

**Biomarqueurs prédictifs de l'activité du bevacizumab chez
des patients porteurs de gliomes de haut grade à la récurrence**

SOMMAIRE

Article

Introduction

I - Les tumeurs gliales & le glioblastome

1. Classification et histologie des tumeurs gliales
2. Gliomagenèse et anomalies moléculaires
3. Epidémiologie et présentation clinico-radiologique des glioblastomes

II - Prise en charge thérapeutique

1. Traitement de 1^{ère} ligne
 - A. Le protocole « Stupp »
 - B. Marqueurs pronostiques et/ou prédictifs de réponse
2. Glioblastome à la récurrence
 - A. Les chimiothérapies classiques
 - B. Les anti-angiogéniques

III - L'angiogénèse et son interaction avec l'invasivité tumorale

1. L'angiogénèse et les facteurs angiogéniques
 - A. Le VEGFA
 - B. Les récepteurs au VEGF (VEGFR)
 - C. Autres facteurs
2. MMP2 et MMP9
3. Développement thérapeutique et angiogénèse

Patients et méthodes

1. Patients
 - Cohorte 1 : cohorte prospective traitée par bevacizumab
 - Cohorte 2 : cohorte rétrospective traitée par bevacizumab
 - Cohorte 3 : cohorte contrôle rétrospective traitée sans bevacizumab
2. Suivi clinique
3. Analyses plasmatiques
4. Analyses statistiques

Résultats

- Cohorte 1
- Cohorte 2
- Cohorte 3

Discussion

Conclusions et perspectives

Soutiens, dépôt de brevet, présentations

Références

I – Les tumeurs gliales & le glioblastome

1. Classification et histologie des tumeurs gliales

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes de l'adulte. Elles se développent à partir de cellules gliales : les astrocytes et/ou les oligodendrocytes (*Figure 1*). Elles peuvent se composer d'un seul ou des deux types cellulaires (tumeurs mixtes, oligo-astrocytaires). Les tumeurs gliales ne métastasent qu'exceptionnellement en dehors du système nerveux central.

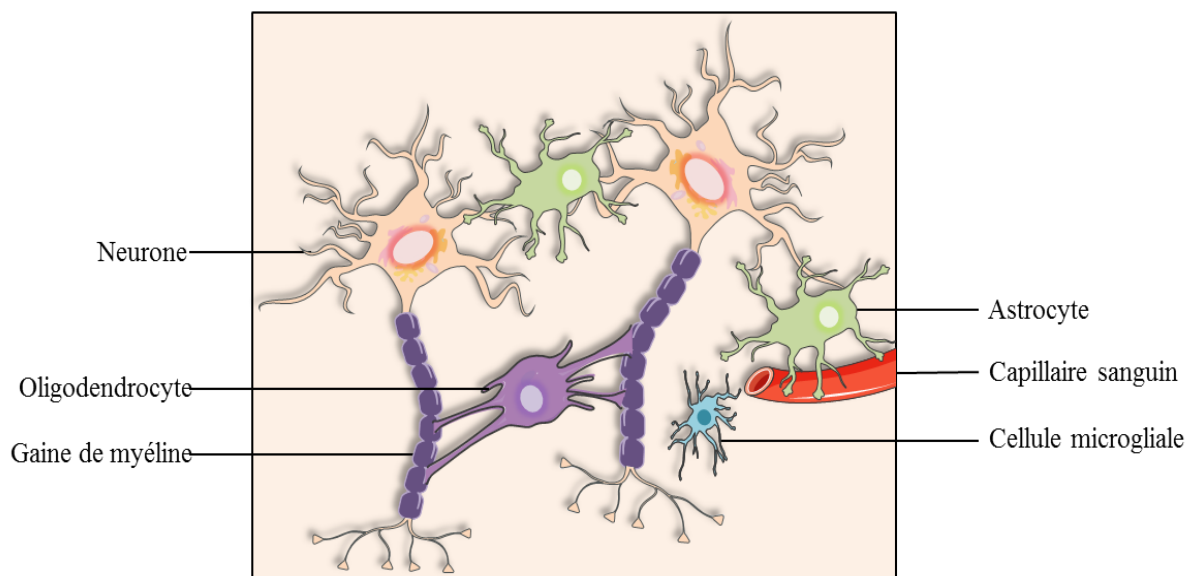


Figure 1. Cellules gliales et leurs interactions avec les autres cellules de l'environnement cérébral.

La classification actuelle des tumeurs gliales repose sur celle de l'Organisation Mondiale de la Santé révisée en 2007 (Louis et al., 2007), basée sur le sous-type cytopathologique prédominant (*Tableau 1*). Les tumeurs gliales sont ensuite divisées en grades, selon l'aspect et la différenciation cellulaire, la présence d'anomalies nucléaires, le nombre de mitose(s) observée(s) et l'existence de néo-angiogenèse et/ou de nécrose. Cette classification est sur le point d'être révisée afin d'inclure certaines anomalies moléculaires, comme les mutations de l'*Isocitrate Déshydrogénase 1 et 2 (IDH1/2)* ou la co-délétion 1p19q, qui définissent des sous-groupes moléculaires de pronostics et de profils évolutifs distincts.

Grade I	Astrocytome pilocytique
Grade II	Astrocytome diffus Fibrillaire Protoplasmique Gémistocytaire Xanthoastrocytome pléiomorphe Oligoastrocytome Oligodendrogliome
Grade III	Astrocytome anaplasique Oligoastrocytome anaplasique Oligodendrogliome anaplasique
Grade IV	Glioblastome Glioblastome à composante oligodendrogliale Glioblastome à petites cellules Glioblastome à cellules géantes Gliosarcome

Tableau 1 – Classification des tumeurs gliales selon la révision de la classification de l'OMS en 2007

Le grade I correspond à l'astrocytome pilocytique. Il s'agit de la seule tumeur gliale circonscrite et curable chirurgicalement. Elle touche préférentiellement les enfants et reste extrêmement rare chez l'adulte. A partir du grade II, les gliomes sont dits infiltrants avec la présence systématique de cellules tumorales à distance de la masse visible à l'imagerie. Ces tumeurs sont incurables à l'heure actuelle. Les gliomes de grade II, appelés gliomes de bas grade, touchent préférentiellement l'adulte de 30 à 40 ans. Classiquement, ces tumeurs progressent lentement. Néanmoins, leur histoire naturelle les conduit à une transformation progressive en gliome de haut grade. Les gliomes de haut grade correspondent aux gliomes de grade III, dits anaplasiques, et de grade IV, appelés glioblastomes. Sur le plan histologique, les gliomes de haut grade sont définis par la présence de cellules indifférenciées, avec d'importantes atypies nucléaires et un nombre élevé de mitoses. En revanche, seuls les glioblastomes présentent des zones nécrotiques et une prolifération endothélio-capillaire (angiogenèse) (*Figure 2*). Les glioblastomes sont majoritairement constitués de cellules astrocytaires. Ils présentent rarement un contingent cellulaire mixte, définissant les glioblastomes à composante oligodendrogliale. Les glioblastomes représentent environ 50% des nouveaux cas de gliomes de l'adulte.

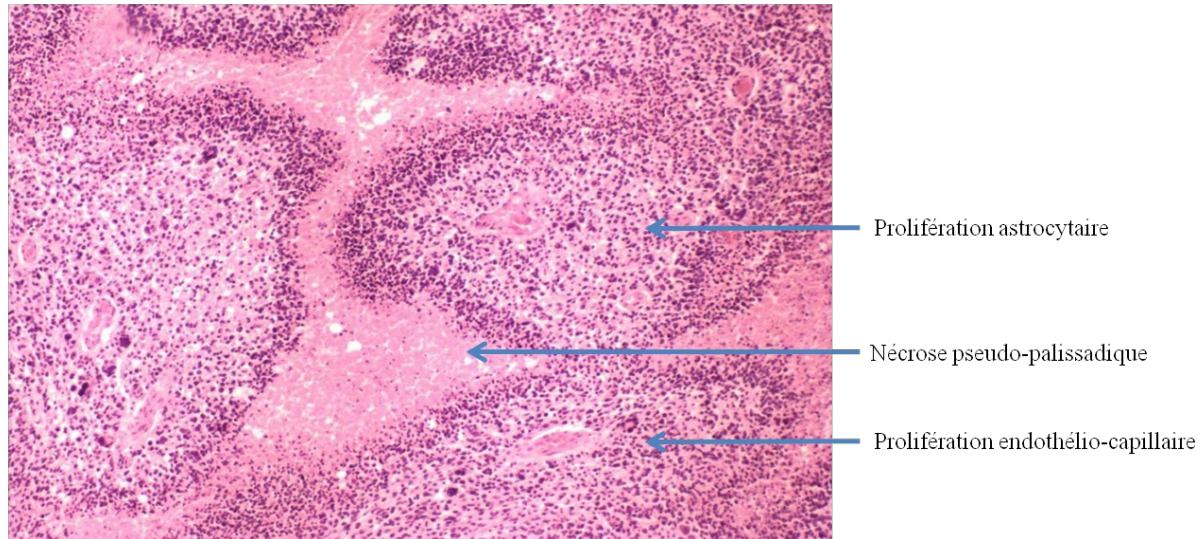


Figure 2 – Image histologique de glioblastome mettant en évidence la prolifération astrocytaire, la nécrose pseudo-palissadique et la prolifération endothélio-capillaire.

2. Gliomagenèse et anomalies moléculaires

Les glioblastomes peuvent survenir *de novo* (primaire, 90% des cas), ou peuvent être issus de la transformation d'un gliome de bas grade en grade III puis IV (glioblastome secondaire). Les anomalies moléculaires sont alors variables (Figure 3) (Figarella-Branger et al., 2013). Récemment, les mutations d'*IDH1/2* ont été rapportées comme étant des anomalies précoces de la gliomagenèse, principalement associées aux gliomes de grade II et III (Parsons et al., 2008; Yan et al., 2009). Ainsi, leur présence serait fortement évocatrice d'un glioblastome secondaire mais à ce jour elles ont également été rapportées dans environ 5 % des glioblastomes *de novo* (Sanson et al., 2009). La classification de ces dernières entités reste débattue et la nouvelle classification de l'OMS devrait permettre une meilleure définition de ses formes frontières.

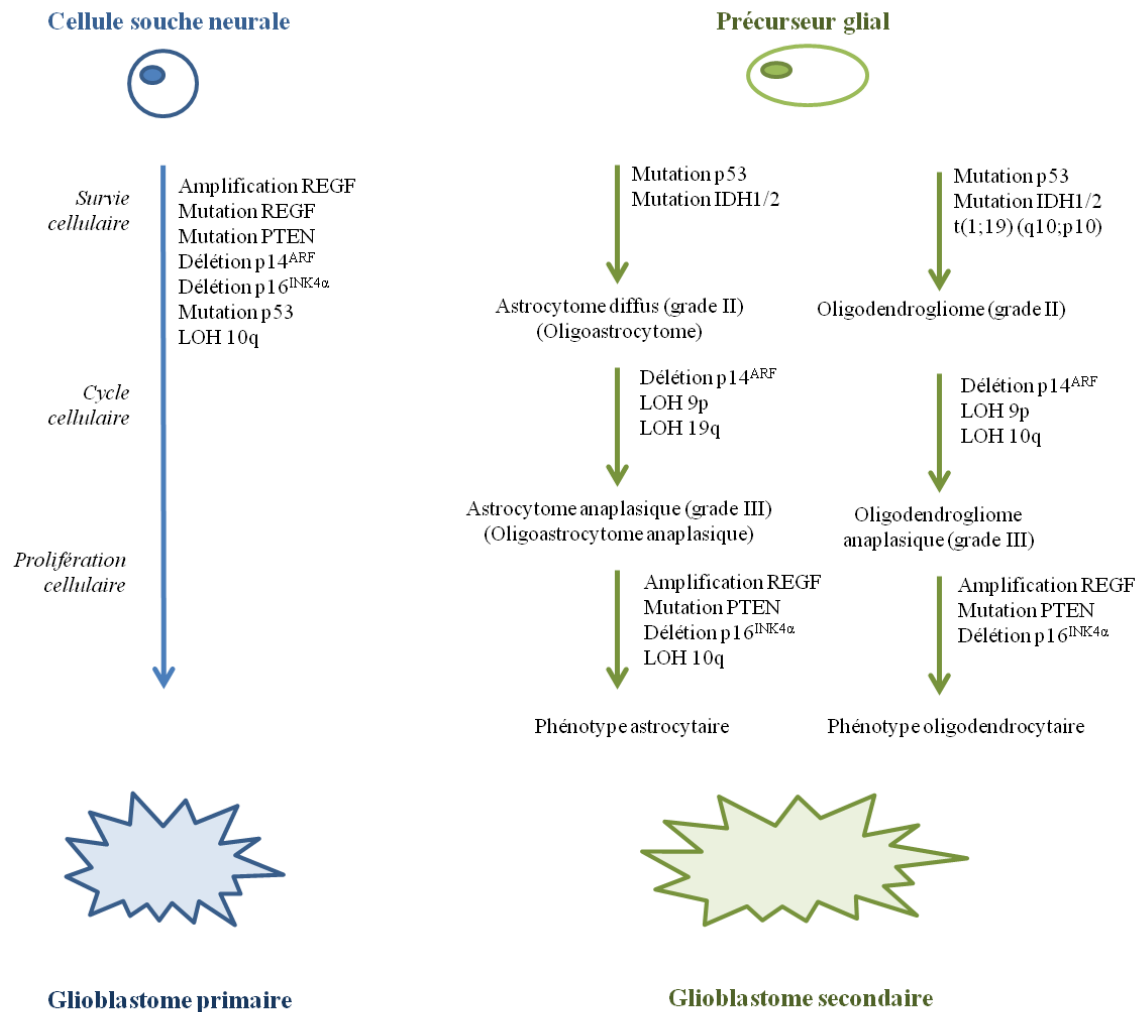


Figure 3 – Modèles de tumorigenèse des tumeurs gliales (Figarella-Branger et al., 2013).

Les anomalies moléculaires impliquées dans la gliomagenèse sont nombreuses (Parsons et al., 2008) et affectent notamment les voies du cycle cellulaire, de la survie cellulaire et de l'apoptose telles que les voies *REGF/PI3K/AKT/PTEN*, *p14^{ARF}-MDM2-p53*, *p16^{INK4α}-CDK4-RB1*... Il existe également d'autres anomalies chromosomiques comme la perte d'hétérozygotie du chromosome 10q. Les analyses génomiques et transcriptomiques, rapportées notamment dans le cadre du Cancer Genome Atlas (TCGA), ont permis l'élaboration de classifications moléculaires. La première (Phillips et al., 2006), classe les glioblastomes en trois sous-catégories moléculaires : proneurale, proliférante et mésenchymateuse. La classification plus récente de Verhaak *et al*, (Verhaak et al., 2010) propose une répartition des glioblastomes en quatre sous-groupes moléculaires : proneural, neural, mésenchymateux et classique. Ces différentes classes étaient initialement associées à des évolutions cliniques différentes avec un pronostic plus favorable pour le groupe proneural.

