



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY 1**

**2009**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**LES ANTICORPS MONOCLONAUX, DE LA PRODUCTION A  
L'UTILISATION EN ONCOLOGIE**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement

Le 23 octobre 2009

Pour obtenir

**Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par **Aline SCHINDELE**

née le 23 Novembre 1979 à Remiremont (88)

**Membres du Jury**

Présidente : Mme Chantal FINANCE, Professeur

Juges : M. Jean Louis MERLIN, Professeur, Centre Alexis Vautrin  
Mme Karen AFENJAR, Senior Study Manager, Cancer International Group

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

## **SERMENT DES APOTHICAIRES**



**Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :**

**De honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.**

**De exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.**

**Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.**



## ***Remerciements***

*A Madame le Professeur Chantal FINANCE,*

pour me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect

*A Monsieur le Professeur Jean-Louis MERLIN,*

pour me faire l'honneur de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail et votre participation à ce jury

*A Madame Karen AFENJAR, Senior Study Manager au Cancer International Research Group,*

pour me faire l'honneur d'accepter de participer à ce jury, de ta disponibilité, tes conseils et ton soutien

*A ma famille et mes amis,*

je vous remercie pour vos encouragements constants.

<b>Liste des figures.....</b>	<b>8</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>10</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>12</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>14</b>
<b>1. Historique de l'utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux.....</b>	<b>18</b>
<b>2. Evolutions technologiques des anticorps.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Production d'anticorps monoclonaux de première génération : les anticorps murins.....</b>	<b>20</b>
2.1.1. Immunisation .....	21
2.1.2. Fusion .....	23
2.1.3. Sélection des cellules hybrides.....	25
2.1.4. Screening des cellules productrices d'anticorps.....	25
2.1.5. Clonages des hybridomes sécréteurs .....	25
2.1.6. Production de masse des anticorps monoclonaux.....	28
2.1.7. Purification et conservation des anticorps monoclonaux.....	30
<b>2.2. Production des anticorps de seconde génération .....</b>	<b>32</b>
2.2.1. Structure et diversité des anticorps .....	32
2.2.2. Des anticorps chimériques aux anticorps humanisés.....	33
2.2.3. Les anticorps humains.....	35
2.2.4. Clonage des anticorps sous forme de fragments fonctionnels .....	39
2.2.5. Les anticorps couplés.....	41
<b>3. Propriétés pharmacocinétiques des anticorps monoclonaux ...</b>	<b>46</b>
3.1. Administration .....	46
3.2. Distribution .....	46
3.3. Elimination .....	47
3.4. Paramètres pharmacocinétiques .....	48
3.5. Pharmacodynamie.....	48

3.6. Variabilité cinétique.....	48
3.7. Conséquences de la variabilité cinétique .....	49
<b>4. Utilisation des anticorps monoclonaux dans le traitement des tumeurs solides .....</b>	<b>51</b>
4.1. La pathologie : le cancer.....	51
4.1.1. Mécanismes génétiques de la carcinogenèse .....	52
4.1.2. Facteurs de croissance cellulaire.....	54
4.1.3. Facteurs d'apoptose et de dissémination.....	54
4.1.4. Les étapes de la carcinogenèse .....	54
4.2. Mécanismes d'action généraux des anticorps monoclonaux en thérapeutique.....	56
4.3. Anticorps monoclonaux non conjugués .....	57
4.3.1. Cible : les récepteurs à tyrosine kinase.....	57
4.3.2. Cible : l'angiogenèse.....	94
4.3.3. Cible : l'apoptose.....	107
4.4. Anticorps monoclonaux conjugués.....	109
4.4.1. Anticorps monoclonaux vecteurs de médicaments ou de toxines .....	109
4.4.2. Anticorps radiomarqués .....	112
<b>5. Anticorps utilisés pour le traitement d'hémopathies malignes</b>	<b>114</b>
5.1. Cible : antigène CD20.....	114
5.1.1. Anticorps monoclonal « nu » : rituximab – MabThera®.....	114
5.1.2. Anticorps monoclonaux conjugués : radio-immunothérapie.....	121
5.2. Cible : antigène CD52 : alemtuzumab – MabCampath®.....	128
5.2.1. Antigène CD52 .....	128
5.2.2. Famille des anticorps Campath .....	129
5.2.3. Description et mécanisme d'action d'alemtuzumab .....	129
5.2.4. Etudes cliniques .....	129
5.2.5. Indication thérapeutique .....	133
5.3. Cible : antigène CD33 couplé à la calichéamicine : ozogamicine de gemtuzumab – Mylotarg®.....	134
5.3.1. Description et mécanisme d'action d'ozogamicine de gemtuzumab.....	134

5.3.2. Etudes cliniques .....	134
5.3.3. Indication thérapeutique .....	136
<b>5.4. Cible : antigène CD22.....</b>	<b>136</b>
5.4.1. Anti-CD22 « nu » : epratuzumab .....	136
5.4.2. Anticorps monoclonal radiomarqué : <sup>90</sup> Y epratuzumab.....	137
5.4.3. Anticorps couplé à un cytotoxique : inotuzumab ozogamicine (CMC 544).....	138
<b>5.5. Effets secondaires des traitements par anticorps monoclonaux en hématologie .....</b>	<b>138</b>
5.5.1. Les effets secondaires immédiats à court terme .....	138
5.5.2. Les effets secondaires à moyen et long terme.....	139
<b>6. Economie des anticorps monoclonaux .....</b>	<b>142</b>
6.1. Exemple de trastuzumab .....	143
6.2. Exemple de rituximab .....	149
<b>7. Voies de recherche.....</b>	<b>150</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>152</b>



## Liste des figures

- Figure n°1 : « boulet magique » de Paul Ehrlich (1906)
- Figure n°2 : production d'anticorps monoclonaux selon la technique des hybridomes de G. Kohler et C. Milstein (Bellet, 2002)
- Figure n°3 : clonage par cytométrie de flux, technique de Secretion Capture Report Web (SCRW) (Kenney *et al.*, 1995)
- Figure n°4 : technique de la cytométrie de flux
- Figure n°5 : procédé Celli-gen Plus (Emery *et al.*, 1998)
- Figure n°6 : structure schématique d'une molécule d'anticorps
- Figure n°7 : structure schématique d'un anticorps monoclonal murin, chimérique et humanisé
- Figure n°8 : technique de sélection du phage display
- Figure n°9 : fragments monovalents et bivalents d'anticorps (Pelegriin A *et al.*, 2000)
- Figure n°10 : anticorps bispécifique
- Figure n°11 : la famille des récepteurs HER
- Figure n°12 : mécanisme d'action de l'activité tyrosine kinase
- Figure n°13 : positivité de HER2 par immunohistochimie
- Figure n°14 : schéma de l'étude H0648g, chimiothérapie seule ou associée à trastuzumab
- Figure n°15 : schéma de l'étude M77001, docetaxel seul ou associé à trastuzumab
- Figure n°16 : principaux mécanismes de résistance au trastuzumab
- Figure n°17 : voie de signalisation de PI3 kinase / PTEN / AKT
- Figure n°18 : dimérisation d'HER1/EGFR
- Figure n°19 : HER1/EGFR et l'angiogénèse
- Figure n°20 : HER1/EGFR et l'inhibition de l'apoptose
- Figure n°21 : schéma de l'étude EMR 62 202-007, cétuximab en monothérapie versus cétuximab associé à irinotecan
- Figure n°22 : résultats de l'étude CRYSTAL en fonction du statut KRAS
- Figure n°23 : mécanisme d'action de pertuzumab
- Figure n°24 : initiation de l'angiogénèse
- Figure n°25 : réponse angiogénique observée dans une cornée de souris après implantation d'un fragment de tumeur à 1 mm environ des vaisseaux du limbus
- Figure n°26 : facteur de croissance endothéliale vasculaire, VEGF
- Figure n°27 : rôle de VEGF
- Figure n°28 : angiogénèse et croissance tumorale
- Figure n°29 : vascularisation normale et tumorale
- Figure n°30 : inhibition de VEGF

- Figure n°31 : régression de la nouvelle vascularisation
- Figure n°32 : vascularisation inadéquate
- Figure n°33 : schéma de l'étude AF2107g
- Figure n°34 : survie globale, étude AVF2107g
- Figure n°35 : survie sans progression, étude AVF2107g
- Figure n°36 : schéma de l'étude E4599
- Figure n°37 : voie extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose
- Figure n°38 : mécanisme d'action de l'apomab
- Figure n°39 : mécanisme d'action de Trastuzumb-DM1
- Figure n°40 : ibritumomab tiuxetan
- Figure n°41 : anticorps monoclonal cible l'antigène CD20 / l'anticorps endommage la cible et les cellules voisines
- Figure n°42 : schéma thérapeutique de Zevalin
- Figure n°43 : schéma de l'étude comparative ibritumomab tiuxetan / rituximab
- Figure n°44 : description de tositumomab
- Figure n°45 : survie sans progression d'alemtuzumab vs chlorambucile en première ligne
- Figure n°46 : les anticorps monoclonaux, un marché en forte croissance

