérapeutiques combinant AA et immunothérapie.

Liens d'intérêts : Investigateur principal HEGP-COBEQOL.

Références

1. Galon J, *et al. Science* 2006 ; 313 : 1960-4.
2. Zou W. *Nat Rev Cancer* 2005 ; 5 : 263-74.
3. Onizuka S, *et al. Cancer Res* 1999 ; 59 : 3128-33.
4. Chapp N, *et al. Gut* 2009 ; 58 : 520-9.
5. Hipp MM, *et al. Blood* 2008 ; 111 : 5610-20.
6. Gabrilovich DI, *et al. Nat Med* 1996 ; 2 : 1096-103.
7. Oyama ST, *et al. J Immunol* 1998 ; 160 : 1224-32.
8. Belkaid Y, *et al. Immunity* 2008 ; 29 : 362-71.
9. Gabrilovich DI, *et al. Clin Cancer Res* 1999 ; 5 : 2963-70.
10. Osada T, *et al. Cancer Immunol Immunother* 2008 ; 57 : 1115-24.
11. Ko JS, *et al. Clin Cancer Res* 2009 ; 15 : 2148-57.
12. Ozao-Choy J, *et al. Cancer Res* 2009 ; 69 : 2514-22.
13. Adotevi O, *et al. J Immunother* 2010 ; 33 : 991-8.
14. Terme M, *et al. Cancer Res* 2013 ; 73 : 539-49.