Néanmoins, récemment, ces valeurs pronostiques ont été remises en cause par le démembrement moléculaire de ces sous-groupes (Brennan et al., 2013; Noushmehr et al., 2010; Turcan et al., 2012). En effet, le groupe proneural incluant les patients mutés *IDH1/2*, leur profil favorable était principalement associé à la présence de ces anomalies. Ces dernières formes étant exclues, le pronostic de ce groupe rejoint celui des autres sous-groupes. Ainsi, à l'heure actuelle, ces classifications moléculaires apparaissent reproductibles et robustes. Néanmoins, leur utilisation en pratique courante reste encore limitée par l'accessibilité aux techniques de détermination et par l'absence d'impact décisionnel actuel de ces groupes.

D'un point de vue épigénétique, un profil hyper-méthylé a été rapporté dans environ 10% des glioblastomes (Noushmehr et al., 2010). Ces profils apparaissent enrichis en sous-type moléculaire de type proneural et sont fortement associés à la présence d'une mutation *IDH1* (Turcan et al., 2012). En effet, celle-ci semble déterminante dans l'établissement d'un phénotype hyper-méthylé, entraînant un remodelage du méthylome, indépendamment du grade tumoral. Par ailleurs, la méthylation du promoteur de l'enzyme MGMT est l'une des anomalies moléculaires les plus fréquemment identifiées dans les glioblastomes (Hegi et al., 2005). Ce gène code pour un enzyme de réparation des lésions de l'ADN causées par les agents alkylants (tel que le témozolomide) et pourrait donc prédire leur activité. A l'heure actuelle, son utilisation en pratique courante se heurte aux difficultés techniques concernant la détermination du statut méthylé/non méthylé. Dans ce contexte, une évaluation prospective et comparative est en cours de réalisation par le groupe français de neuropathologie (Quillien et al., 2012). De plus, l'absence de réelle alternative chez les sujets de moins de 60 ans en limite l'utilisation. En revanche, il semble beaucoup plus intéressant, voire décisionnelle, dans la population des sujets âgés, plus fragiles, où l'utilisation des alkylants peut être une alternative à la radiothérapie (Wick et al., 2012).

3. Epidémiologie et présentation clinico-radiologique des glioblastomes

Les glioblastomes sont des tumeurs rares, touchant environ 3 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants en Europe et en Amérique du Nord. Peu de facteurs de risque sont identifiés et correspondent majoritairement à des syndromes génétiques (Syndrome de Li Fraumeni, neurofibromatose de type 1) ou les radiations ionisantes (Bondy et al., 2008).

La présentation clinique de ces tumeurs est variable et dépend de la localisation tumorale : céphalées intégrées ou non dans un tableau d'hypertension intracrânienne, syndrome déficitaire focal, troubles cognitifs, crise d'épilepsie ou syndrome méningé en cas d'envahissement tumoral des espaces arachnoïdiens. L'état général est le plus souvent

conservé. La dissémination extra SNC est exceptionnelle. L'examen clinique et neurologique est primordial et directement intégré dans les critères de réponse aux thérapeutiques.

Le diagnostic radiologique repose sur l'imagerie par résonnance magnétique (IRM) devant comporter les séquences en T1, T2/FLAIR et T1 avec injection de gadolinium. Cet examen met typiquement en évidence une lésion expansive, unique ou plus rarement multifocale, avec un centre nécrotique, une prise de contraste hétérogène et un œdème périphérique. Ces tumeurs exercent fréquemment un effet de masse sur les structures adjacentes avec un risque d'engagement cérébral. Des séquences supplémentaires peuvent être utilisées pour préciser la nature, les limites d'extension du processus tumoral ou éliminer un diagnostic différentiel (abcès). Par exemple, les séquences de perfusion permettent d'approcher le niveau de vascularisation d'une lésion et donc l'éventuelle néo-angiogenèse présente ; les séquences de diffusion évaluent la densité cellulaire d'une zone pathologique, basse en zone nécrotique, beaucoup plus élevée en zone d'hyper-cellularité. La spectrométrie évalue la constitution en acide aminé d'une zone définie. En cas de lésion tumorale, la concentration en N-Acétyl-Aspartate (NAA : marqueur de viabilité neuronale) sera typiquement abaissée tandis que celle de la Choline (marqueur de renouvellement membranaire) sera augmentée (*Figure 4*).

Enfin, si le TEP scanner ou la TEP IRM cérébrale ne sont pas encore systématiquement utilisés au diagnostic, ils peuvent aider à guider les biopsies et/ou les décisions thérapeutiques au cours du suivi du patient (pause thérapeutique *versus* poursuite du traitement adjuvant ; diagnostic différentiel de radionécrose *versus* progression tumorale).

Au cours du suivi, il est important de noter que les critères de réponse RANO (Response Assessment in Neuro-Oncology) (Wen et al., 2010) se basent sur : 1- l'analyse IRM en séquence T1 avec injection de gadolinium et T2/FLAIR (*Figure 5*) ; 2- la réponse clinique ; et 3- la dose de corticoïdes nécessaire

.

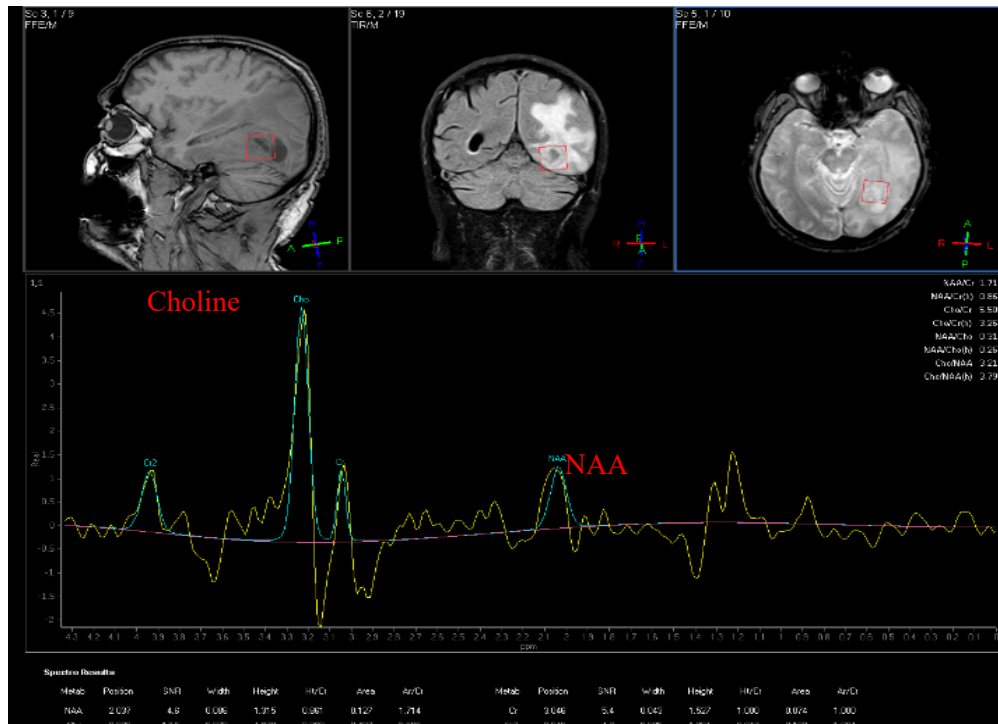


Figure 4- Profil pathologique en spectroscopie IRM d'une lésion tumorale gliale : chute du pic de NAA et augmentation du pic de Choline

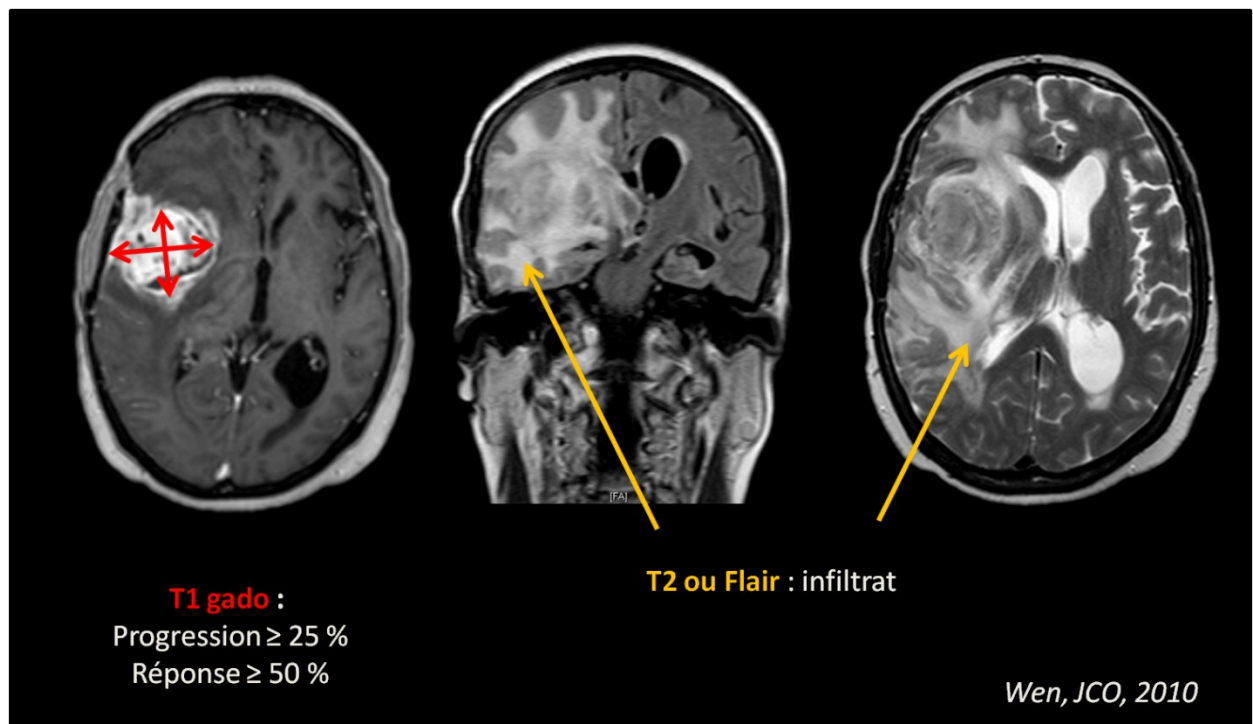


Figure 5 – Présentation radiologique typique d'un glioblastome en IRM séquence T1 avec injection de gadolinium (coupe axiale), FLAIR (coupe coronale) et T2 (coupe axiale). Les critères de réponse radiologique sont les deux plus grands diamètres perpendiculaires de la prise de contraste en T1_{gado} et l'infiltrat T2/FLAIR.

II – Prise en charge thérapeutique

1. Traitement de 1^{ère} ligne

A. Le protocole « Stupp »

La résection chirurgicale, lorsqu'elle est réalisable, est le traitement de première intention. Elle permet d'obtenir le diagnostic histologique et de réduire la masse tumorale. La résection complète macroscopique de la tumeur est généralement recherchée mais reste difficile à obtenir selon la localisation tumorale. Une résection complète microscopique est quant à elle impossible, compte tenu de l'extension à distance systématique des cellules tumorales infiltrantes.

Pour les patients âgés de moins de 70 ans et en bon état fonctionnel (60% des patients environ) le traitement de première ligne repose ensuite sur une association de radiothérapie (dose totale de 60 Gy en 30 fractions sur 6 semaines) et de chimiothérapie par témozolomide (TMZ) concomitante (75 mg/m²/j) puis adjuvante (150 mg/m²/j puis 200 mg/m²/j pendant 5 jours, tous les 28 jours) (Stupp et al., 2005) (*Figure 6*). Ce protocole a été associé à une augmentation significative de la survie sans progression (de 5,0 à 6,9 mois de médiane) et de la survie globale (de 12,1 à 14,6 mois de médiane) en comparaison à l'utilisation de radiothérapie seule. De plus, ce protocole a permis une augmentation du nombre de patients vivants à 5 ans de 1,9 % à 10,4 %.

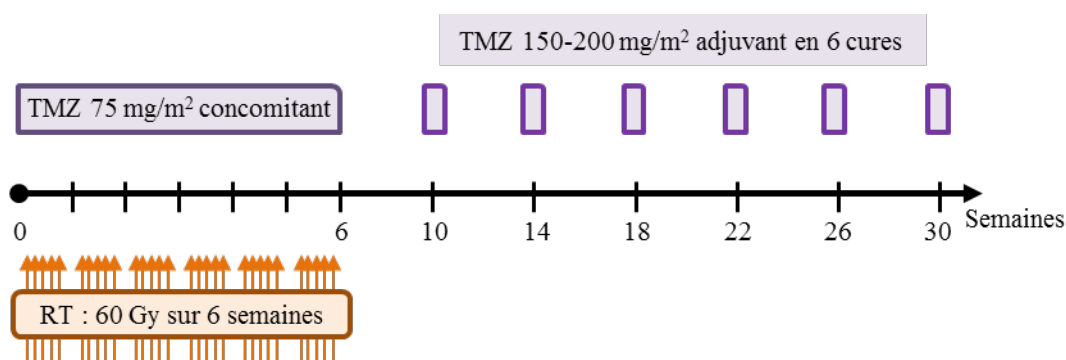


Figure 6 – Design du protocole « Stupp » : radiothérapie et chimiothérapie concomitante puis adjuvante par témozolomide.

Chez les sujets âgés de plus de 70 ans, le traitement de référence est la radiothérapie seule (Keime-Guibert et al., 2007). La chimiothérapie seule par TMZ peut être une option selon l'état fonctionnel du patient et le statut de méthylation du promoteur de l'enzyme MGMT (Gállego Pérez-Larraya et al., 2011). Enfin, l'association radiothérapie-TMZ est en cours d'évaluation dans un essai de phase III dans cette population.

B. Marqueurs pronostiques et/ou prédictifs de réponse

Les facteurs pronostiques de patients porteurs de glioblastome sont cliniques (l'âge au diagnostic, l'état général et l'indice de Karnofsky, la présence de troubles cognitifs), histomoléculaires (l'existence d'une composante oligodendrogliale, d'une mutation d'*IDH1/2*) et thérapeutiques (l'extension de la résection chirurgicale). Parmi ces différents facteurs pronostiques, le statut de méthylation du promoteur du gène de la *MGMT* pourrait être associé au bénéfice du témozolomide. Les résultats de l'essai de phase III chez les sujets jeunes (Hegi et al., 2005) et l'essai de phase III chez les sujets âgés (Wick et al., 2012), comparant radiothérapie et TMZ, seraient en faveur de cet effet prédictif. En effet, ils rapportent une survie significativement meilleure chez les patients méthylés traité par TMZ *versus* les patients non méthylés, tandis qu'une telle différence n'est pas retrouvée chez les patients traités par radiothérapie seule. Néanmoins, à ce jour, aucune évaluation prospective de l'impact prédictif du statut de méthylation n'a été réalisée spécifiquement et son utilisation en pratique clinique se heurte à différentes difficultés.

2. Glioblastome à la récurrence

La récurrence est inévitable et peu d'options thérapeutiques sont alors disponibles.