## Liste des tableaux

- Tableau I : obstacles à l'efficacité des anticorps monoclonaux de première génération dans le traitement des cancers (Bellet et *al.*, 2003)
- Tableau II : les événements successifs de la carcinogénèse
- Tableau III : grille d'évaluation d'intensité de la coloration par immunohistochimie
- Tableau IV : caractéristiques des patientes, étude H0649g
- Tableau V : données d'efficacité clinique de trastuzumab en monothérapie chez les patientes HER2 3+, étude H0649g
- Tableau VI : caractéristiques des patientes, étude H0648g
- Tableau VII : données d'efficacité clinique en association à paclitaxel, étude H0648g
- Tableau VIII : caractéristiques des patientes, étude M77001
- Tableau IX : données d'efficacité clinique en association à docetaxel, étude M77001
- Tableau X : données d'efficacité clinique en adjuvant, étude HERA
- Tableau XI : résultats cliniques irinotecan plus cetuximab, étude EMR 62 202-007
- Tableau XII : résultats cliniques, étude EMR 62 202-013
- Tableau XIII : résultats cliniques, étude EMR 62 202-047
- Tableau XIV : données d'efficacité clinique, étude EMR 62 202-206
- Tableau XV : données d'efficacité clinique, étude EMR 62 202-002
- Tableau XVI : études de phases II, cetuximab en association avec d'autres chimiothérapies
- Tableau XVII : corrélation entre efficacité et réactions cutanées, étude EMR 62 202-007
- Tableau XVIII : développement d'anticorps monoclonaux ciblant EGFR
- Tableau XIX : anticorps monoclonaux ciblant l'IGF-1R en développement clinique
- Tableau XX : analyse de l'efficacité, étude AVF2107g
- Tableau XXI : résultats d'efficacité de l'étude E3200
- Tableau XXII : résultats cliniques de l'étude bevacizumab / paclitaxel versus paclitaxel seul
- Tableau XXIII : résultats cliniques de l'étude BO17705
- Tableau XXIV : caractéristique des patientes, T-DM1 en monothérapie
- Tableau XXV : données d'efficacité, T-DM1 en monothérapie
- Tableau XXVI : résumé des données d'efficacité de rituximab en monothérapie
- Tableau XXVII : données d'efficacité de rituximab en association
- Tableau XXVIII : phase d'induction : résumé des résultats d'efficacité de CHOP vs R-CHOP
- Tableau XXIX : phase d'entretien : résumé des résultats d'efficacité de rituximab vs observation
- Tableau XXX : résumé des résultats d'efficacité de rituximab + FC vs FC seul
- Tableau XXXI : réponses cliniques des études avec ibritumomab tiuxetan
- Tableau XXXII : résultats cliniques, tositumomab

Tableau XXXIII : résultats cliniques, tositumomab chez des patients réfractaires à rituximab

Tableau XXXIV : résultats cliniques, tositumomab

Tableau XXXV : résumé des réponses de l'étude CAM211

Tableau XXXVI : médianes de temps de réponse de l'étude CAM211

Tableau XXXVII : résultats de l'étude alemtuzumab vs chlorambucile en première ligne

Tableau XXXVIII : pourcentage de réponses selon la catégorie des rémissions et le groupe pronostic

Tableau XXIX : résumé de la survie sans progression pour les patients avec une réponse complète et une réponse complète partielle

Tableau XL : résultats selon la dose cumulée de <sup>90</sup>Y-epratuzumab

Tableau XLI : coûts unitaires des états de santé et des principales procédures médicales

Tableau XLII : nombre cumulé d'événements évités au cours du suivi d'une cohorte de 1 000 patientes initialement traitées en adjuvant par trastuzumab

Tableau XLIII : coûts moyens par patiente (Euro) sur la période totale de suivi (45 ans)

Tableau XLIV : ratios coût/efficacité (CE) en années de vie gagnées

Tableau XLV : ratios coût/utilité (Qaly)

## Liste des abréviations

<b>ADCC :</b>	cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps
<b>ADN :</b>	acide désoxyribonucléique
<b>AFSSAPS :</b>	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
<b>AMM :</b>	autorisation de mise sur le marché
<b>ARN :</b>	acide ribonucléique
<b>ASCO :</b>	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
<b>BSC :</b>	<i>best supportive care</i>
<b>CDC :</b>	cytotoxicité dépendante du complément
<b>CDR :</b>	région déterminante de complémentarité, <i>complementary determining region</i>
<b>CHOP :</b>	cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisolone
<b>CISH :</b>	hybridation <i>in situ</i> chromogénique
<b>CRLCC :</b>	centre régional de lutte contre le cancer
<b>CVP :</b>	cyclophosphamide, vincristine, prednisolone
<b>EMA :</b>	<i>European Medicines Agency</i>
<b>EORTC :</b>	<i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i>
<b>EGFR :</b>	récepteur du facteur de croissance épidermique, <i>epidermal growth factor receptor</i>
<b>ELISA :</b>	dosage d'immunosorption liée à enzyme, <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
<b>Fab :</b>	fragment du site de liaison de l'antigène, <i>fragment antigen-binding</i>
<b>Fc :</b>	fragment cristallisable
<b>FcR :</b>	récepteur du fragment cristallisable
<b>FDA :</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FGF-2 :</b>	facteur de croissance des fibroblastes – 2, <i>fibroblast growth factor-2</i>
<b>FISH :</b>	hybridation <i>in situ</i> en fluorescence
<b>FOLFIRI :</b>	irinotecan, 5-fluorouracile, acide folinique
<b>FOLFOX :</b>	oxaliplatine, leucovorine, 5-fluorouracile
<b>HACA :</b>	anticorps humain anti-anticorps chimérique, <i>human anti-chimeric antibody</i>
<b>HAMA :</b>	anticorps humain anti-anticorps murin, <i>human anti-mouse antibody</i>
<b>HAT :</b>	hypoxanthine aminoptérine thymidine
<b>HER :</b>	récepteur épidermique humain, <i>epidermal growth factor receptor</i>
<b>HGPRT :</b>	hypoxanthine guanosine phosphoribosyl transférase
<b>HR :</b>	hazard ratio
<b>IC :</b>	intervalle de confiance
<b>IFL :</b>	irinotecan, 5-fluorouracile, acide folinique

<b>IFN :</b>	interféron
<b>Ig :</b>	immunoglobuline
<b>IGF1R :</b>	facteur de croissance de type insuline 1, <i>insulin growth factor 1 receptor</i>
<b>IHC :</b>	immunohistochimie
<b>INCa :</b>	institut national du cancer
<b>KPS :</b>	indice de performance de Karnofsky
<b>LLC-B :</b>	leucémie lymphoïde chronique B
<b>MMP :</b>	métalloprotéinases de la matrice
<b>NCIWG :</b>	<i>national cancer institute-sponsored working group</i>
<b>NFS :</b>	numération formule sanguine
<b>OR :</b>	réponse globale
<b>OS :</b>	survie globale
<b>ORL :</b>	oto-rhino laryngologique
<b>PCR :</b>	polymérisation en chaîne
<b>PEG :</b>	polyéthylène glycol
<b>PFS :</b>	survie sans progression
<b>RC :</b>	réponse complète
<b>RIA :</b>	radioimmunologie, <i>radio immunoassays</i>
<b>RP :</b>	réponse partielle
<b>RR :</b>	risque relatif
<b>scFv :</b>	<i>single chain Fv</i>
<b>SCRW :</b>	<i>Secretion Capture Report Web</i>
<b>SD :</b>	<i>maladie stable</i>
<b>sdAb:</b>	<i>single domain antibody</i>
<b>SDR :</b>	résidu déterminant de complémentarité, <i>specificity determining residue</i>
<b>TGF<math>\alpha</math> :</b>	facteur de croissance transformant alpha, <i>transforming growth factor-alpha</i>
<b>VEGF :</b>	facteur de croissance endothéliale vasculaire, <i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>YAC :</b>	chromosome artificiel de levure, <i>yeast artificial chromosome</i>
<b>5-FU :</b>	5-fluorouracile

## Introduction

Pour traiter les cancers, les oncologues ont disposé jusqu'alors de trois moyens, la chirurgie vieille de plusieurs siècles, la radiothérapie qui ne date que du début du siècle dernier et la chimiothérapie qui n'a qu'une cinquantaine d'années. Si le développement de nouveaux médicaments cytotoxiques et de nouvelles techniques de radiothérapie et de chirurgie a prolongé la survie et amélioré la qualité de vie des patients, les oncologues sont confrontés journallement aux effets indésirables de ces traitements et font malheureusement l'expérience de fréquents échecs thérapeutiques. De ce fait, les cancers sont aujourd'hui la première cause de décès dans notre pays, et des modalités thérapeutiques innovantes doivent être proposées. Dans ce contexte, l'un des développements les plus intéressants dans le domaine des thérapies anticancéreuses est celui des anticorps monoclonaux dont l'efficacité clinique est maintenant prouvée, conduisant à une large utilisation clinique de quelques anticorps.