A. Les chimiothérapies classiques

A la récurrence, les agents cytotoxiques sont associés à une activité limitée. Les nitrosourés (CCNU et BCNU) présentent un effet modéré associé à des taux de réponse modestes (Reithmeier et al., 2010; Wick et al., 2010) et une toxicité non négligeable nécessitant une surveillance rapprochée. Les autres agents cytotoxiques comme la procarbazine, l'irinotecan, le carboplatine et l'étoposide ont été associés pour leur part à des faibles taux de réponse et des survies limitées (Friedman et al., 1999; Jeremic et al., 1992; Newton et al., 1990).

B. Les anti-angiogéniques

Le bevacizumab, un anticorps monoclonal anti-VEGFA, a été la première molécule associée à une activité intéressante dans les glioblastomes à la récurrence (Friedman et al., 2009; Kreisl et al., 2009). Il a été approuvé dans cette indication par la FDA (*Food and Drug Administration*) en 2009 sur la base d'essais non comparatifs. Son utilisation a été associée à des taux de réponse de 28% à 38% ainsi qu'à des médianes de survie globale de 8,8 à 9,3 mois à la récurrence (*Tableau 2*). Néanmoins, la réponse au bevacizumab reste hétérogène.

	N	PFS 6 mois, %	Taux de réponse	Médiane PFS (mois)	Médiane OS (mois)
Bevacizumab + irinotecan					
Kreisl, JCO 2009	48	29	35 %	3.7	7.1
Bevacizumab + irinotecan					
Friedman, JCO 2009	82	50	38 %	5.6	8.7
Contrôles Historiques					
Wick, 2010 (CCNU)	92		4.3 %	1.6	7.1
Wong, 1999	225	15	6 %	2	6.0

Tableau 2 – Taux de réponse et survies associés à l'utilisation du bevacizumab ou de chimiothérapies cytotoxiques classiques.

Récemment, la place du bevacizumab en première ligne thérapeutique a été évaluée dans deux essais multicentriques de phase III (AVAglio et le RTOG0825) (Chinot et al., 2014; Gilbert et al., 2014). Ces essais ont mis en évidence une augmentation de la médiane de survie sans progression, de 4 mois environ, chez les patients traités par bevacizumab. En revanche, aucune différence de survie globale n'a été observée, dont la médiane était de 16 à 17 mois. A noter qu'une partie des patients du bras contrôle avait été traité par bevacizumab à la récurrence. En parallèle, l'évaluation de la qualité de vie des patients dans ces deux grands essais était contradictoire. Si l'étude du RTOG 0825 présente une tendance à la diminution de la qualité de vie des patients dans le bras bevacizumab, elle n'est pas aggravée dans l'étude AVAglio et reste conservée significativement plus longtemps dans le bras expérimental. De plus, dans l'essai AVAglio, l'autonomie des patients, évaluée comme la durée de préservation d'un KPS (Karnofsky Performans Status) ≥ 70 , est maintenue plus longtemps dans le bras bevacizumab. Ces derniers résultats représentent un aspect important de l'analyse du bénéfice d'un traitement tout particulièrement en neuro-oncologie où les patients sont fréquemment confrontés à un handicap inhérent à la maladie, péjoratif en termes de qualité de vie et d'autonomie.

Ainsi, suite à ces premiers résultats débattus, l'identification de biomarqueurs capables de prédire l'efficacité ou l'absence de réponse au bevacizumab semble indispensable.

III - L'angiogenèse et son interaction avec l'invasivité tumorale

Sur le plan biologique, le glioblastome se caractérise par une importante invasivité et une néo-angiogenèse très développée, ce qui en fait un bon modèle d'étude de ce phénomène.

1. L'angiogenèse et les facteurs angiogéniques

Au-delà d'une taille de 2 à 3 mm³, une lésion tumorale doit générer son propre réseau vasculaire afin d'assurer un apport suffisant en nutriments et en oxygène (Folkman, 1971). L'angiogenèse est un phénomène local correspondant à la formation de nouvelles ramifications vasculaires à partir de vaisseaux préexistants (Carmeliet and Jain, 2011). L'initiation de ce phénomène résulte d'un déséquilibre en faveur de facteurs pro-angiogéniques aux dépens de facteurs stabilisateurs de l'endothélium : il s'agit du « switch angiogénique » (*Figure 7*). Ce déséquilibre est favorisé par l'apparition de zones d'hypoxie intra-tumorale, secondairement auto-entretenues par la formation d'un réseau vasculaire anarchique et instable (Carmeliet et al., 1998). La néo-angiogenèse est une caractéristique majeure des lésions gliales malignes et constitue l'un des mécanismes clés de leur progression et de leur agressivité. La famille du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et ses récepteurs sont les principaux acteurs de ce processus. Elle comprend plusieurs molécules dont la mieux caractérisée à l'heure actuelle est le VEGFA (Ferrara et al., 2003). Les autres facteurs apparentés sont le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D, le VEGF-E et le placenta growth factor (PlGF).

A. Le VEGFA

Le VEGFA a été décrit pour la première fois en 1983 puis caractérisé en 1989 par l'équipe de Ferrara (Leung et al., 1989). Il peut exister sous forme soluble ou lié à la matrice extracellulaire (MEC). La surexpression du VEGFA a été rapportée dans de nombreux types tumoraux dont le glioblastome.

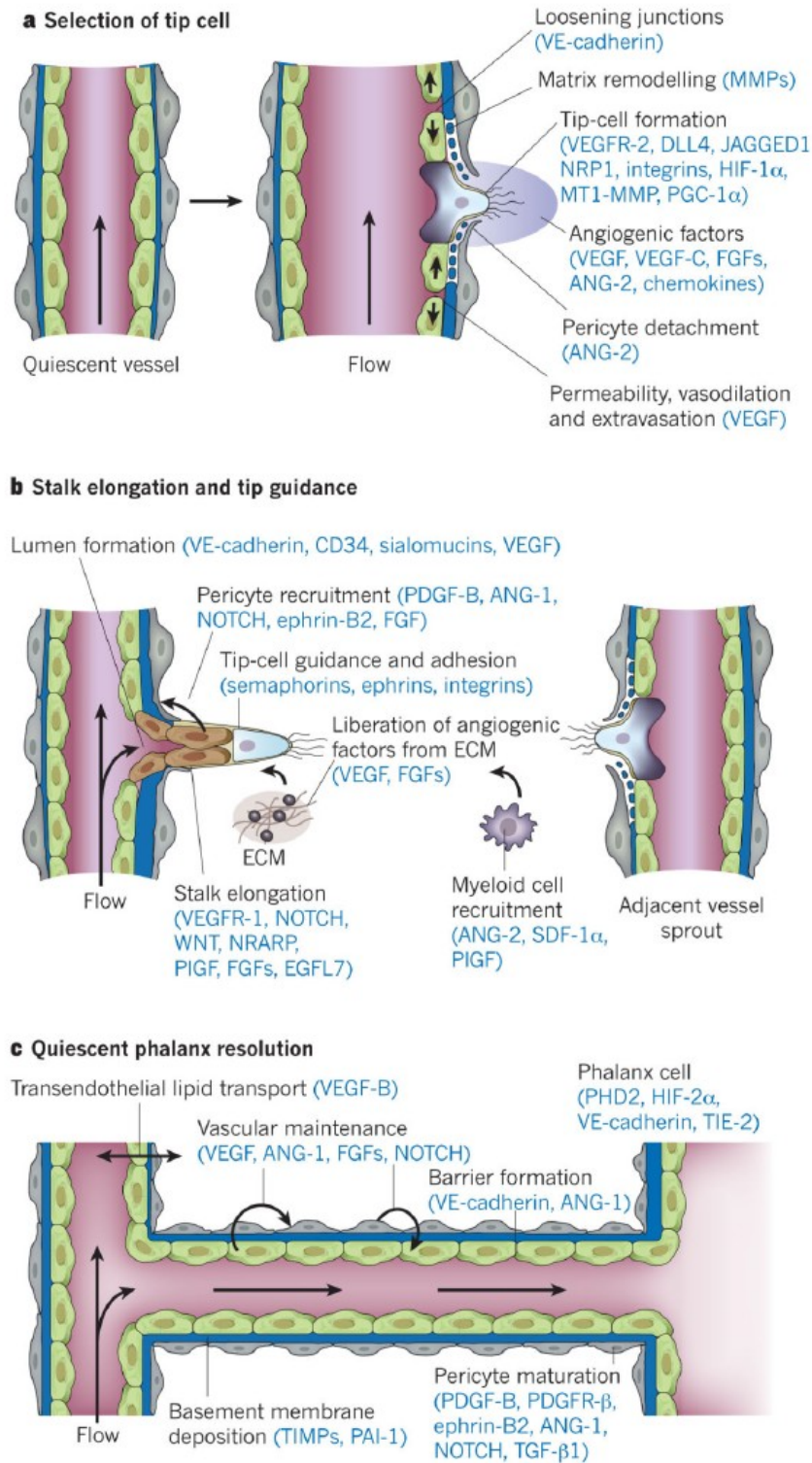


Figure 7 – D'après Carmeliet P. et Jain RK., *Nature*, 2011. Les phases successives de l'angiogenèse.

Il est majoritairement sécrété par les cellules tumorales mais également par d'autres types cellulaires (plaquettes, cellules musculaires, cellules du stroma...). Au sein du processus néo-angiogénique, il contribue dans un premier temps au détachement des péricytes et à l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Le VEGFA stimule ensuite les cellules endothéliales présentes à l'extrémité des néo-vaisseaux (*tip cells*) et favorise ainsi leur progression et la création de nouvelles branches vasculaires. Le VEGFA est également impliqué dans la survie et la prolifération des cellules endothéliales ainsi que dans leurs capacités migratrices et invasives. L'un des plus puissants inducteurs du VEGFA est l'hypoxie, phénomène majeur des processus tumoraux, grâce à l'action de facteurs tels que l'Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 α , -2 α et du gène suppresseur de tumeur Von-Hippel Lindau (VHL) (Carmeliet et al., 1998). De nombreux facteurs de croissance peuvent également réguler son expression, comme la famille des récepteurs à l'EGF (epidermal growth factor), l'HGF (hepatocyte growth factor) ou les récepteurs au PDGF (platelet-derived growth factor) (Ferrara et al., 2003).

B. Les récepteurs au VEGF (VEGFR)

Les récepteurs au VEGF (VEGFR) sont des glycoprotéines transmembranaires : le VEGFR1 (FLT1), le VEGFR2 (KDR) et le VEGFR3 (FLT4). Le VEGFR2 peut lier toutes les isoformes du VEGF à l'exception du VEGFB et joue un rôle central dans l'angiogenèse en tant que récepteur principal du VEGFA. Son expression est limitée aux cellules vasculaires (endothéliales matures et progénitrices circulantes) (Carmeliet and Jain, 2011). Le VEGFR1 est exprimé à la surface des cellules vasculaires, des monocytes-macrophages et de divers types cellulaires tumoraux. Il existe également sous forme soluble. Il se lie au VEGFA avec une affinité dix fois supérieure au VEGFR2 mais possède de faibles propriétés de transduction. Il pourrait jouer un rôle de régulateur négatif.

C. Autres facteurs

D'autres molécules participent au phénomène de néo-angiogenèse, comme le basic fibroblast growth factor (bFGF), le transforming growth factor β (TGF β), la chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12) et le Placenta growth factor (PlGF). Il semble exister une synergie d'activité entre le PlGF et le VEGFA par leur récepteur commun, le VEGFR1, permettant une stimulation accrue du VEGFR2 par le VEGFA en cas de surexpression du PlGF (Carmeliet et al., 2001).

L'adrénomédulline (AM) est un neuropeptide dont la forte expression dans les glioblastomes a été documentée par notre équipe (Fernandez-Sauze et al., 2004; Kaafarani et al., 2009). Elle participe à la progression tumorale *via* ses récepteurs CLR/RAMP2 et CLR/RAMP3, avec un effet paracrine/autocrine sur la prolifération des cellules tumorales gliales *in vitro* et *in vivo*. L'AM joue également un rôle important dans la mise en place d'une vascularisation fonctionnelle nécessaire à la croissance tumorale. Cet effet passe par l'action directe de l'AM sur les cellules endothéliales et les péricytes mais également par une action de recrutement de précurseurs endothéliaux circulants. Il a été démontré que des anticorps anti-AM et anti-récepteur de l'AM inhibent la prolifération tumorale et la néo-angiogenèse *in vitro* et *in vivo* sur des lignées cellulaires gliales tumorales.

Le processus d'angiogenèse implique également le remodelage de la MEC, nécessaire à l'extension des néo-vaisseaux et à la libération des facteurs de croissance qui y sont séquestrés. Ce processus implique notamment l'uPA, le PAI1 (Montuori and Ragno, 2014) et différentes Matrice Métalloprotéinases (MMP) comme MMP2, MMP7 et MMP9 (Carmeliet and Jain, 2011).

2. MMP2 et MMP9

MMP2 et MMP9 sont des Matrice Metalloprotéinases, dont le rôle principalement décrit dans le processus angiogénique est la dégradation initiale de la membrane basale vasculaire et le remodelage de la MEC, permettant la migration des cellules endothéliales et l'extension des néo-vaisseaux. De plus, le remodelage du micro-environnement tumoral entraîne la libération de facteurs de croissance pro-angiogéniques, comme le VEGFA. Récemment, leurs rôles dans la néo-vascularisation tumorale ont été précisés (*Figure 8*).

En effet, il a été rapporté une interaction directe entre MMP2 et les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha5\beta1$ conduisant à l'activation de la voie PI3K-Akt entraînant la sécrétion du VEGFA par l'intermédiaire d'HIF1 α (Bauvois, 2012; Chetty et al., 2008, 2010). En parallèle, MMP2 a été rapporté comme étant co-exprimé et co-régulé avec le VEGFR2 (Du et al., 2008). Enfin, MMP2 participe à la stabilisation des néo-vaisseaux formés et à leur recouvrement par les péricytes. Ainsi, MMP2 semble jouer un rôle central dans le processus classique d'angiogenèse.

En parallèle, MMP9 semble impliqué dans un processus de vascularisation différent et complémentaire, appelé vasculogenèse (Ahn and Brown, 2008). Si l'angiogenèse correspond à la ramification et la croissance de vaisseaux pré-existants, la vasculogenèse implique la

formation d'une nouvelle vascularisation *de novo*, à partir de précurseurs myéloïdes et endothéliaux circulants (Carmeliet and Jain, 2011). Le recrutement de ces précurseurs circulants implique la voie CXCR4-CXCL12 mais également l'expression de MMP9, sécrété à son tour par les précurseurs recrutés, auto-entretenant le phénomène. MMP9 apparait comme étant essentiel au processus de vasculogénèse, indépendamment de la voie VEGFA-VEGFR2.

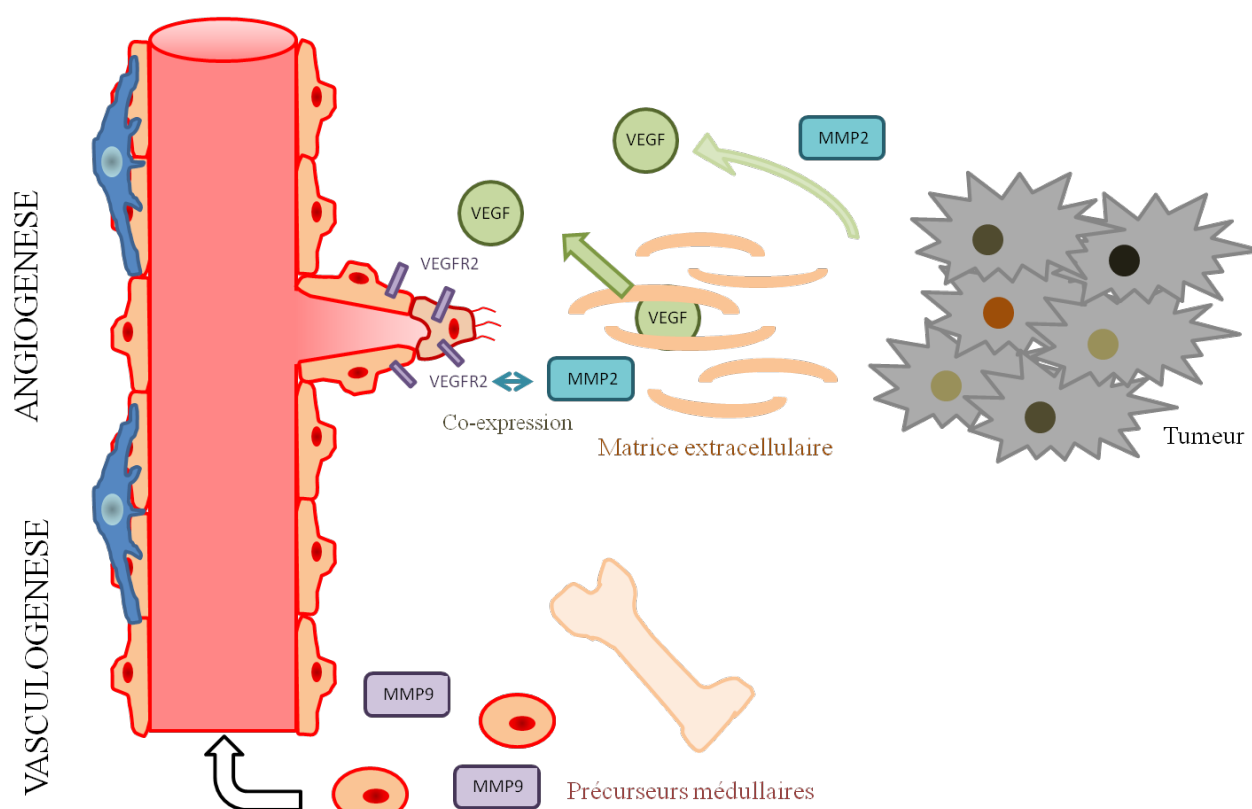


Figure 8 – Implication de MMP2 dans l'angiogenèse et de MMP9 dans la vasculogénèse.

3. Développement thérapeutique et angiogénèse

Au cours des dix dernières années, l'utilisation d'anti-angiogéniques s'est développée en oncologie conduisant à l'enregistrement de différentes molécules (bevacizumab, sunitinib, sorafenib, axitinib...etc.) dans de multiples indications. Néanmoins, une hétérogénéité de réponse est rapportée dans chaque type tumoral (*Tableau 3*) (Hurwitz et al., 2004; Kreisl et al., 2009; Miller et al., 2007; Perren et al., 2011; Sandler et al., 2006; Yang et al., 2003). De plus, ces réponses peuvent être de durée variable : très brève pour certains patients ou plus prolongée pour d'autres, ces réponses étant alors associées à un réel bénéfice clinique. Enfin, l'obtention d'une réponse sous anti-angiogénique n'est qu'imparfaitement superposable à l'amélioration de la survie sans progression et de la survie globale des patients. Ainsi, en tenant compte des effets secondaires de ces thérapeutiques et dans le contexte économique actuel, l'identification de marqueurs prédictifs de l'efficacité de ces traitements anti-angiogéniques semble prioritaire.

Premier auteur	Primitif	Taux de réponse	Δ PFS	Δ OS
Kreisl	Gliome de haut grade récidivant	37,8 %	-	-
Hurwitz	Colo-rectal	44,8 %	4,4	4,7
Miller	Sein	36,9 %	5,9	1,5
Yang	Rein	10 %	2,3	-
Perren	Ovaire	67 %	2,4	-
Sandler	Poumon	35 %	1,7	2,0

Tableau 3 –Taux de réponse et bénéfice en PFS et en OS lors de l'utilisation du bevacizumab dans différents sous-types tumoraux.

Un biomarqueur idéal doit être facile à mesurer, accessible à différents temps du traitement et doit pouvoir subir une analyse standardisée et reproductible (Duda et al., 2010). Concernant de potentiels marqueurs prédictifs de réponse au bevacizumab, de nombreux facteurs ont déjà été évalués à l'initiation ou au cours du traitement (Jubb and Harris, 2010). Néanmoins, à l'heure actuelle, leur valeur prédictive reste limitée. En effet, ces résultats n'ont que rarement été confirmés sur d'autres études ou confrontés à des cohortes contrôles sans agent anti-angiogénique afin de déterminer leur véritable valeur prédictive. L'expression des marqueurs

tissulaires comme le VEGFA, le VEGFR2, le CA9 ainsi que celle des marqueurs plasmatiques comme le VEGFA, le VEGFR1, l'intercellulaire adhesion molecule 1 et les interleukines 6 et 8 ont été rapportées comme potentiellement associées à l'activité du bevacizumab mais leur valeur prédictive est modeste et généralement corrélée à un seul critère (réponse, survie sans progression ou survie globale). Concernant d'autres agents anti-angiogéniques, comme le cediranib dans les glioblastomes (Batchelor et al., 2007) ou le vandetanib dans les carcinomes bronchiques à petites cellules (Hanrahan et al., 2010), de nombreux pré-biomarqueurs, incluant le VEGFA, VEGFR2, le PGF, le bFGF, et le MMP2 ont présenté des variations transitoires, partiellement associées à la progression tumorale ou à la survie des patients. Néanmoins, aucun de ces résultats n'a pu être reproduit et validé.

Ainsi, face à l'activité très intéressante mais inconstante du bevacizumab en neuro-oncologie, notre objectif a été d'évaluer la valeur prédictive de réponse et de survie de biomarqueurs plasmatiques pré-sélectionnés, chez des patients porteurs de gliomes de haut grade à la récurrence.

1. Patients

Cohorte 1 : cohorte prospective traitée par bevacizumab

La cohorte 1 était composée de 26 patients inclus prospectivement à l'Hôpital de la Timone (Service de Neuro-Oncologie), de juillet 2007 à janvier 2010.

Les critères d'inclusions étaient les suivants :

- Patient âgé de 18 ans ou plus,
- Porteur d'un gliome de haut grade à la récurrence,
- Candidat à l'initiation d'un traitement par bevacizumab au minimum 3 mois après la fin de la radiothérapie (pour éviter l'inclusion de patient présentant une potentielle pseudo-progression).

Aucun patient n'a été biopsié à la récurrence. L'histologie décrite dans le tableau 1 était celle du diagnostic initial.

Tous les patients ont reçu une association de bevacizumab (10 mg/kg) et d'irinotecan (125 mg/m²), tous les 14 jours. Le plasma des patients a été collecté avant l'initiation du traitement par bevacizumab (J1) puis au cycle 2 (J15), cycle 3 (J29) puis tous les 14 jours jusqu'à progression. Seuls les résultats des prélèvements initiaux (J1) et au J15 ont été analysés dans cette étude. Les caractéristiques des 26 patients de la cohorte 1 sont reportées dans la Table 1. Lors de l'analyse finale, 24 patients sur 26 étaient décédés (tous de progression tumorale).

Tous les patients ont signé un consentement écrit après information orale et écrite, en accord avec les recommandations institutionnelles et la déclaration d'Helsinki.

Cohorte 2 : cohorte rétrospective traitée par bevacizumab

Au vu des premiers résultats de la cohorte prospective, nous avons identifié dans notre plasmathèque une seconde cohorte rétrospective de 50 patients porteurs de gliomes de haut grade ayant reçu un traitement par bevacizumab et irinotecan à la récurrence, entre août 2007 et mars 2010. Pour ces patients, les prélèvements plasmatiques n'ont été réalisés qu'au moment de l'initiation du traitement par bevacizumab (J1). Les protocoles thérapeutiques, l'évaluation et le suivi des patients étaient similaires à ceux de la cohorte prospective. Les patients présentaient des caractéristiques cliniques similaires à ceux de la cohorte 1 en dehors d'un

KPS plus altéré (40% d'entre eux avaient un KPS < 70% *versus* 15,4% dans la cohorte 1) et un nombre de lignes de traitements antérieurs plus important. Lors de l'analyse finale, tous les patients de cette deuxième cohorte étaient décédés des suites de leur maladie.

Cohorte 3 : cohorte contrôle rétrospective traitée sans bevacizumab

La cohorte 3 constituait un groupe contrôle formé de patients suivis dans les Hôpitaux d'Avicennes (APHP, Bobigny, France) et du Groupe hospitalier de la Pitié-Salpêtrière (APHP, Paris, France). Les critères d'inclusion étaient les suivants :

- Patient âgé de 18 ans ou plus
- Porteur d'un gliome de haut grade à la récurrence
- Traité par chimiothérapie cytotoxique ou immunothérapie à la récurrence
- N'ayant jamais reçu de traitement anti-angiogénique durant l'ensemble de leur maladie.

Les prélèvements plasmatiques ont été réalisés à l'initiation du traitement de la récurrence (J1).

2. Suivi clinique

Le suivi clinique des patients était réalisé toutes les 4 semaines. Un contrôle IRM était réalisé toutes les 8 semaines, analysé par un neuro-oncologue (MB, MM, OC). L'évaluation des réponses tumorales a été réalisée selon les critères de MacDonald modifiés pour tenir compte des modes de progression infiltrative sur les séquences T2/FLAIR. Pour être confirmées, les réponses devaient être maintenues sur l'IRM suivante réalisée 2 mois plus tard. A la fin de l'étude, la qualité des réponses et les dates de progression ont été rétrospectivement relues (EM, OC) selon les critères RANO actuels (Revised Assessment in Neuro-Oncology criteria (Wen et al., 2010)) sans modification majeure de l'évaluation initiale.

3. Analyses plasmatiques

Les plasmas des patients ont été collectés à l'initiation du cycle 1 (J1), avant l'injection de bevacizumab, puis, pour la cohorte 1, tous les 14 jours jusqu'à progression (*Figure 9*). Les prélèvements sanguins étaient collectés dans des tubes citratés, centrifugés 30 minutes puis stockés à -80° (Assistance Publique–Hôpitaux de Marseille Tumor Bank, AR 2008/70, certification iso-9001).

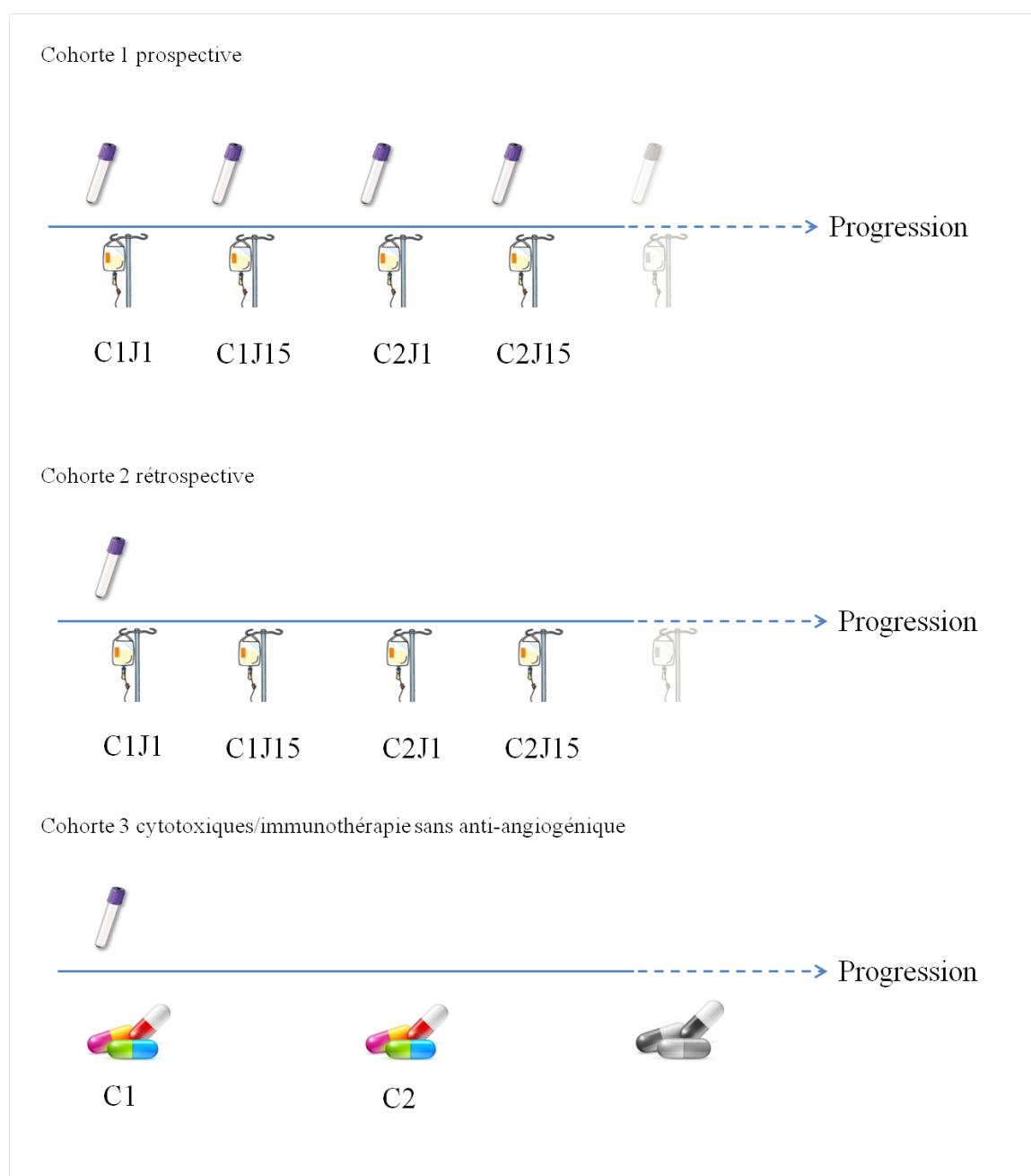


Figure 9 – Temps de prélèvement plasmatique dans la cohorte 1 (prospective), la cohorte 2 (rétrospective) et la cohorte 3 contrôle (cytotoxique et immunothérapie)

Les dosages plasmatiques des protéines suivantes ont été réalisés : VEGFA, VEGFR2, PlGF, bFGF, CXCL12, uPA, PAI1, adrénomedulline (AM), MMP2, MMP7 et MMP9. Les dosages ont été réalisés par des kits ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, R&D systems ®) en duplicate (*Figure 10*). La moyenne des deux dosages a été retenue. Les plasmas de 16 volontaires sains ont été analysés comme contrôle interne. L'analyse des cinétiques a été faite en dichotomisant l'évolution des taux plasmatiques entre l'initiation du traitement (J1) et le J15 en 2 catégories : augmentation ou diminution du taux plasmatique des marqueurs.