Le développement d'une réponse immunitaire à toute agression antigénique se traduit par l'activation de deux systèmes de défense : une réponse innée (système non spécifique) qui constitue la première ligne de défense ; une réponse spécifique (système immunitaire), impliquant les réponses humorales et à médiation cellulaire. L'organisme répond à l'introduction d'un antigène par la production de cellules sensibilisées (les lymphocytes T), capables de reconnaître spécifiquement cet antigène et de réagir à son contact (réaction immunitaire à médiation cellulaire) et par la synthèse d'anticorps (réaction immunitaire humorale). Les anticorps ont trois fonctions principales : se lier à l'antigène, activer le système du complément et recruter les cellules immunocompétentes. Les immunoglobulines ont la capacité de reconnaître et de se fixer de manière spécifique sur un antigène. Cette spécificité est conférée par la présence de domaines variables aux extrémités des anticorps. Ainsi, des anticorps de diverses classes sont sécrétés et se retrouvent dans le sérum, appelé alors antisérum. Il existe une infinie variété d'anticorps, capables de se fixer à une infinie variété d'antigènes. Cette propriété remarquable a conduit les chercheurs à essayer d'utiliser ces molécules comme outil thérapeutique.

Les anticorps protègent également l'organisme en déclenchant la cascade du complément. Il s'agit d'un ensemble de protéines du plasma dont l'activation (par la voie classique dans le cas d'anticorps) permet de détruire des bactéries et autres cellules par perforation et de faciliter la phagocytose, l'élimination des complexes immuns et la libération de molécules chimiotactiques. Après avoir reconnu un antigène grâce à sa partie variable, un anticorps peut se lier à des cellules du système immunitaire par sa partie constante. Ces interactions revêtent une grande importance dans le déroulement de la réponse immunitaire. Ainsi, les anticorps fixés sur une

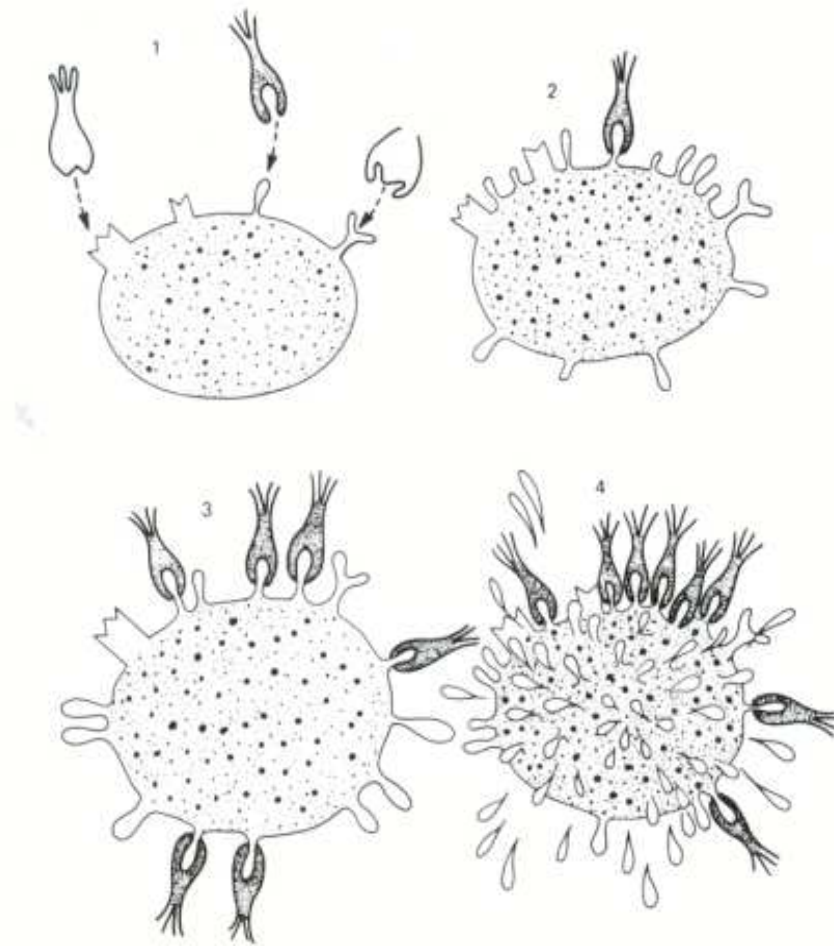
bactérie peuvent se lier aux macrophages et déclencher une phagocytose. Les lymphocytes NK (*Natural Killer*) peuvent exercer leur cytotoxicité et lyser des bactéries opsonisées par des anticorps.

L'observation dans les années 1950 d'une régression tumorale après l'administration de sérums « poolés » avait encouragé les scientifiques à explorer des méthodes destinées à stimuler le système immunitaire pour lutter contre les cancers. Le but était de développer des anticorps spécifiques dirigés contre une cible unique et capables d'inhiber la progression tumorale, tout en épargnant les tissus sains. Cependant, l'utilisation de sérums « poolés » ne fournissait pas une source reproductible d'anticorps compatible avec le développement d'essais cliniques.

La mise au point de la technique d'obtention des anticorps monoclonaux par Georges Kohler et César Milstein publiée en 1975 dans le journal *Nature*, a représenté un grand pas en avant pour la biologie et la biologie clinique. Immédiatement après cette publication, des avancées considérables furent obtenues dans le domaine de la recherche fondamentale et du diagnostic. Cependant, d'importants problèmes surgirent lorsque l'utilisation des anticorps monoclonaux chez des patients fut envisagée. La question de l'obtention d'anticorps monoclonaux à haute affinité dirigés contre des cibles spécifiques pertinentes se pose rapidement. Par ailleurs, l'utilisation récurrente d'anticorps monoclonal de souris chez l'homme montra qu'elle conduisait à l'apparition d'anticorps humain anti-anticorps de souris, provoquant une diminution d'efficacité et des événements indésirables sérieux. De plus, les propriétés effectrices des anticorps de souris injectés chez l'homme s'avérèrent être diminuées. De nombreux travaux d'ingénierie cellulaire visant à résoudre ces problèmes furent entrepris. Malgré ces efforts, aucune technique d'ingénierie cellulaire fiable et facile d'emploi permettant l'obtention d'anticorps monoclonal humain ne fut mise en place. Des efforts très importants ont été alors consentis pour générer par ingénierie moléculaire des anticorps monoclonaux ayant de meilleures affinités, une immunogénicité réduite et de meilleures propriétés effectrices. Quatre stratégies d'ingénierie moléculaire ont été mises en œuvre : construction d'anticorps chimérique comprenant des parties variables de souris et des parties constantes humaines ; construction d'anticorps humanisés par greffe des régions hypervariables d'anticorps monoclonaux de souris sur des régions charpentes humaines VH et VL ; construction de banques combinatoires de régions VH et VL humaines exprimées à la surface de phages filamenteux ; construction d'anticorps humains par obtention de souris transgéniques contenant les gènes codant les chaînes lourdes et légères humaines. Ces différentes approches ont permis la mise sur le marché de 18 anticorps monoclonaux dans différents domaines thérapeutiques. Cette montée en puissance des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique est liée incontestablement aux



stratégies d'ingénierie d'anticorps, mais également à notre meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires des pathologies où une intervention thérapeutique à l'aide d'anticorps peut être envisagée. D'autres approches d'utilisation d'anticorps monoclonaux sont aujourd'hui activement explorées. Par exemple, des fragments d'anticorps (anti-virus, anti-oncogène) ont été exprimés dans des cellules tumorales et dans des cellules infectées par des virus, pour bloquer ou moduler les fonctions de protéines intracellulaires (*intrabodies*). Par ailleurs, des études intensives sur la stabilité et le repliement des anticorps recombinants, sur l'optimisation des propriétés effectrices Fc (par mutation ponctuelle et par modification du profil de glycosylation), ainsi que sur la production en masse d'anticorps monoclonaux par des plantes transgéniques ou dans le lait d'animaux transgéniques sont actuellement développées. Tous ces anticorps de seconde génération, dont on peut espérer qu'ils seront produits et utilisés à moindre coût, vont constituer sans nul doute des outils majeurs pour mieux maîtriser des pathologies pour lesquelles peu ou pas de solutions thérapeutiques existent à ce jour.



*Figure n°1 : « boulet magique » de Paul Ehrlich (1906)*

*Tableau I : obstacles à l'efficacité des anticorps monoclonaux de première génération dans le traitement des cancers (Bellet D et al., 2003)*

---

Formation d'anticorps humains anti-Ig murine
Réaction croisée avec des antigènes exprimés par des tissus sains
Distribution hétérogène des antigènes dans les cellules tumorales
Faible liaison de l'anticorps à l'antigène
Faible accès de l'anticorps à la tumeur (faible vascularisation)
Faible pénétration de l'anticorps à l'intérieur de la tumeur (forte pression interstitielle)
Élimination rapide des anticorps par des cellules tumorales circulantes

---

## **1. Historique de l'utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux**

En 1906, Paul Ehrlich, médecin allemand, a été le premier à rêver d'un « boulet magique » ou d'un missile guidé capable de tuer des cellules cancéreuses (*figure n°1*) (Ehrlich P, 1906). L'observation dans les années 1950 d'une régression tumorale après l'administration de sérums poolés avait encouragé les scientifiques à explorer des méthodes destinées à stimuler le système immunitaire comme outil thérapeutique pour lutter contre les cancers (Wright PW *et al.*, 1976). Le but était de développer des anticorps spécifiques dirigés contre une cible unique et capable d'inhiber la progression tumorale, tout en épargnant les tissus sains. Cependant, l'utilisation de sérums poolés ne fournissait pas une source reproductible d'anticorps compatible avec le développement d'essais cliniques. Avec la mise au point en 1975 de la technique des hybridomes par Georges Kohler et César Milstein, il est devenu possible de produire *in vitro* des anticorps murins de spécificité unique en quantité quasi illimitée (Kohler G *et al.*, 1975).

Le premier essai clinique d'un anticorps monoclonal pour le traitement d'un lymphome a été décrit en 1980 (Nadler LM *et al.*, 1980). Malheureusement, les essais cliniques effectués au cours de ces années 1980 n'ont pas démontré que les anticorps monoclonaux pouvaient être les « boulets magiques » tant espérés pour traiter les cancers. En dehors de leur efficacité clinique limitée, ils présentaient des effets indésirables suffisamment sérieux pour limiter leur utilisation, tels que la formation d'anticorps humain anti-immunoglobuline murine ou HAMA (*human anti-mouse antibodies*), ou encore des obstacles limitant leur efficacité, tel qu'un faible accès de l'anticorps à la tumeur (*tableau 1*). De plus, les anticorps murins ont une demi-vie courte dans le sérum, ainsi qu'une capacité limitée pour recruter des effecteurs cellulaires ou les protéines impliquées dans la réponse immune et réaliser une cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps ou une cytotoxicité dépendante du complément. En définitive, un titre de la revue *Genetic Engineering News* du 10 août 1994 résume bien la situation au milieu des années 1990 : « le développement des anticorps monoclonaux : plus de difficultés qu'initialement prévu » (*Monoclonal antibodies in industry : more difficult than originally thought*). Le premier anticorps monoclonal approuvé pour une utilisation thérapeutique est OKT-3, approuvé en 1986 (muromomab, Orthoclone®), utilisé en transplantation rénale humaine. Par la suite, le développement d'autres anticorps fut relativement décevant.

Pourtant, l'observation de quelques réponses cliniques, en particulier chez les patients avec un lymphome T ou un lymphome B, avait stimulé la recherche de solutions pour améliorer l'efficacité des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique (Miller RA *et al.*, 1981 ; Miller RA

*et al.*, 1982). Notamment, d'importants travaux d'ingénierie des anticorps ont été effectués pour pallier le problème de la formation d'anticorps humains anti-anticorps murins induits par la présence d'anticorps murins, donc étrangers. Le développement de l'ingénierie génétique des anticorps a permis de transformer progressivement les anticorps murins en anticorps humains. Ces efforts allaient conduire à améliorer l'efficacité thérapeutique des anticorps dès 1995. Le titre d'un article de *Genetic Engineering News* du 15 avril 1995 illustre ce renouveau : « Des résultats positifs d'essais cliniques d'immunothérapie stimulent fortement l'enthousiasme pour la technologie des anticorps monoclonaux » (*Positive results of immunotherapy trials boost the enthusiasm for Mab technology*). A partir de 1998, les résultats cliniques étaient devenus suffisamment convaincants pour que de nombreux anticorps fassent l'objet d'essais cliniques pour le traitement de diverses maladies, notamment pour le traitement des tumeurs liquides et des tumeurs solides.

## **2. Evolutions technologiques des anticorps**

La technique des hybridomes de Georges Kohler et César Milstein permet de produire des anticorps monoclonaux dits de première génération, c'est-à-dire des anticorps murins dont l'utilisation thérapeutique a donné des résultats décevants. Deux voies technologiques principales ont été suivies pour tenter d'améliorer l'efficacité thérapeutique des anticorps. La première consiste à modifier l'anticorps lui-même pour le rendre moins immunogène et pour améliorer son accès à la tumeur ou sa pénétration intratumorale. L'autre voie consiste à coupler l'anticorps à d'autres molécules (toxine, agent cytotoxique, isotope radioactif, enzyme...) afin de guider ces molécules sur le site tumoral et d'augmenter l'efficacité de la molécule couplée à l'anticorps.

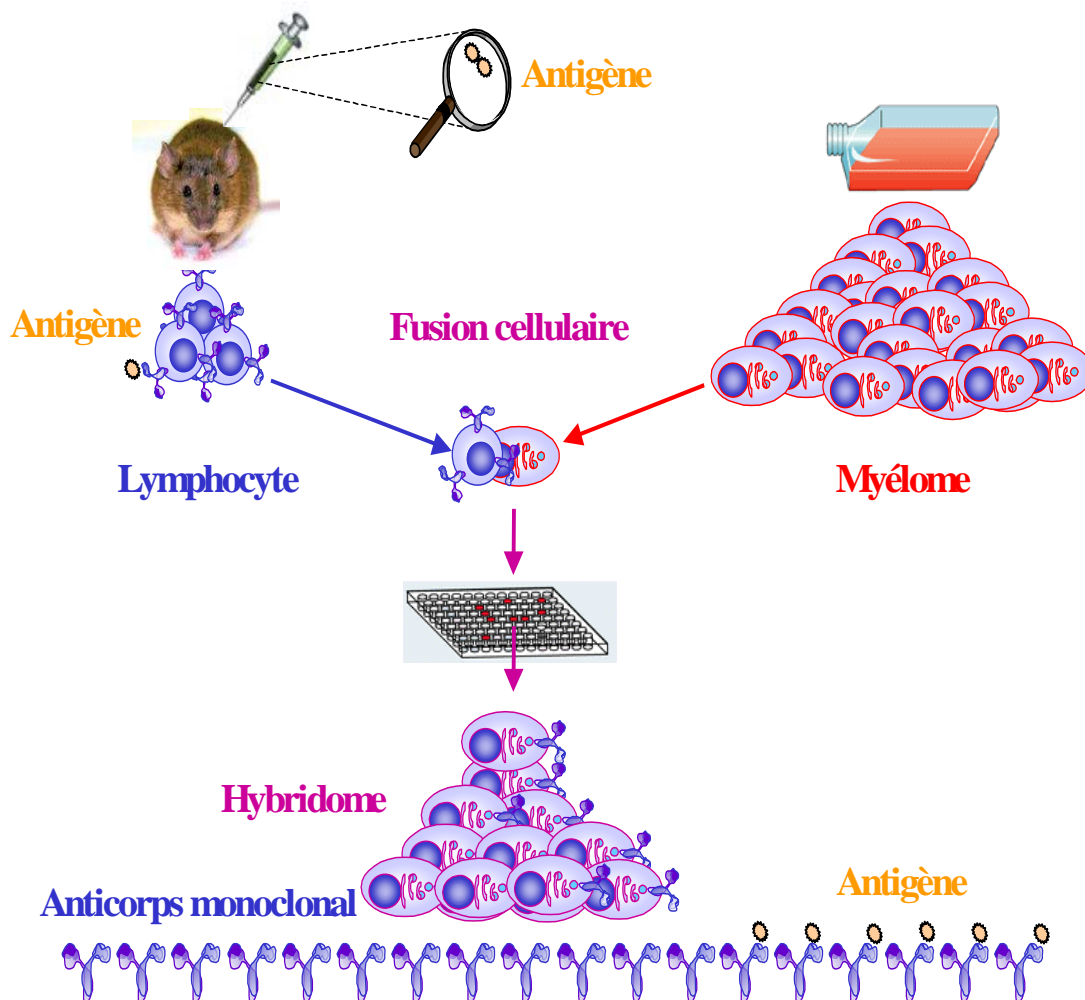
### **2.1. Production d'anticorps monoclonaux de première génération : les anticorps murins**

Le principe général de la production d'hybridome repose sur la fusion de lymphocytes B, sécrétant des anticorps mais ne se multipliant pas *in vitro*, avec des cellules de myélome lymphoïde, ayant la capacité de se multiplier rapidement et indéfiniment *in vitro* dans un milieu de culture (*figure n°2*).