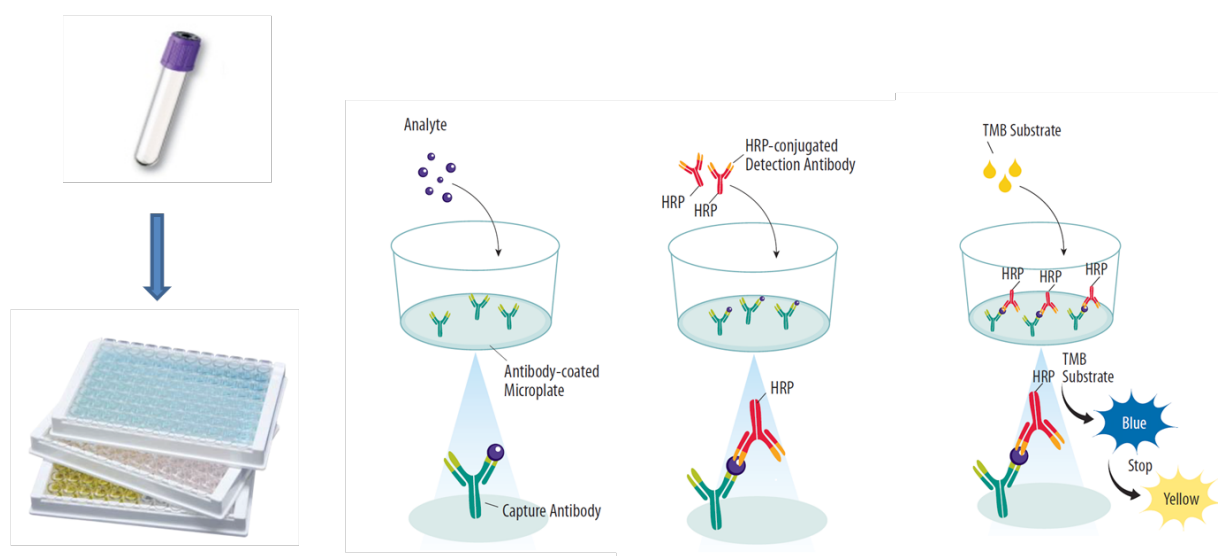


Figure 10 – Dosage ELISA des protéines d'intérêt par les kits R&D systems ®

4. Analyses statistiques

Les variables catégorielles ont été présentées en fréquences et pourcentages, les variables continues en médianes et valeurs extrêmes (minimum-maximum). La survie globale (OS) a été définie comme le délai depuis l'initiation du traitement par bevacizumab jusqu'au décès du patient pour toute cause, censuré à la date de dernière nouvelle. La survie sans progression (PFS) a été définie comme le délai depuis l'initiation du bevacizumab jusqu'à la progression ou le décès du patient, censuré à la date de la dernière évaluation tumorale. Les survies ont été analysées par la méthode du Kaplan-Meier. Les analyses univariées ont été réalisées par le test du Log-Rank, les analyses multivariées par les modèles de Cox. Les patients ont été séparés en répondeurs (réponse complète ou partielle) et non répondeurs.

(maladie stable ou progression). Les meilleures réponses évaluées étaient significativement corrélées à la survie des patients. Les taux plasmatiques des marqueurs ont été séparés en deux groupes, dichotomisés par la valeur médiane afin d'obtenir deux groupes de même taille. Les corrélations ont été analysées par les tests de Mann Whitney U et de Spearman pour les variables quantitatives et par les tests du Chi² et de Fisher pour les variables qualitatives. Les *p value* étaient bilatérales et la valeur seuil de significativité retenue était $< 0,05$. La sensibilité et la spécificité des seuils retenus concernant la prédiction des réponses ont été analysées à l'aide de courbe de ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Les analyses finales ont été clôturées en décembre 2012. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS® version 17.

Cohorte 1 (Table 1-3, Fig. 1, Figure 11 & 12)

Dans la cohorte prospective (n=26), la PFS médiane était de 4,4 mois (intervalle de confiance à 95% [IC95] : 2,1-5,5) avec une OS médiane de 8,7 mois (IC95 : 5,3-11,7). Parmi les 25 patients évaluable pour la réponse, 12 (48%) présentaient une réponse objective (RO) selon les critères RANO (réponse complète ou partielle), tandis que 13 (52%) étaient non répondeurs (stable ou en progression). Concernant les patients répondeurs, l'OS médiane était de 13 mois (IC95 : 5,8-20,1) tandis qu'elle était de 4,5 mois (IC95 : 2,7-6,2) pour les non répondeurs ($p<0,001$).

Table 1. Characteristics of patients' in Cohorts 1, 2, and 3

	Cohort 1 (n = 26)		Cohort 2 (n = 50)		Cohort 3 (n = 34)	
Age, y (range)	56.1 (22.3 – 73.2)		59.7 (18.3 – 76.7)		57.7 (36.2 – 73.9)	
Gender	16 M/10 F n Patients %		34 M/16 F n Patients %		22 M/12 F n Patients %	
Initial histology						
Grade II	1	3.8	5	10	0	0
Anaplastic	5	19.2	14	28	2	6
Glioblastoma	20	76.9	31	62	32	94
IDH1 mutation	3/18	16.7				
Response	12	48	18	36.7	1	3.2
Complete	3	12	1	2	–	–
Partial	9	36	17	34.7	1	3.2
No response	13	52	31	63.3	30	86.8
Stable disease	2	8	15	30.6	3	9.7
Progression	11	44	16	32.7	27	87.1
Nonevaluable	1		1		1	
Treatment lines*						
2	15	57.5	21	46	8	23.5
3	7	26.9	24	48	17	50
4	3	11.5	4	4	6	17.6
≥5	1	3.8	1	2	3	8.9
KPS						
50	0	0	2	4	2	6.1
60	4	15.4	18	36	5	15.2
70	15	57.7	18	26	11	33.3
≥80	7	26.9	12	24	15	45.4
OS (mo)	8.7		7.1		6.1	
Responders	13		14.6			
Nonresponders	4.5		5.8			
PFS (mo)	4.4		5.3		1.9	
Responders	8.2		8			
Nonresponders	2.8		3			

*Before bevacizumab initiation.

En analyse qualitative, une forte association a été mise en évidence entre la RO, la PFS et l'OS et les taux plasmatiques de MMP2 et MMP9. Parmi les 12 patients avec un taux initial élevé de MMP2 (> 227,5 ng/ml, valeur médiane), 10 RO ont été observées (**83,3%**). En revanche, parmi les 13 patients présentant un taux bas de MMP2, seuls 2 patients (**15,4%**) ont présenté une RO ($p=0,001$, Table 2.). Cette corrélation restait positive lorsque le taux plasmatique de MMP2 était analysé en variable continue ($p=0,005$). Inversement, un taux bas de MMP9 (<235 ng/ml, valeur médiane) était associée à une probabilité de réponse plus importante ($p=0,041$). Néanmoins, en analyse continue, cette corrélation n'était pas confirmée ($p=0,094$).

Table 2. Response rates according to patient cohorts and plasmatic MMP2 level

	Cohort 1			Cohort 2		
	Responders	Nonresponders	Response Rate	Responders	Nonresponders	Response Rate
MMP2 < median Cohort 1	2	11	15,4%	6	28	17,6%
MMP2 > Median Cohort 1	10	2	83,3%	12	3	80%
P value			.001			<.001

Une analyse ROC (Figure 11) a été réalisée afin d'évaluer les capacités discriminatives du taux plasmatique de MMP2 sur la RO au bevacizumab. Le taux plasmatique de MMP2 était significativement lié à la réponse ($p=0,002$) avec une aire sous la courbe (AUC) de **0,827** (IC95 : 0,624-0,947). Avec une valeur seuil optimale de 227,5 ng/ml, la sensibilité était de **83,3%** (IC95 : 50,9-97,1) et la spécificité de **84,6%** (IC95 : 53,7-97,3).

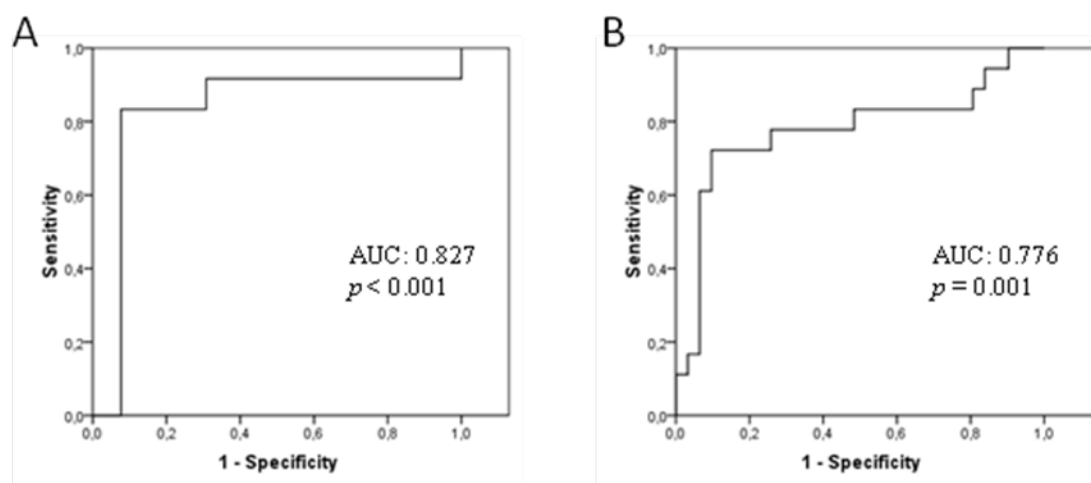


Figure 11 – Analyse ROC de la corrélation du taux plasmatique de MMP2 dans la cohorte 1 (A) et dans la cohorte 2 (B).

En analyse univariée (Table 3.), le taux plasmatique de MMP2 était significativement corrélé à la PFS ($p=0,004$) et l'OS ($p=0,001$), de même que le taux plasmatique de MMP9 (PFS : $p=0,007$; OS : $p=0,015$) (Figure 12). Les patients avec un taux élevé de MMP2 avaient une PFS médiane de **7,3** mois (IC95 : 5,2-9,4) et une OS médiane de **12,8** mois (IC95 : 10,4-15,2), *versus* une PFS médiane de **3,0** mois (IC95 : 2,3-3,5) et une OS médiane de **5,9** mois (IC95 : 4,0-7,8) pour les patients avec des taux faibles de MMP2 (Fig. 1). A noter que les taux d'uPA et de CXCL12 étaient respectivement corrélés avec l'OS et la PFS. Les autres facteurs pronostiques potentiels tels que l'âge, le KPS, le type histologique initial et le nombre de lignes antérieures à l'initiation du bevacizumab n'impactaient pas la survie dans cette cohorte.

Table 3. Univariate and multivariate analyses of PFS and OS of Cohort 1 according to median plasmatic biomarkers

Plasmatic Biomarkers	PFS			OS		
	Univariate	Multivariate		Univariate	Multivariate	
	P value	P value	Hazard Ratio	P value	P value	Hazard Ratio
VEGF	.255			.263		
VEGF evolution	.047	.033*	2.822 (1.088–7.321)	.028	.021*	3.170 (1.193–8.422)
VEGFR2	.789			.6		
VEGFR2 evolution	.191			.447		
PIGF	.195			.475		
bFGF	.841			.904		
FGF evolution	.692			.543		
SDF1	.046	.068*	2.267 (0.942–5.456)	.101		
SDF1 evolution	.951			.966		
uPA	.063			.016	.004*	4.289 (1.598–11.516)
uPA evolution	.612			.982		
PAI1	.408			.389		
PAI1 evolution	.627			.565		
MMP2	.004	.007*	3.925 (1.465–10.517)	.001	.005*	4.618 (1.577–13.527)
MMP2 evolution	.672			.621		
MMP7	.121			.259		
MMP7 evolution	.754			.493		
MMP9	.007	.016*	4.290 (1.306–14.084)	.015	.025*	3.487 (1.170–10.390)
MMP9 evolution	.303			.42		
AM	.429			.401		
AM evolution	.748			.763		
Age	.373		NS	.368	NS	
KPS	.949		NS	.600	NS	
IDH1 mutation	.488			.452		

Abbreviations: AM, adrenomedullin; NS, nonsignificant.

*Adjusted by age and KPS.

En analyse multivariée (ajustée sur l'âge et le KPS) (Table 3.), les taux plasmatiques de MMP2 et MMP9 restaient significativement liés à la PFS ($p=0,007$ et $p=0,016$ respectivement) et à l'OS ($p=0,005$ et $p=0,025$ respectivement).

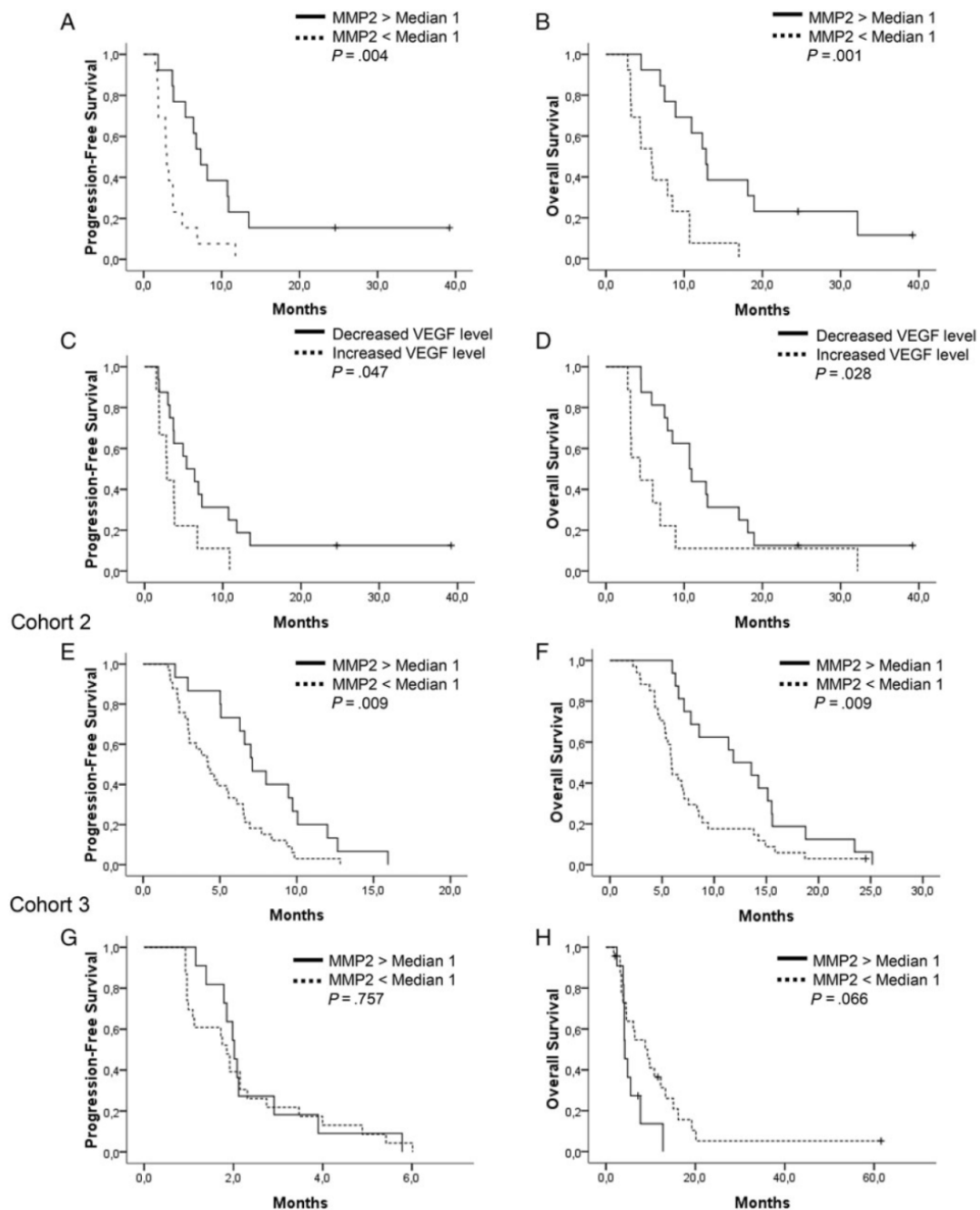


Fig. 1. Survival analyses. (A and B) PFS and OS of Cohort 1 according to plasmatic MMP2 level. (C and D) PFS and OS of Cohort 1 according to initial change of plasmatic VEGF level. (E and F) PFS and OS of Cohort 2 according to plasmatic MMP2 level, dichotomized by Cohort 1 MMP2 median. (G and H) PFS and OS of Cohort 3 according to plasmatic MMP2 level, dichotomized by Cohort 1 MMP2 median.