Cette technique comporte cinq étapes :

- L'obtention de **lymphocytes sensibilisés** ;
- La **fusion** des lymphocytes B sensibilisés avec des cellules de myélome lymphoïde ;
- La **sélection** des cellules hybrides ;
- Le **clonage** des hybridomes sécréteurs ;
- Le **screening** des cellules productrices d'anticorps.

## HYBRIDOME ET ANTICORPS MONOCLONAL



*Figure n2* : production d'anticorps monoclonaux selon la technique des hybridomes de G. Kohler et C. Milstein (Bellet, 2002)

### 2.1.1. Immunisation

Les lymphocytes producteurs d'anticorps dirigés contre un antigène spécifique sont obtenus soit par immunisation animale, soit par immunisation *in vitro*. Afin d'obtenir un anticorps spécifique, la pureté de l'antigène est requise.

### **2.1.1.1. Immunisation animale**

#### Choix de l'animal

La souris reste l'animal le plus utilisé, car le génome des souris présente environ 95% d'homologie avec celui de l'homme. De plus, les souris sont des animaux de petites tailles et faciles à élever, ont une durée de vie courte et se reproduisent facilement. L'utilisation de souris permet d'obtenir à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape suivante, la fusion. La souche la plus utilisée, souche BALB/C, est une souris élevée en atmosphère stérile. Son sérum contenant peu d'anticorps naturels, ces souris permettent ainsi une bonne réponse de son système immunitaire à une stimulation antigénique.

Le modèle rat peut également être utilisé. En 1970, Bazin et Beckers ont entrepris d'élever des rats, nommés LOU, qui présentaient la caractéristique de produire des anticorps après une injection intraveineuse d'antigène au niveau de la rate. De plus, le volume d'ascite obtenu chez un rat LOU/C est environ dix fois plus important que chez la souris (Sabbagh I, 1996).

#### Protocole d'immunisation

L'immunisation primaire de l'animal est réalisée par une injection de fortes doses d'antigène par voie intraveineuse ou péritonéale sur quatre semaines environ, ainsi les lymphocytes B qui réagissent à l'antigène choisi sont chaque fois plus fortement stimulés. Afin de stimuler le système immunitaire de l'animal, la première injection est effectuée en présence d'adjuvant complet de Freund (mélange d'huile minérale, qui a pour but de freiner la diffusion de l'antigène prisonnier dans l'huile, produisant ainsi un effet retard, et mélange de mycobactéries tuées qui génèrent une réaction inflammatoire avec granulome). Depuis peu, l'adjuvant complet de Freund est de plus en plus remplacé par le pApU et le Gerbu en raison de leur performance et de leur innocuité pour l'animal (l'adjuvant complet de Freund a tendance à causer plus d'inconfort). Une injection intraveineuse de quatre à cinq fois la dose initiale d'antigène est administrée trois jours avant la fusion, afin d'amplifier et de stimuler le système immunitaire de l'animal. Pour les rappels et le boost final, l'adjuvant incomplet de Freund est utilisé (présence uniquement d'huile minérale). Chaque rappel est précédé d'un prélèvement sanguin par voie rétro orbitale afin d'analyser l'immunoréactivité des sérums par un test ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (Mouquet H).

### **2.1.1.2. Immunisation *in vitro***

L'immunisation *in vitro* consiste à faire synthétiser des anticorps par des lymphocytes B provenant de cellules spléniques de rongeurs non immunisés ( $5 \cdot 10^6$  cellules), mis dans un milieu de culture en présence de l'antigène immunisant (0,05-5 $\mu$ g/mL).

Un milieu de culture est un milieu aqueux contenant des oligo-éléments, du glucose comme aliment énergétique, de la L-glutamine, des facteurs de croissance (vitamines, acides aminés essentiels), des hormones et des antibiotiques pour éviter les contaminations bactériennes. Les lymphocytes B, en présence uniquement de l'antigène, ne produisant pas d'anticorps, il est nécessaire d'ajouter au milieu de culture des lymphocytes T (dont leurs facteurs solubles stimulent la croissance des lymphocytes B), des médiateurs (lymphokines), des macrophages adhérents (qui présentent l'antigène à leur surface et stimulent la prolifération des lymphocytes B) et des agents mitogènes (tels que des lipopolysaccharides). L'ensemble cellulaire est incubé 4 à 5 jours à 37°C en étuve à atmosphère contrôlée.

### **2.1.1.3. Intérêt de l'immunisation *in vitro***

L'immunisation *in vitro* des cellules spléniques de rongeurs présente un certain nombre d'avantages par rapport à l'immunisation *in vivo* (Reading CL, 1982) :

- le protocole d'immunisation est moins long, il est de cinq jours uniquement ;
- des concentrations connues et bien déterminées d'antigènes peuvent être maintenues durant l'immunisation et des doses très faibles de l'ordre du nanogramme sont suffisantes ;
- des prélèvements périodiques peuvent être effectués sur une même culture pendant toute la durée de l'expérimentation ;
- des anticorps monoclonaux peuvent être produits contre des isoantigènes, contrairement à l'immunisation *in vivo* dans laquelle interviennent des phénomènes de tolérance et d'immunosuppression ;
- des monokines et lymphokines peuvent être testées à des concentrations variées de façon à obtenir une immunisation optimale des lymphocytes B.

Cependant, le rendement de l'immunisation *in vitro* est largement plus faible que l'immunisation *in vivo*.

### **2.1.2. Fusion**

Toutes les étapes suivantes doivent être réalisées dans des conditions stériles pour prévenir toute contamination bactérienne et fongique.

Le but de cette étape est de fusionner une cellule de souris productrice d'un anticorps monoclonal avec une lignée de cellules humaines « immortelles » ayant la particularité de se diviser indéfiniment.

Après le sacrifice de l'animal, la rate est extraite puis broyée, et les cellules sont mises en suspension dans un milieu dépourvu de sérum. L'élimination des érythrocytes s'effectue par centrifugation sur gradient de densité, à 400 g pendant 30 minutes. Les globules rouges et les



cellules mortes se localisent au fond du tube, tandis que les lymphocytes demeurent à l'interface, formant un anneau blanc pâle. Au-dessus de l'anneau des lymphocytes figure un milieu contenant les cellules spléniques. Les lymphocytes peuvent être prélevés à l'aide d'une pipette pasteur et lavés par centrifugation (Reckaty L, 1991). On obtient  $1.10^7$  à  $1.10^8$  cellules par rate de souris. Les lymphocytes sont ensuite mélangés avec les cellules de myélome préparées extemporanément. Les cellules de myélome sont des cellules cancéreuses, non sécrétrices d'anticorps, qui ont la capacité de se multiplier de façon indéfinie *in vitro*. Au moment de la fusion, elles doivent être en phase de croissance exponentielle. Généralement, la cellule myélomateuse utilisée a subi, au préalable, une double mutation qui lui fait perdre la capacité de sécréter des immunoglobulines et la prive de la faculté de produire l'enzyme hypoxanthine guanosine phosphoribosyl transférase (HGPRT), enzyme qui intervient dans la synthèse d'ADN et ARN par la voie exogène ([www.geniobio.ac-aix-marseille.fr/immuno/docs/Acmbn.ppt](http://www.geniobio.ac-aix-marseille.fr/immuno/docs/Acmbn.ppt)).

L'étape de fusion se fait selon deux méthodes principales : l'utilisation d'un agent fusionnant, ou l'électrofusion cellulaire.

#### Utilisation d'un agent fusionnant

En 1960, H. Harris découvrit le pouvoir de fusion du virus de SENDAI. Ce paramyxovirus, sous l'action soit de rayons ultraviolets, soit traité à la  $\beta$ -propiolactone, perd son pouvoir infectieux et létal sans modification de ses pouvoirs hémagglutinant et fusionnant. Afin de prévenir tout risque de prolifération du virus SENDAI, il est actuellement remplacé par le polyéthylène glycol (PEG), polymère qui a l'avantage d'induire une fusion rapide (2 min à 37°C) et d'être dépourvu d'impureté toxique pour les cellules. Il agit par diminution des charges négatives de surface, ce qui provoque l'affaiblissement des forces de répulsion et donc, un meilleur contact entre les cellules.

#### L'électrofusion cellulaire

Le principe de l'électrofusion cellulaire repose sur la formation de pores transitoires dans la membrane cellulaire sous l'effet d'un champ électrique alternatif de haute fréquence. Si les cellules sont au préalable en contact étroit, la fusion cellulaire peut avoir lieu sous l'action d'une brève impulsion d'un courant continu de haute tension. Dans le cas des hybridomes, un contact plus spécifique entre la cellule myélomateuse et le lymphocyte peut être tenté par une liaison dirigée grâce à un complexe avidine-biotine (Reckaty L, 1991). Les rendements en hybridomes viables sont moins satisfaisants que ceux obtenus par le polyéthylène glycol. Ainsi, la fusion par le PEG est celle utilisée en laboratoire.

### **2.1.3. Sélection des cellules hybrides**

La sélection des hybridomes met à profit le déficit enzymatique des cellules de myélome en hypoxanthine guanosine phosphoribosyl transférase. L'addition de l'aminoptérine bloque la synthèse endogène des bases puriques et pyrimidiques. En l'absence de l'enzyme HGPRT, les cellules de myélome ne peuvent utiliser l'hypoxanthine exogène pour synthétiser les purines, donc elles meurent, alors que les hybridomes, non déficitaires en cette enzyme qui est apportée par les lymphocytes B sensibilisés, peuvent utiliser l'hypoxanthine et la thymidine dans la voie exogène afin de synthétiser l'ADN et l'ARN nécessaires à la vie et à la multiplication des cellules d'hybridome. De même, les cellules immunocompétentes sont incapables de se multiplier en culture et meurent rapidement. Le supplément sélecteur hypoxanthine aminoptérine thymidine (HAT) est additionné au milieu de microculture pendant la première phase après la fusion. Il sera remplacé par l'hypoxanthine thymidine après élimination des cellules de myélome. Suite à une période de sélection dans le milieu HAT, les hybridomes se développent en colonies. Le taux de succès d'une fusion est plutôt faible et varie selon les protocoles utilisés (de 5% à 50%).

### **2.1.4. Screening des cellules productrices d'anticorps**

Les puits de culture positifs contiennent une série entière d'hybridomes sécrétant des anticorps tous différents. La lignée de cellule de l'hybridome réellement productrice d'anticorps monoclonal doit être isolée avant sa mise en culture. La sélection des hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux spécifiques se fait par des tests d'activité anticorps dans le surnageant de la culture. Les méthodes utilisées sont la radioimmunologie (RIA), la révélation immunoenzymatique (ELISA), l'hémagglutination, l'immunofluorescence indirecte. Ces tests sont généralement effectués entre 9 et 11 jours après la fusion.

On constate que même avec le meilleur schéma d'immunisation contre un antigène puissant, moins de 5% des cellules spléniques produisent des anticorps spécifiques.

### **2.1.5. Clonages des hybridomes sécréteurs**

#### ***2.1.5.1. Clonage par dilution limite***

Le principe de la méthode est de diluer le mélange de telle manière que, lors de la distribution de la suspension cellulaire dans des plaques multipuits, on puisse s'attendre statistiquement à une seule cellule par puits. Cette méthode est une procédure en trois temps. La première série de dilutions permet de sélectionner les cellules qui sécrètent en grande quantité l'anticorps. La

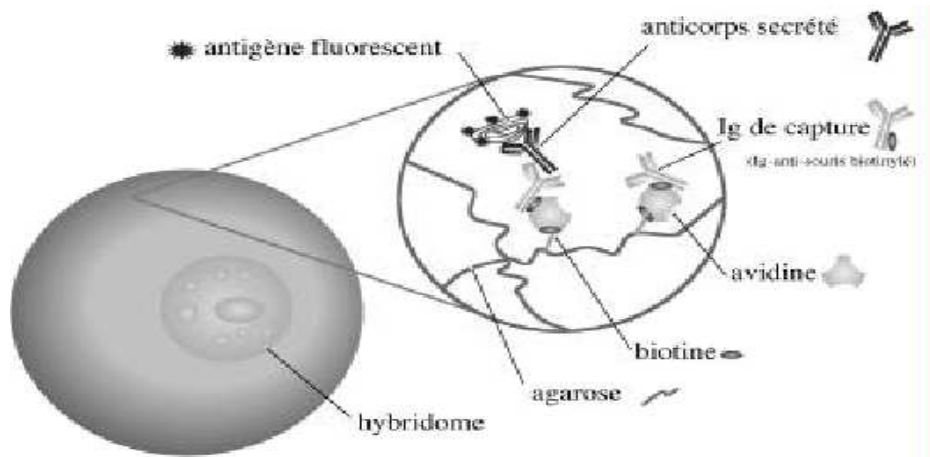
deuxième série de dilutions permet de sélectionner les lignées cellulaires à partir d'une seule cellule. La troisième série de dilutions permet de vérifier le clonage.

### **2.1.5.2. Clonage sur gel d'agarose**

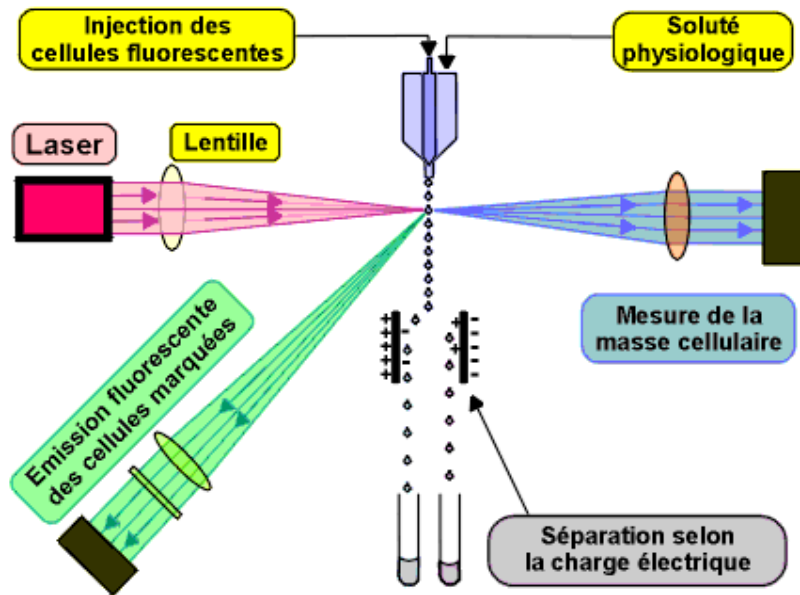
Le but est de faire croître les cellules dans un milieu solide. Il existe une variété de gels qui permet la croissance des cellules après addition de facteurs appropriés (sérum, acides aminés, antibiotiques...). Les cellules se divisent et forment des foyers sur le gel d'agarose qui ressemblent à des petites sphères. Comme le milieu est semi solide, ces petites boules peuvent être prélevées à l'aide d'une pipette et placées dans une plaque de puits de culture.

### **2.1.5.3. Clonage pas cytométrie de flux**

Cette technique, appelée encore *Secretion Capture Report Web* (SCRW), permet une analyse multiparamétrique des anticorps monoclonaux sécrétés par des hybridomes, et simultanément l'isolement d'un clone présentant des caractéristiques particulières. Le SCRW consiste à encapsuler chaque hybridome dans une micro-gouttelette d'agarose biotinylée (*figure n°3*). L'anticorps sécrété par l'hybridome est capturé par un site dit de « capture » (agarose biotinylée/avidine/Ig-antisouris biotinylé) situé sur le filet d'agarose. L'addition de l'antigène rendu fluorescent permet de visualiser la présence de l'anticorps recherché. L'hybridome encapsulé ainsi caractérisé est isolé par cytométrie de flux, technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative des cellules isolées en suspension dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc (*figure n°4*). Un traitement ultérieur par l'agarase libère l'hybridome de la gouttelette d'agarose autorisant l'expansion clonale (Kenney JS *et al.*, 1998).



*Figure n°3 : clonage par cytométrie de flux, technique de Secretion Capture Report Web (SCRW) (Kenney et al., 1998)*



*Figure n°4 : technique de la cytométrie de flux*

Seule la technologie SCRW permet de sélectionner, parmi des millions de cellules et à une vitesse de 200 cellules/secondes les hybridomes qui sécrètent un anticorps spécifique de l'antigène choisi. Lors des techniques classiques de clonage par dilution limite, il est possible par exemple de tester tous les hybridomes obtenus et les quelques cellules sécrétant l'anticorps recherché peuvent passer inaperçues empêchant de ce fait l'analyse statistique de la diversité du répertoire des lymphocytes B.

Malgré l'ensemble des précautions prises entre l'étape de détection d'un surnageant positif et le clonage, environ 50% des clones positifs au départ peuvent être perdus.