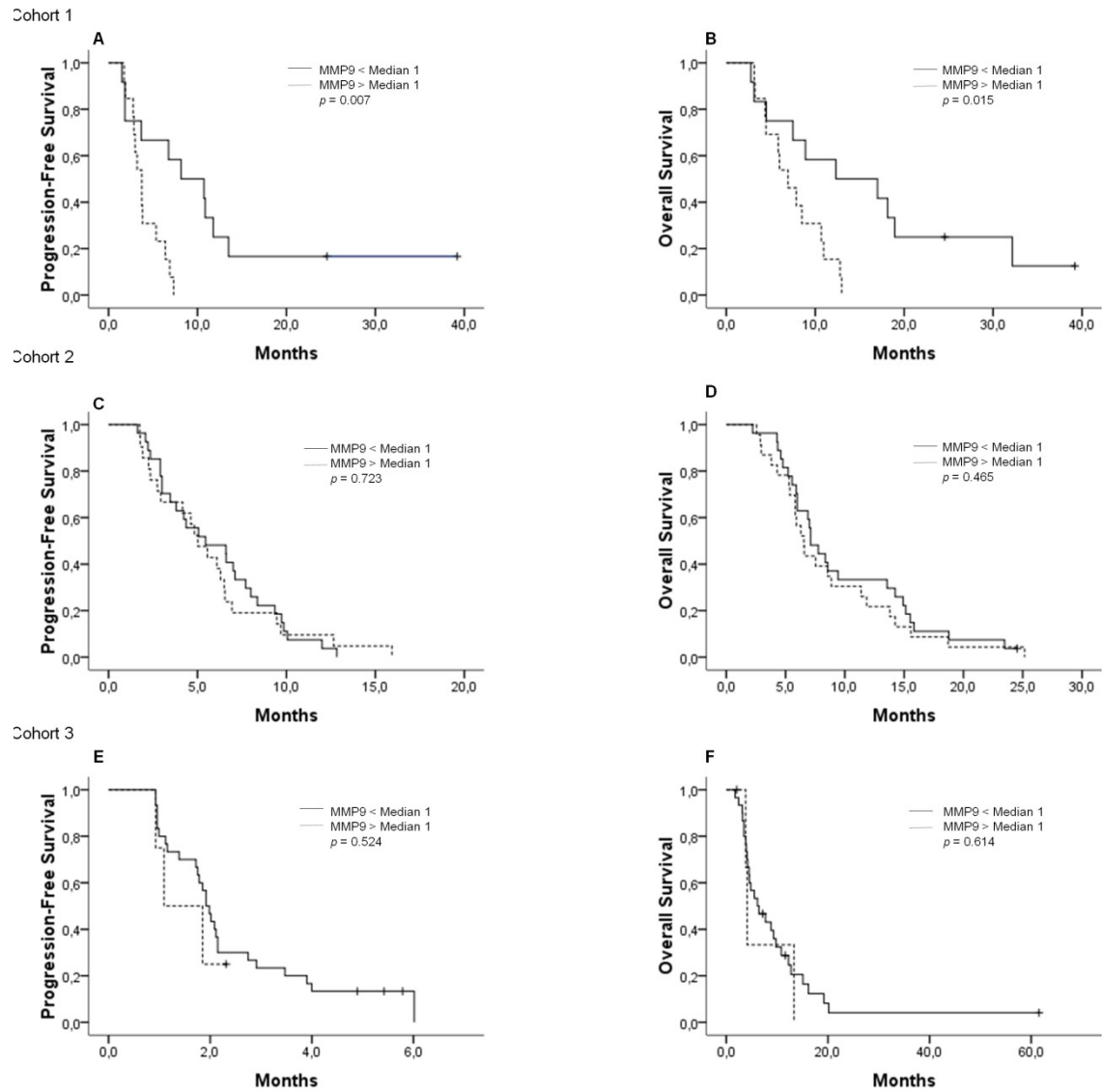


Figure 12 – PFS (A, C, E) et OS (B, D, F) des patients selon le taux plasmatique de MMP9 dans les trois cohortes (Cohorte 1 : A et B ; Cohorte 2 : C et D ; Cohorte 3 contrôle : E et F).

Les taux plasmatiques de MMP2 et MMP9 n'étaient pas corrélés à la dose de corticoïdes reçue (disponible pour 22/26 patients), à la taille tumorale (prise de contraste ou infiltrat T2/FLAIR : analysés pour 16/26 patients) (*Tableau 4*) ou à l'existence d'une mutation d'*IDH1* (analysable pour 16/26 patients) chez les patients pour lesquels ces éléments étaient disponibles.

	Data	Correlation to PFS	Correlation to OS	Correlation to MMP2	Correlation to MMP9
Median tumor size (range)*	1328,5 mm ² (100-3575)	0,345	0,290	0,315	0,619
Median flair size (range) *	3760 mm ² (1440-8450)	0,789	0,985	1,000	0,619
Number of structures ⁽¹⁾ affected by the FLAIR invasion*	3,5 (2-8)	0,970	0,112	0,545	1,000

(1) structures: cerebral lobes and/or diencephale and/or brainstem and/or cerebellum

* available for 16 patients

Tableau 4 – Evaluation de l'association entre les taux plasmatiques de MMP2 et MMP9 et la taille tumorale.

En revanche, **une corrélation inverse** a été observée entre les taux initiaux de MMP2 et MMP9 ($p=0,004$) et entre les variations de taux de MMP2 et MMP9 entre le dosage initial (J1) et celui à J15 ($p=0,037$).

L'analyse des cinétiques des biomarqueurs après l'administration de bevacizumab mettait en évidence une augmentation systématique du taux plasmatique de PlGF tandis que les autres marqueurs présentaient des variations hétérogènes (*Tableau 5*). En analyse univariée, le mode évolutif du taux plasmatique de VEGFA (augmentation *versus* diminution) était associé au devenir des patients en termes de PFS ($p=0,047$) et d'OS ($p=0,021$). En analyse multivariée, incluant l'âge et le KPS, les variations du taux plasmatique du VEGFA restaient significativement corrélées à la PFS ($p=0,033$) et à l'OS ($p=0,021$).

Markers	Median cohort 1	Cohort 1 biomarkers' evolution			
		Trend	Total	Median	Mean
VEGF	68.2	<i>Increasing</i>	10	13.2	14.3
	pg/ml	<i>Decreasing</i>	16	-147.1	-187.1
VEGFR2	8625.5	<i>Increasing</i>	18	874.3	1536.6
	pg/ml	<i>Decreasing</i>	8	-1353.3	-1456.9
PlGF	5.5	<i>Increasing</i>	26	9.1	9.3
	pg/ml	<i>Decreasing</i>	0	-	-
bFGF	6.8	<i>Increasing</i>	14	5	12.2
	pg/ml	<i>Decreasing</i>	12	-5.71	-9.5
SDF-1α	654.3	<i>Increasing</i>	17	162.7	208.4
	pg/ml	<i>Decreasing</i>	9	-100.7	-117.7
uPA	0.59	<i>Increasing</i>	17	0.06	0.14
	ng/ml	<i>Decreasing</i>	9	-0.23	-0.21
PAI1	630.4	<i>Increasing</i>	10	425.5	551
	ng/ml	<i>Decreasing</i>	16	-263	-285
MMP2	227.2	<i>Increasing</i>	15	56.6	80
	ng/ml	<i>Decreasing</i>	10	-80.5	-83.9
MMP7	0.31	<i>Increasing</i>	15	0.24	0.29
	ng/ml	<i>Decreasing</i>	11	-0.23	-0.28
MMP9	234.8	<i>Increasing</i>	6	46.2	126
	ng/ml	<i>Decreasing</i>	19	-176.8	-219.2
AM	27.1	<i>Increasing</i>	7	8.7	11.2
	pg/ml	<i>Decreasing</i>	9	-3.4	-6.2

Tableau 5 – Evolution des taux plasmatiques des protéines d'intérêt entre le J1 et le J15.

Cohorte 2

Dans cette population, moins sélectionnée, le taux de réponse était de 36,7%. Cependant, la PFS et l'OS médianes des patients répondeurs étaient similaires à celles des patients répondeurs de la première cohorte. Suite aux résultats de la première cohorte, seuls les dosages plasmatiques initiaux de MMP2 et MMP9 ont été étudiés dans cette seconde cohorte rétrospective et indépendante. Les seuils retenus pour MMP2 et MMP9 dans cette analyse étaient ceux définis dans la cohorte 1 (227,5 ng/ml et 235 ng/ml respectivement).

Dans cette cohorte, les valeurs médianes de MMP2 et MMP9 étaient respectivement de 185,2 ng/ml et 202,2 ng/ml. Seize patients (32%) présentaient un haut niveau plasmatique de MMP2 et 27 patients (54%) un niveau bas de MMP9. Le nombre plus faible de patients avec un haut niveau plasmatique de MMP2 était cohérent avec le taux plus faible de patients répondeurs dans cette cohorte.

Le taux plasmatique de MMP2 était corrélé aux réponses avec les mêmes amplitudes que dans la cohorte 1. En effet, 12 RO (80%) ont été observées chez les 15 patients avec un haut niveau de MMP2 analysable et 6 RO (17,6%) ont été observées chez les patients avec un taux bas de MMP2 (Table 2.). MMP2 restait significativement corrélé à la réponse en analyse continue. Un haut niveau plasmatique de MMP2 était respectivement associé à des PFS et OS médianes de 7,1 mois (IC95 : 5,3-8,9) et 11,8 mois (IC95 : 7,6-16,1), *versus* 4,2 mois (IC 95 : 2,9-5,5) et 5,9 mois (IC 95 : 5,4-5,9) pour les patients avec un niveau bas de MMP2 ($p=0,009$ pour la PFS et l'OS) (Fig. 1).

Lorsque l'on restreignait cette cohorte aux seuls patients porteurs de glioblastome (N=31), le niveau plasmatique de MMP2 restait significativement corrélé aux réponses ($p=0,004$), à la PFS (6,6 mois *versus* 3,8 mois pour haut *versus* bas niveau de MMP2 respectivement, $p=0,010$) et à l'OS (11,8 mois *versus* 5,8 mois, $p=0,003$).

En revanche, dans cette cohorte, aucune corrélation n'a été observée entre le taux plasmatique de MMP9, le taux de réponse, la PFS et l'OS (Figure 12).

Cohorte 3

Au moment de l'analyse, 4 patients étaient encore en vie dans cette cohorte. Le suivi médian était de 9,4 mois (de 2,1 à 61,6 mois). La PFS et l'OS médianes étaient respectivement de 1,9 mois (IC 95 : 1,7-2,3) et 6,1 mois (IC 95 : 2,6-9,7). Suite aux résultats des cohortes 1 et 2, seuls MMP2 et MMP9 ont été analysés. Les seuils retenus étaient ceux définis dans la cohorte 1. Le taux médian de MMP2 était de 178,5 ng/ml et 11 patients avaient un taux élevé de MMP2 (32,4% étaient $\geq 227,5$ ng/ml).

Aucune association n'a été observée entre les taux de MMP2 ou de MMP9 initiaux et la PFS. En revanche, à l'inverse des deux premières cohortes, dans cette cohorte 3 sans agent anti-angiogénique, un niveau bas de MMP2 tendait à être associé à une meilleure OS ($p=0,096$) tandis que les taux de MMP9 n'influençaient pas l'OS (Fig. 1 et Figure 12).

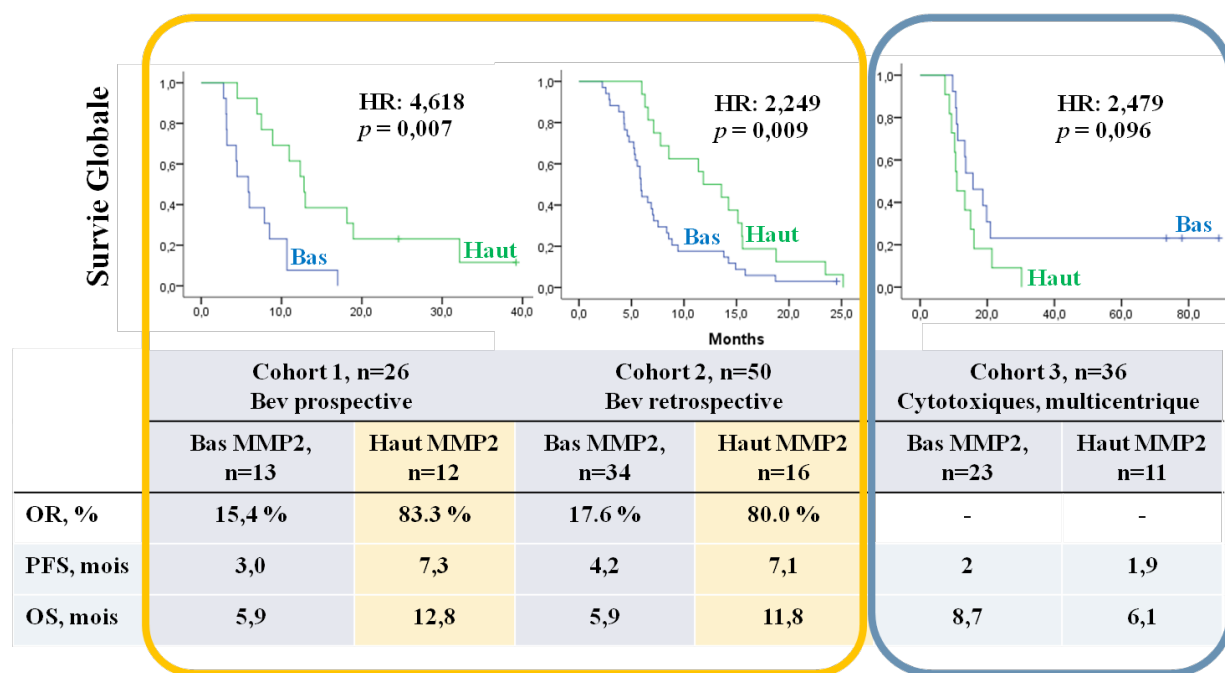


Figure 13 – Résumé de l'impact des taux plasmatiques de MMP2 sur la réponse, la survie sans progression et la survie globale des patients dans les trois cohortes.