### **2.1.6. Production de masse des anticorps monoclonaux**

Le but à atteindre ensuite est de faire proliférer l'hybridome sélectionné dans les meilleures conditions afin de produire suffisamment d'anticorps. La production à grande échelle d'anticorps monoclonaux repose sur la culture des hybridomes soit *in vivo*, soit *in vitro*.

#### **2.1.6.1. Production *in vivo* : procédé de l'ascite**

Le procédé de l'ascite implique l'injection intrapéritonéale ou sous-cutanée tout d'abord de pristane (huile minérale) chez une souris ou un rat, provoquant ainsi une irritation de la cavité abdominale mais pas encore d'ascite. Une à trois semaines après, les hybridomes ( $10^6$  à  $10^7$  cellules) sont injectés dans le péritoine des souris. Au cours des 10 à 25 jours suivants, la tumeur se développe dans toute la région péritonéale sous forme d'ascite et, durant le processus de multiplication, les cellules produisent des quantités importantes d'anticorps monoclonaux. Lorsque l'ascite a atteint un certain volume, l'abdomen est ponctionné avec une aiguille. Une seule souris produira 10 à 20 mL de liquide d'ascite contenant environ 10 mg/mL d'anticorps monoclonaux.

L'histocompatibilité entre l'hybride et la souris productrice d'ascite est requise. A chaque passage sur souris ou rat, la production d'anticorps monoclonaux doit être vérifiée pour s'assurer de la persistance de la capacité sécrétoire d'hybridome.

La culture en ascite permet une production flexible de petites quantités d'anticorps monoclonaux. Cette production *in vivo* présente cependant plusieurs inconvénients, notamment la petite taille de la souris et la présence de nombreuses enzymes protéolytiques dans l'ascite. De plus, le liquide de l'ascite contient un mélange de protéines dont certaines sont des immunoglobulines. Il se pose aussi le problème éthique de l'utilisation des animaux et de l'injection de cellules cancéreuses. La production *in vivo* devient de plus en plus une technique obsolète.

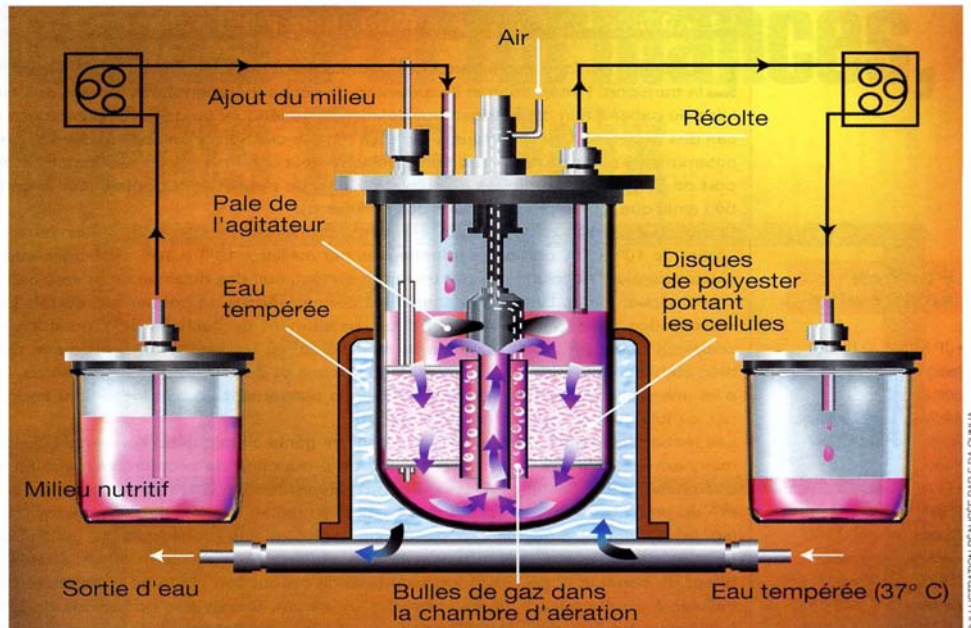
#### **2.1.6.2. Production *in vitro* : procédé par culture cellulaire**

Pour diverses applications, il est nécessaire de produire des quantités plus importantes d'anticorps. Pour l'imagerie *in vivo*, on doit disposer de quelques centaines de microgramme d'anticorps par patient. Pour la thérapie *in vivo*, plusieurs centaines de milligramme sont requises par patient.

La production *in vitro* est basée sur la culture des hybridomes dans des milieux de culture définis. Le milieu ajouté pour la nutrition des cellules contient du sérum de veau foetal. Après l'adaptation des lignées de cellules, on peut utiliser un milieu exempt de sérum, et donc éliminer le risque de contaminations accidentelles par des micro-organismes présents dans le sérum. Afin d'accélérer la division, des cellules nourricières sont incorporées au milieu.

La culture de cellules peut être effectuée dans des flacons d'un contenu de 0,5 à 1 litre (flacons pour cultures en rotation, Rollerkulturen), dans des flacons pour cultures selon Spinner d'un contenu de 1 à 10 litres, dans des réacteurs capillaires (principe de la dialyse) ou dans des fermenteurs de capacités diverses (10 à 1000 litres).

Les opérations de type *batch* ou discontinu, constituent le mode de gestion le plus simple et le plus flexible de conduite des cultures. Après inoculation, celles-ci se poursuivent jusqu'à épuisement du milieu et récolte du produit. Elles sont réalisées dans des cytotolteurs, le plus souvent des bioréacteurs à agitation mécanique dérivés des fermenteurs microbiens. Le plus important pour la survie des cellules, comme pour le contrôle de la culture, est de maintenir toutes les cellules en suspension, avec une bonne homogénéisation du liquide. Les bioréacteurs à agitation pneumatique (*air-lift*) sont une alternative satisfaisante aux dispositifs d'agitation mécanique pour des cultures allant jusqu'à 1000 litres. C'est alors l'introduction d'air comprimé qui provoque l'agitation et l'oxygénation du milieu. Un inconvénient des opérations discontinues est que le milieu de culture s'épuise au fur et à mesure que les cellules l'utilisent, ce qui limite tant la croissance cellulaire que la production. Les opérations de type *fed-batch* (discontinu alimenté) représentent ainsi une amélioration des procédés *batch*. Elles consistent à apporter de manière contrôlée des nutriments en cours de route, pour prévenir leur épuisement. Un nouveau perfectionnement de la culture des cellules animales consiste à passer aux opérations réellement continues, avec apport permanent de nutriments et retrait simultané du milieu usagé et des produits formés, le volume de culture restant constant. D'autres systèmes de perfusion utilisent des microporteurs poreux sur lesquels les cellules sont immobilisées. Par exemple, le procédé Celli-Gen Plus (*New Brunswick Scientific Co, Inc, Edison, New Jersey, Etats-Unis*) comprend un agitateur à haut débit qui permet de faire circuler le fluide nutritif et l'oxygène à travers un lit de supports fibreux sur lesquels les cellules sont fixées en grand nombre (*figure n°5*) (Emery N and Gerin P, 1998).



Dans le procédé Celligen Plus (New Brunswick Scientific Co), les cellules animales sont portées par des disques de polyester immobilisés.

*Figure n°5 : procédé Celli-Gen Plus (Emery et al., 1998)*

Toutes les lignées d'hybridome ne se cultivent pas *in vitro* avec le même succès. Quelques-unes exigent un milieu de culture et des facteurs de croissance très spécifiques. Le surnageant des cultures de cellules contient les anticorps, mais à une concentration beaucoup plus faible que l'ascite. La présence de protéines étrangères provenant par exemple du sérum de veau foetal et la faible concentration en anticorps rendent nécessaires le rinçage et la concentration du surnageant, ce qui est techniquement difficile et onéreux.

### 2.1.7. Purification et conservation des anticorps monoclonaux

La purification peut se faire de différentes manières, comme par exemple la chromatographie par filtration sur gel, chromatographie par échange d'ions ou par précipitation au sulfate d'ammonium.

La conservation des anticorps monoclonaux est obtenue par congélation d'une partie du clone dans une ampoule placée dans l'azote liquide. L'autre partie du clone est maintenue en activité ; sa durée de vie est de plus de 20 ans.

L'enthousiasme initial suscité par les anticorps monoclonaux fut cependant suivi par un grand scepticisme sur le potentiel thérapeutique. La grande majorité des essais cliniques donnant des résultats décevants, à l'exception de l'anticorps OKT3, utilisé dans la prévention du rejet aigu des allogreffes. Plusieurs facteurs furent à l'origine de cette désillusion :

- origine non humaine des anticorps : ces anticorps murins provoquent une réaction immunitaire qui va les éliminer rapidement par la formation d'anticorps humains anti-anticorps murins ou HAMA (Human Anti-Mouse Antibody) limitant alors la possibilité de répéter plusieurs fois l'administration à un patient développant des HAMA ;

- manque de spécificité de l'antigène : dirigés contre des antigènes associés aux tumeurs, les anticorps sont susceptibles de reconnaître et parfois de détruire des cellules normales exprimant également ces mêmes antigènes ;

- élimination rapide au niveau hépatique ou rénal de l'anticorps lié à des cellules tumorales circulantes, l'empêchant alors d'atteindre la tumeur primaire ou les métastases ;

- faible pénétration intratumorale des anticorps, notamment en raison de leur taille (150 K) et faible pénétration dans certaines tumeurs solides peu vascularisées : seulement 0,001 à 0,1% de la quantité d'anticorps monoclonaux injectée se retrouve au niveau de la tumeur pour chaque gramme de masse tumorale.