Dans nos deux premières cohortes, nous avons pu mettre en évidence qu'un taux plasmatique élevé de MMP2 était associé à une augmentation des taux de réponse, de la PFS et de l'OS de nos patients porteurs de gliomes de haut grade traités à la récurrence par bevacizumab. Ces résultats étaient reproductibles dans chacune des deux cohortes indépendantes, l'une prospective, l'autre rétrospective. A l'inverse, nous n'avons pas observé cette corrélation dans la troisième cohorte de patients traités sans agent anti-angiogénique. A notre connaissance, cette étude est la première à évaluer le niveau plasmatique de MMP2 en tant que biomarqueur du bevacizumab.

Suite à l'augmentation de l'utilisation des anti-angiogéniques, à l'hétérogénéité du bénéfice observé et au coût de ces traitements ciblés, la découverte d'un biomarqueur prédictif de l'efficacité de ces thérapies semble indispensable (Duda et al., 2010). L'hypertension ainsi que certains polymorphismes du VEGFA ont été associés à l'activité du bevacizumab dans le cadre d'études limitées par le manque de standardisation des mesures et par des résultats inconsistants entre les différents critères de jugement (taux de réponse, PFS, OS) (Jubb and Harris, 2010). Certains biomarqueurs plasmatiques évalués à l'initiation du traitement, comme le VEGFA, le VEGFR1, le PlGF, le CXCL12 ainsi que le taux de cellules endothéliales circulantes ont été rapportés comme potentiellement corrélés au devenir des patients sous anti-angiogéniques. Néanmoins, leur valeur prédictive reste non reproductible d'une étude à l'autre et aucun de ces marqueurs n'a été associé à la fois au taux de réponse, à la PFS et à l'OS comme le taux plasmatique de MMP2 de notre étude. Par ailleurs, le VEGFC, le VEGFR3 soluble ou les changements de concentrations plasmatiques du VEGFA et des interleukines ont été associés au contrôle tumoral sans être associés à la survie des patients (Hanrahan et al., 2010; Rini et al., 2008).

Malgré l'absence d'essai contrôlé à la récurrence, le bevacizumab a été associé à un taux de réponse élevé chez des patients porteurs de gliome de haut grade récidivant, en comparaison aux résultats historiques (Friedman et al., 2009; Kreisl et al., 2009). De plus, ces réponses objectives observées sous bevacizumab semblaient corrélées à un bénéfice en survie (Prados et al., 2011). En effet, dans notre étude, bien que les caractéristiques des patients de la cohorte 1 prospective apparaissent comme plus favorables que celles de la cohorte 2 en termes de nombre de lignes préalablement reçues et de KPS, nous pouvons remarquer que la survie des patients présentant une réponse objective au bevacizumab était favorable et similaire dans les

deux cohortes 1 et 2, ce qui renforce la reproductibilité et la comparabilité de nos résultats entre ces deux cohortes. Tous les patients initialement diagnostiqués avec un gliome de grade II ou III ont reçu du bevacizumab après de nombreuses lignes de chimiothérapies (de 2 à 6) et seuls deux des cinq patients des grades II-III sont porteurs d'une mutation *IDH1* R132H. De plus, ces patients initialement grades II-III ont été traités par bevacizumab au moment où ils présentaient une progression radiologique avec des critères d'agressivité (prise de contraste importante et hétérogène) et présentent des survies superposables à celles observées pour les grades IV de notre étude. Ainsi, nous pensons que l'impact potentiel de l'hétérogénéité histologique initiale reste très modeste, ces patients étant probablement porteurs de glioblastome secondaire à l'initiation du traitement par bevacizumab. De plus, le taux plasmatique de MMP2 reste corrélé aux réponses, à la PFS et à l'OS lorsque l'analyse est restreinte aux patients présentant une histologie initiale homogène de glioblastome. Enfin, on peut noter que ni les taux plasmatiques de MMP2 ni de MMP9 ne sont corrélés aux caractéristiques des patients ou de la tumeur, comme la dose de corticoïdes, la taille de la prise de contraste ou de l'infiltration FLAIR et le statut IDH1, ce qui limite les biais potentiels de notre étude.

La majorité des patients bénéficiant d'un traitement par bevacizumab recevait également un traitement par irinotecan. La valeur prédictive de MMP2 est donc *stricto sensu* corrélée à l'association bevacizumab-irinotecan. Néanmoins, le rôle de l'irinotecan reste modeste dans le traitement des gliomes de haut grade, ce qui nous pousse à croire que le taux plasmatique de MMP2 ne prédit que l'activité du bevacizumab.

De potentiels marqueurs pouvant prédire l'activité du bevacizumab pour les patients porteurs de gliomes de haut grade ont déjà été analysés (Raizer et al., 2010; Sathornsumetee et al., 2008). Au niveau tissulaire, le VEGFA semblait corrélé à la réponse tandis que la carbonic anhydrase 9 (CA9) et le ratio VEGFA/VEGFR2 étaient associés à la survie. Les limites de l'analyse immunohistochimique d'une tumeur hétérogène, ainsi que les potentielles différences de profil biologique entre la tumeur initiale et la tumeur à la récurrence peuvent expliquer en partie les résultats inconsistants de ces études. Au vu de l'accès restreint à l'histologie, à la rechute notamment, un marqueur circulant apparaît comme très intéressant dans l'évaluation des thérapies de patients porteurs de tumeurs cérébrales. Un large panel de biomarqueurs plasmatiques (incluant MMP2) a été évalué à l'initiation d'un traitement par cediranib (un pan VEGFR inhibiteur) chez des patients porteurs de glioblastome récidivant. Néanmoins, aucun d'entre eux n'était corrélé à la survie (Batchelor et al., 2010). Cette absence d'impact pourrait être expliquée par les activités différentes de ces molécules ou par des mécanismes

d'action distincts. Par ailleurs, l'analyse protéomique du sérum de patients porteurs de carcinome rénal métastatique traités par sunitinib a mis en évidence une possible association entre un taux sérique élevé de MMP2, à l'initiation du traitement, et de meilleurs taux de réponse au sunitinib (Motzer et al., 2014).

Considérant les cinétiques précoces des marqueurs (évaluées entre l'initiation du traitement et le J15), nous avons observé qu'une diminution du taux plasmatique de VEGFA après la première injection de bevacizumab apparaissait être corrélée à une meilleure PFS et OS. L'analyse du taux circulant de VEGFA reste délicate suite à sa séquestration par le bevacizumab ainsi qu'à sa libération parallèle par l'activation plaquettaire observée chez les patients porteurs de pathologies cancéreuses (Niers et al., 2011). Une augmentation du taux circulant total de VEGFA après l'initiation du bevacizumab a été généralement observée chez certains patients, contrastant avec la diminution de la concentration du VEGFA libre circulant, les deux présentant une valeur prédictive très incertaine (Jubb and Harris, 2010). Des analyses détaillées du taux circulant du VEGFA total et libre devraient être réalisées chez les patients porteurs de glioblastome traités par bevacizumab. De façon similaire aux études précédemment rapportées, une augmentation du taux plasmatique de PlGF a été observée chez tous nos patients, tandis que les profils évolutifs des taux plasmatiques des autres marqueurs restaient très hétérogènes. Enfin, aucune de ces modifications ne semblait influencer la survie des patients, comme observé dans la majorité des études se rapportant au bevacizumab.

MMP2 appartient à la famille des Matrice Metalloprotéinases, impliquées dans la protéolyse de la matrice extracellulaire, régulant ainsi l'adhésion et la migration cellulaire. De plus, MMP2 favorise l'expression de facteurs de croissance et de cytokines ainsi que la libération de facteurs angiogéniques (Roy et al., 2009). L'expression des MMP (particulièrement de MMP2 et MMP9) dans le plasma, l'urine ou dans les tissus tumoraux a déjà été rapportée comme étant un potentiel biomarqueur associé à la dissémination et au pronostic de différents cancers. De plus, l'expression et l'activité de MMP2 et MMP9 dans les urines, le liquide céphalo-rachidien ou le plasma apparaît comme étant corrélé à l'expression tissulaire de ces marqueurs dans le cancer de la vessie et dans les tumeurs cérébrales (Papathoma et al., 2000; Smith et al., 2008). Par ailleurs, une forte expression de MMP2 et MMP9 a été associée à un phénotype tumoral agressif et à un pronostic péjoratif dans différents cancers, bien que l'impact pronostique dans les gliomes reste incertain (Brell et al., 2011; Colin et al., 2009; Jäälinojä et al., 2000). De façon surprenante, dans notre étude, un niveau initial élevé de MMP2 semble prédire le bénéfice du bevacizumab. Chez des patients porteurs de gliome de haut grade, l'utilisation du bevacizumab a été associée à une décroissance initiale de l'activité

urinaire des MMP2, suivi d'une augmentation à la progression dans les urines ou dans le tissu tumoral (de Groot et al., 2010; Takano et al., 2010), suggérant une possible implication de MMP2 dans l'échappement au bevacizumab sous forme infiltrative. Néanmoins, le niveau initial de MMP2 n'était pas analysé dans ces études et de nombreux autres candidats sont déjà impliqués dans le phénotype invasif associé à la progression des patients après traitement par bevacizumab (Lucio-Eterovic et al., 2009). De plus, une possible différence entre l'activité des MMP et leur expression peut expliquer ces résultats. MMP2 est impliqué dans l'angiogenèse en assurant la fonctionnalité vasculaire à travers la maturation des néo-vaisseaux et le recrutement des péricytes grâce à différents facteurs (Du et al., 2008; Tremblay et al., 2011). De façon intéressante, dans un modèle orthotopique de glioblastome chez la souris KO pour *MMP2*, les vaisseaux tumoraux semblent augmentés en nombre mais moins fonctionnels et présentent notamment une réduction de l'expression du VEGFR2 et une diminution du recouvrement et de l'activation des péricytes (Du et al., 2008). Une autre étude a récemment rapporté que les glioblastomes n'exprimant pas MMP2 présentaient une infiltration plus modérée de macrophages intra-tumoraux, une vascularisation plus déstabilisée et une croissance tumorale plus rapide (Tremblay et al., 2011). Ces différents résultats pré-cliniques suggèrent que MMP2 est directement impliqué et nécessaire à l'obtention d'une angiogenèse tumorale efficace en collaboration avec le VEGFR2. Ainsi, MMP2 participerait à la délivrance du bevacizumab sur le site tumoral, pourrait être corrélé à la présence de ses cibles thérapeutiques et être impliqué dans l'activité anti-tumorale du bevacizumab.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons identifié MMP2 comme un candidat attractif pour prédire l'activité du bevacizumab chez des patients porteurs de gliomes de haut grade. Ces résultats restent à confirmer dans le cadre d'un essai prospectif, multicentrique et randomisé. Ainsi, les taux plasmatiques de MMP2 et MMP9 vont être évalués dans le cadre d'une analyse ancillaire de l'essai de phase III AVAglio, évaluant l'apport du bevacizumab en première ligne thérapeutique chez des patients porteurs de glioblastome au diagnostic, en association au traitement de première ligne par radio-chimiothérapie.

Par ailleurs, l'impact prédictif de ces marqueurs pourrait être exploré dans d'autres types tumoraux bénéficiant de traitement anti-angiogéniques. A l'heure actuelle, ces marqueurs sont en cours d'évaluation dans trois autres pathologies :

- Dans les cancers du sein inflammatoires, ces marqueurs sont analysés dans le cadre d'un essai de phase II (Beverly2) évaluant l'apport du bevacizumab chez des patientes en situation néo-adjuvante.
- Dans les cancers du rein, le dosage de ces molécules est en cours de réalisation chez des patients métastatiques bénéficiant d'un traitement par sunitinib (Obtention de la bourse PRIME de Novartis le 5 décembre 2014).
- Dans les cancers de l'ovaire, le dosage de ces marqueurs va être réalisé en collaboration avec le centre de lutte contre le cancer Val d'Aurel (Montpellier).

La possibilité d'une modification du profil de vascularisation entre le diagnostic initial et la récurrence, notamment après radiothérapie, doit également être évaluée dans ce contexte. A l'heure actuelle, nous n'avons pas observé de modification du niveau d'expression ARN ou plasmatique de MMP2 et MMP9 entre le diagnostic initial et la première récurrence chez des patients porteurs de glioblastome. Néanmoins, ces protéines étant impliquées dans des phénomènes inflammatoires, le profil évolutif de leur expression doit être évalué, et ce, dans différentes pathologies.

Enfin, l'impact positif d'un haut niveau plasmatique de MMP2 sur la survie de patients traités par bevacizumab nécessite la ré-exploration du rôle biologique de MMP2, de son implication dans la néo-angiogenèse et de ses interactions avec les voies du VEGFA. Notre hypothèse actuelle est qu'un taux circulant élevé de MMP2 pourrait être le reflet de la dépendance tumorale au processus angiogénique classique et à la voie du VEGFA-VEGFR2,

permettant d'identifier de bons candidats aux traitements anti-angiogéniques, tandis qu'un taux circulant élevé de MMP9 pourrait être associé à un phénomène de vascularisation différent et partiellement indépendant de la voie VEGFA-VEGFR2, suggérant l'utilisation d'approches thérapeutiques alternatives. Cette hypothèse reste à confirmer.

Soutiens

Cette étude a été soutenue par l'association de patients l'ARTCsud et s'inclut dans le SIRIC gliome (SIRIC Grant : INCa-DGOS-Inserm 6038)

Dépôt de brevet

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un dépôt de brevet n° 12305565.9 le 23 Mai 2012

Présentations

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une présentation orale (Late Breacking Abstract) au congrès de l'ESMO 2012, le 1^{er} octobre 2012 :

LBA16 - Association of matrix metalloproteinase 2 (MMP2) plasma level with response and survival in patients treated with bevacizumab for recurrent high grade glioma

E. Tabouret, [F. Boudouresque](#), [M. Barrié](#), [M. Matta](#), [C. Boucard](#), [a. Loundou](#), [M. Ouafik](#), [O. Chinot](#)

Session: [CNS tumors](#)

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une présentation en Poster Discussion au congrès de l'ASCO 2013 :

Association of matrix metalloproteinase 2 (MMP2) baseline plasma level to objective response (OR), progression free survival (PFS), and overall survival (OS) and changes under treatment in patients treated with bevacizumab (Bev) for recurrent high-grade glioma (HGG).

Subcategory: [CNS Tumors](#)

Category: Central Nervous System Tumors

Meeting: [2013 ASCO Annual Meeting](#)

Session Type and Session Title: Poster Discussion Session, Central Nervous System Tumors

Abstract Number: 2024

Citation: J Clin Oncol 31, 2013 (suppl; abstr 2024)

Author(s): Emeline Tabouret, Francoise Boudouresque, Jaime Callego Perez-Larraya, Maryline Barrie, Giuseppe Lombardi, Mona Matta, Anna Luisa Di Stefano, Marianne Labussiere, Celine Boucard, Anderson Loundou, Sylvie Romain, Antoine F Carpentier, Marc Sanson, L'houcine Ouafik, Oliver L. Chinot

REFERENCES

- Ahn, G.-O., and Brown, J.M. (2008). Matrix metalloproteinase-9 is required for tumor vasculogenesis but not for angiogenesis: role of bone marrow-derived myelomonocytic cells. *Cancer Cell* 13, 193–205.
- Batchelor, T.T., Sorensen, A.G., di Tomaso, E., Zhang, W.-T., Duda, D.G., Cohen, K.S., Kozak, K.R., Cahill, D.P., Chen, P.-J., Zhu, M., et al. (2007). AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell* 11, 83–95.
- Batchelor, T.T., Duda, D.G., di Tomaso, E., Ancukiewicz, M., Plotkin, S.R., Gerstner, E., Eichler, A.F., Drappatz, J., Hochberg, F.H., Benner, T., et al. (2010). Phase II study of cediranib, an oral pan-vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 2817–2823.
- Bauvois, B. (2012). New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim. Biophys. Acta* 1825, 29–36.
- Bondy, M.L., Scheurer, M.E., Malmer, B., Barnholtz-Sloan, J.S., Davis, F.G., Il'yasova, D., Kruchko, C., McCarthy, B.J., Rajaraman, P., Schwartzbaum, J.A., et al. (2008). Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer* 113, 1953–1968.
- Brell, M., Ibáñez, J., Felpete, A., Burguera, B., Frontera, M., and Couce, M.E. (2011). Quantitative analysis of matrix metalloproteinase-2 mRNA expression in central and peripheral regions of gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 28, 137–144.
- Brennan, C.W., Verhaak, R.G.W., McKenna, A., Campos, B., Nounshmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., et al. (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155, 462–477.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., et al. (1998). Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394, 485–490.
- Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., Vincenti, V., Compernelle, V., De Mol, M., Wu, Y., Bono, F., Devy, L., Beck, H., et al. (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat. Med.* 7, 575–583.
- Chetty, C., Lakka, S.S., Bhoopathi, P., Kunigal, S., Geiss, R., and Rao, J.S. (2008). Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 suppresses tumor angiogenesis in matrix metalloproteinase 2-down-regulated lung cancer. *Cancer Res.* 68, 4736–4745.

- Chetty, C., Lakka, S.S., Bhoopathi, P., and Rao, J.S. (2010). MMP-2 alters VEGF expression via α 5 β 3 integrin-mediated PI3K/AKT signaling in A549 lung cancer cells. *Int. J. Cancer* *127*, 1081–1095.
- Chinot, O.L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A.F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., et al. (2014). Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* *370*, 709–722.
- Colin, C., Voutsinos-Porche, B., Nanni, I., Fina, F., Metellus, P., Intagliata, D., Baeza, N., Bouvier, C., Delfino, C., Loundou, A., et al. (2009). High expression of cathepsin B and plasminogen activator inhibitor type-1 are strong predictors of survival in glioblastomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *118*, 745–754.
- Du, R., Petritsch, C., Lu, K., Liu, P., Haller, A., Ganss, R., Song, H., Vandenberg, S., and Bergers, G. (2008). Matrix metalloproteinase-2 regulates vascular patterning and growth affecting tumor cell survival and invasion in GBM. *Neuro-Oncol.* *10*, 254–264.
- Duda, D.G., Ancukiewicz, M., and Jain, R.K. (2010). Biomarkers of antiangiogenic therapy: how do we move from candidate biomarkers to valid biomarkers? *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 183–185.
- Fernandez-Sauze, S., Delfino, C., Mabrouk, K., Dussert, C., Chinot, O., Martin, P.-M., Grisoli, F., Ouafik, L., and Boudouresque, F. (2004). Effects of adrenomedullin on endothelial cells in the multistep process of angiogenesis: involvement of CRLR/RAMP2 and CRLR/RAMP3 receptors. *Int. J. Cancer* *108*, 797–804.
- Ferrara, N., Gerber, H.-P., and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* *9*, 669–676.
- Figarella-Branger, D., Chappe, C., Padovani, L., Mercurio, S., Colin, C., Forest, F., and Bouvier, C. (2013). [Glial and glioneuronal tumors in adults and children: main genetic alterations and towards a histomolecular classification]. *Bull. Cancer (Paris)* *100*, 715–726.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* *285*, 1182–1186.
- Friedman, H.S., Petros, W.P., Friedman, A.H., Schaaf, L.J., Kerby, T., Lawyer, J., Parry, M., Houghton, P.J., Lovell, S., Rasheed, K., et al. (1999). Irinotecan therapy in adults with recurrent or progressive malignant glioma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *17*, 1516–1525.
- Friedman, H.S., Prados, M.D., Wen, P.Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L.E., Yung, W.K.A., Paleologos, N., Nicholas, M.K., Jensen, R., et al. (2009). Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *27*, 4733–4740.
- Gállego Pérez-Larraya, J., Ducray, F., Chinot, O., Catry-Thomas, I., Taillandier, L., Guillamo, J.-S., Campello, C., Monjour, A., Cartalat-Carel, S., Barrie, M., et al. (2011). Temozolomide in elderly patients with newly diagnosed glioblastoma and poor performance status: an ANOCEF phase II trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 3050–3055.
- Gilbert, M.R., Dignam, J.J., Armstrong, T.S., Wefel, J.S., Blumenthal, D.T., Vogelbaum, M.A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., et al. (2014). A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* *370*, 699–708.

De Groot, J.F., Fuller, G., Kumar, A.J., Piao, Y., Eterovic, K., Ji, Y., and Conrad, C.A. (2010). Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and mice. *Neuro-Oncol.* 12, 233–242.

Hanrahan, E.O., Lin, H.Y., Kim, E.S., Yan, S., Du, D.Z., McKee, K.S., Tran, H.T., Lee, J.J., Ryan, A.J., Langmuir, P., et al. (2010). Distinct patterns of cytokine and angiogenic factor modulation and markers of benefit for vandetanib and/or chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 193–201.

Hegi, M.E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., et al. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 997–1003.

Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., et al. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 350, 2335–2342.

Jäälinöjä, J., Herva, R., Korpela, M., Höyhty, M., and Turpeenniemi-Hujanen, T. (2000). Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) immunoreactive protein is associated with poor grade and survival in brain neoplasms. *J. Neurooncol.* 46, 81–90.

Jeremic, B., Grujicic, D., Jevremovic, S., Stanisavljevic, B., Milojevic, L., Djuric, L., and Mijatovic, L. (1992). Carboplatin and etoposide chemotherapy regimen for recurrent malignant glioma: a phase II study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 10, 1074–1077.

Jubb, A.M., and Harris, A.L. (2010). Biomarkers to predict the clinical efficacy of bevacizumab in cancer. *Lancet Oncol.* 11, 1172–1183.

Kaafarani, I., Fernandez-Sauze, S., Berenguer, C., Chinot, O., Delfino, C., Dussert, C., Metellus, P., Boudouresque, F., Mabrouk, K., Grisoli, F., et al. (2009). Targeting adrenomedullin receptors with systemic delivery of neutralizing antibodies inhibits tumor angiogenesis and suppresses growth of human tumor xenografts in mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 3424–3435.

Keime-Guibert, F., Chinot, O., Taillandier, L., Cartalat-Carel, S., Frenay, M., Kantor, G., Guillamo, J.-S., Jadaud, E., Colin, P., Bondiau, P.-Y., et al. (2007). Radiotherapy for glioblastoma in the elderly. *N. Engl. J. Med.* 356, 1527–1535.

Kreisl, T.N., Kim, L., Moore, K., Duic, P., Royce, C., Stroud, I., Garren, N., Mackey, M., Butman, J.A., Camphausen, K., et al. (2009). Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 740–745.

Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., and Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306–1309.

Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 114, 97–109.

- Lucio-Eterovic, A.K., Piao, Y., and de Groot, J.F. (2009). Mediators of glioblastoma resistance and invasion during antivascular endothelial growth factor therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 4589–4599.
- Miller, K., Wang, M., Gralow, J., Dickler, M., Cobleigh, M., Perez, E.A., Shenkier, T., Cella, D., and Davidson, N.E. (2007). Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* *357*, 2666–2676.
- Montuori, N., and Ragno, P. (2014). Role of uPA/uPAR in the modulation of angiogenesis. *Chem. Immunol. Allergy* *99*, 105–122.
- Motzer, R.J., Hutson, T.E., Hudes, G.R., Figlin, R.A., Martini, J.-F., English, P.A., Huang, X., Valota, O., and Williams, J.A. (2014). Investigation of novel circulating proteins, germ line single-nucleotide polymorphisms, and molecular tumor markers as potential efficacy biomarkers of first-line sunitinib therapy for advanced renal cell carcinoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *74*, 739–750.
- Newton, H.B., Junck, L., Bromberg, J., Page, M.A., and Greenberg, H.S. (1990). Procarbazine chemotherapy in the treatment of recurrent malignant astrocytomas after radiation and nitrosourea failure. *Neurology* *40*, 1743–1746.
- Niers, T.M.H., Richel, D.J., Meijers, J.C.M., and Schlingemann, R.O. (2011). Vascular endothelial growth factor in the circulation in cancer patients may not be a relevant biomarker. *PloS One* *6*, e19873.
- Noushmehr, H., Weisenberger, D.J., Diefes, K., Phillips, H.S., Pujara, K., Berman, B.P., Pan, F., Pelloski, C.E., Sulman, E.P., Bhat, K.P., et al. (2010). Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* *17*, 510–522.
- Papathoma, A.S., Petraki, C., Grigorakis, A., Papakonstantinou, H., Karavana, V., Stefanakis, S., Sotsiou, F., and Pintzas, A. (2000). Prognostic significance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in bladder cancer. *Anticancer Res.* *20*, 2009–2013.
- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.-M., Gallia, G.L., et al. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* *321*, 1807–1812.
- Perren, T.J., Swart, A.M., Pfisterer, J., Ledermann, J.A., Pujade-Lauraine, E., Kristensen, G., Carey, M.S., Beale, P., Cervantes, A., Kurzeder, C., et al. (2011). A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* *365*, 2484–2496.
- Phillips, H.S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W.F., Soriano, R.H., Wu, T.D., Misra, A., Nigro, J.M., Colman, H., Soroceanu, L., et al. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* *9*, 157–173.
- Prados, M., Cloughesy, T., Samant, M., Fang, L., Wen, P.Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L.E., Yung, W.K.A., Paleologos, N., et al. (2011). Response as a predictor of survival in patients with recurrent glioblastoma treated with bevacizumab. *Neuro-Oncol.* *13*, 143–151.
- Quillien, V., Lavenu, A., Karayan-Tapon, L., Carpentier, C., Labussière, M., Lesimple, T., Chinot, O., Wager, M., Honnorat, J., Saikali, S., et al. (2012). Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-

methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients. *Cancer* 118, 4201–4211.

Raizer, J.J., Grimm, S., Chamberlain, M.C., Nicholas, M.K., Chandler, J.P., Muro, K., Dubner, S., Rademaker, A.W., Renfrow, J., and Bredel, M. (2010). A phase 2 trial of single-agent bevacizumab given in an every-3-week schedule for patients with recurrent high-grade gliomas. *Cancer* 116, 5297–5305.

Reithmeier, T., Graf, E., Piroth, T., Trippel, M., Pinsker, M.O., and Nikkhah, G. (2010). BCNU for recurrent glioblastoma multiforme: efficacy, toxicity and prognostic factors. *BMC Cancer* 10, 30.

Rini, B.I., Michaelson, M.D., Rosenberg, J.E., Bukowski, R.M., Sosman, J.A., Stadler, W.M., Hutson, T.E., Margolin, K., Harmon, C.S., DePrimo, S.E., et al. (2008). Antitumor activity and biomarker analysis of sunitinib in patients with bevacizumab-refractory metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 3743–3748.

Roy, R., Yang, J., and Moses, M.A. (2009). Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 5287–5297.

Sandler, A., Gray, R., Perry, M.C., Brahmer, J., Schiller, J.H., Dowlati, A., Lilienbaum, R., and Johnson, D.H. (2006). Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 355, 2542–2550.

Sanson, M., Marie, Y., Paris, S., Idbaih, A., Laffaire, J., Ducray, F., El Hallani, S., Boisselier, B., Mokhtari, K., Hoang-Xuan, K., et al. (2009). Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 4150–4154.

Sathornsumetee, S., Cao, Y., Marcello, J.E., Herndon, J.E., McLendon, R.E., Desjardins, A., Friedman, H.S., Dewhirst, M.W., Vredenburgh, J.J., and Rich, J.N. (2008). Tumor angiogenic and hypoxic profiles predict radiographic response and survival in malignant astrocytoma patients treated with bevacizumab and irinotecan. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 271–278.

Smith, E.R., Zurakowski, D., Saad, A., Scott, R.M., and Moses, M.A. (2008). Urinary biomarkers predict brain tumor presence and response to therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 2378–2386.

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996.

Takano, S., Mashiko, R., Osuka, S., Ishikawa, E., Ohneda, O., and Matsumura, A. (2010). Detection of failure of bevacizumab treatment for malignant glioma based on urinary matrix metalloproteinase activity. *Brain Tumor Pathol.* 27, 89–94.

Tremblay, P., Beaudet, M.-J., Tremblay, E., Rueda, N., Thomas, T., and Vallières, L. (2011). Matrix metalloproteinase 2 attenuates brain tumour growth, while promoting macrophage recruitment and vascular repair. *J. Pathol.* 224, 222–233.

Turcan, S., Rohle, D., Goenka, A., Walsh, L.A., Fang, F., Yilmaz, E., Campos, C., Fabius, A.W.M., Lu, C., Ward, P.S., et al. (2012). IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylation phenotype. *Nature* 483, 479–483.

Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., et al. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98–110.

Wen, P.Y., Macdonald, D.R., Reardon, D.A., Cloughesy, T.F., Sorensen, A.G., Galanis, E., Degroot, J., Wick, W., Gilbert, M.R., Lassman, A.B., et al. (2010). Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 1963–1972.

Wick, W., Puduvalli, V.K., Chamberlain, M.C., van den Bent, M.J., Carpentier, A.F., Cher, L.M., Mason, W., Weller, M., Hong, S., Musib, L., et al. (2010). Phase III study of enzastaurin compared with lomustine in the treatment of recurrent intracranial glioblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 1168–1174.

Wick, W., Platten, M., Meisner, C., Felsberg, J., Tabatabai, G., Simon, M., Nikkhah, G., Papsdorf, K., Steinbach, J.P., Sabel, M., et al. (2012). Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 13, 707–715.

Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., et al. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N. Engl. J. Med.* 360, 765–773.

Yang, J.C., Haworth, L., Sherry, R.M., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Steinberg, S.M., Chen, H.X., and Rosenberg, S.A. (2003). A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N. Engl. J. Med.* 349, 427–434.

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.