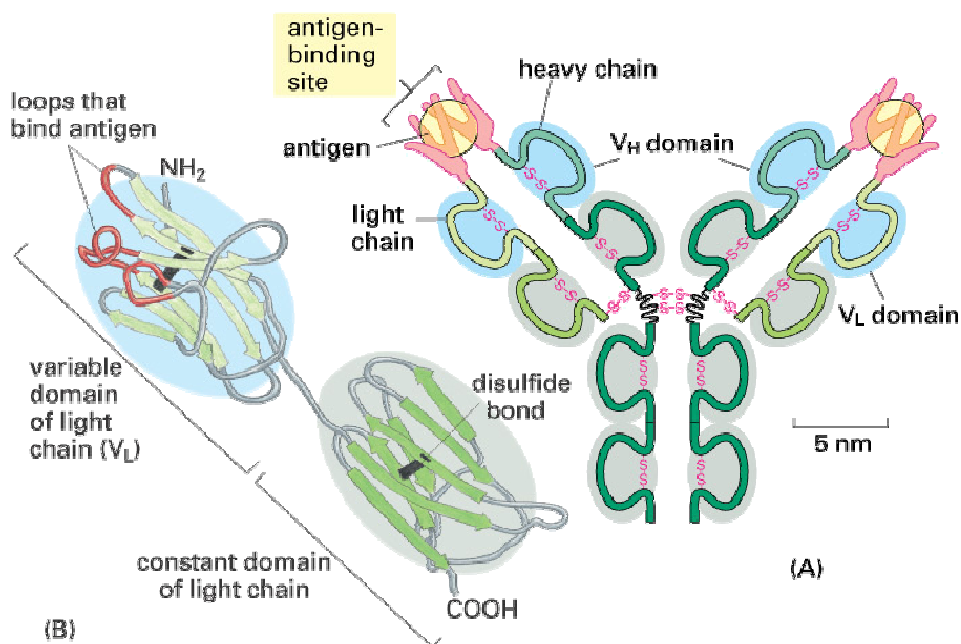
Les anticorps de première génération, c'est-à-dire les anticorps murins, apparaissent ainsi comme des outils remarquables pour la recherche, mais décevants pour l'immunointervention thérapeutique. D'importants travaux d'ingénierie des anticorps ont été réalisés afin de pallier à ces différents inconvénients.



## 2.2. Production des anticorps de seconde génération

### 2.2.1. Structure et diversité des anticorps

Les anticorps sont des immunoglobulines formées de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes (H, *heavy*) et deux chaînes légères (L, *light*) kappa ou lambda qui sont reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures assurant une flexibilité de la molécule. Ces chaînes forment une structure en Y (*figure n°6*). Pour un anticorps donné, les deux chaînes lourdes sont identiques, de même pour les deux chaînes légères. Les domaines VL et VH sont appelés domaines variables, ce sont eux qui lient l'antigène. Chaque domaine variable possède trois boucles hypervariables appelées CDR (régions déterminantes de complémentarités, *complementary determining regions*) qui se caractérisent par une très grande variabilité en acides aminés d'un anticorps à un autre. Les CDR constituent le site de combinaison antigénique. Les domaines CL, CH1, CH2 et CH3 sont appelés domaines constants. La base de l'Y contient la région Fc, fragment cristallisable, impliquée dans la fixation de la molécule à des récepteurs cellulaires FcR et à la fixation du complément.



*Figure n°6 : structure schématique d'un d'anticorps*

[http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/ecb/antibody\\_molecule.html](http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/ecb/antibody_molecule.html)

Les antigènes cibles des anticorps monoclonaux utilisés en hématologie sont habituellement des structures membranaires appelés CD (cluster differentiation), portées par les cellules hématopoïétiques (CD52, CD20...). En oncologie, ce sont soit des récepteurs portés par la cible (HER2, EGFR...), soit des messagers stimulant la prolifération de néovaisseaux (VEGF).

### 2.2.2. Des anticorps chimériques aux anticorps humanisés

L'utilisation d'anticorps monoclonaux en thérapie humaine nécessite la réduction de l'immunogénicité des anticorps. La technique d'humanisation a donc été développée dans le but d'obtenir des anticorps capables de reconnaître un antigène donné chez l'homme, sans provoquer de réactions immunogènes dues à la présence de structures murines.

Les premières tentatives d'humanisation d'anticorps murin ont d'abord conduit à la construction d'anticorps chimériques, dans lesquels les régions constantes des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines murines sont remplacées par des régions constantes humaines (*figure n°7*). En effet, la région constante et la région variable d'un anticorps sont codées par des gènes différents. L'association des gènes humains des régions constantes aux gènes d'origine murine des régions variables de l'anticorps monoclonal initial utilise la technique ADN recombinant (Morrison SL *et al.*, 1984). Cette chimérisation conduit à une diminution importante des réponses immunes dirigées contre les régions murines. La formation d'anticorps humains dirigés contre les anticorps chimériques est retrouvée chez 40% des patients, ce qui n'est pas surprenant puisque environ 30% des anticorps chimériques est d'origine murine. Il est donc apparu nécessaire de rendre les anticorps murins encore plus humains.



---

*Figure n°7 : structure schématique d'un anticorps monoclonal murin, chimérique et humanisé*

L'approche employée par la suite, technique développée par le groupe de Greg Winter, a consisté à remplacer les régions hypervariables CDR d'un anticorps humain par des régions CDR d'origine murine (*figure n°7*) : l'anticorps ainsi construit est dit « humanisé » puisque moins de 10% de ses séquences peptidiques sont d'origine murine (Jones PT *et al.*, 1986).

Le but ultime de l'humanisation d'un anticorps est de produire des régions variables proches des régions humaines sans que l'anticorps humanisé perde l'affinité et la spécificité de l'anticorps murin. En effet, les régions hypervariables CDR contiennent la majorité des acides aminés constituant le site de liaison de l'antigène. En greffant les CDR provenant d'un anticorps murin dans des régions variables humaines, on attend que les CDR murins puissent remplacer les CDR humains sans affecter la structure du site de liaison de l'antigène formé par les CDR murins. Si cela s'est avéré exact dans certains cas, la plupart des anticorps humanisés réalisés par greffage des régions CDR n'ont plus la même affinité pour l'antigène que l'anticorps murin, en raison du rôle majeur de certains acides aminés des régions adjacentes aux CDR (régions charpentes, ou FR, *framework*) dans la structure du site de liaison de l'antigène. C'est ce qui a été observé avec l'anticorps CAMPATH-1 de rat qui a été humanisé par greffage de ses boucles CDR sur l'anticorps humain YTH 34.5. Lorsque la liaison avec l'antigène murin fut testée, les résultats ont montré que la concentration en anticorps humanisé devait être quarante fois plus élevée que celle de CAMPATH-1 de rat pour l'obtention d'une liaison comparable avec l'antigène (Rebello P and Hale G, 2002). Il semble donc nécessaire d'adapter les régions charpentes aux régions CDR qui vont leur être greffées.

La première étape consiste à cloner et à séquencer les gènes des régions variables de l'anticorps murin. Le clonage est réalisé par transcription inverse et réaction d'amplification en chaîne (RT-PCR) avec des amorces spécifiques pour les gènes codant les régions variables des immunoglobulines murines. Après RT-PCR, les fragments d'ADN contenant les gènes codant pour les régions variables des chaînes lourdes (VH) et légères (VL) des immunoglobulines murines sont séquencés et les séquences des acides aminés des chaînes VH et VL sont déterminées.

La seconde étape consiste à réaliser la conception de l'anticorps humanisé : il faut notamment identifier les résidus des régions charpentes murines importants pour maintenir la structure des CDR murins, afin de les transférer également dans un cadre humain. Ce dernier est lui-même sélectionné sur la base de son homologie avec les régions variables murines : cette étape commence par la réalisation d'un modèle en 3-dimensions des régions variables grâce à des programmes informatiques. En parallèle, les régions variables VH et VL murines sont comparées avec les séquences de régions humaines présentes dans la base de données, afin de choisir le cadre humain le plus approprié à l'humanisation. Lorsque le modèle en 3-dimensions des régions variables murines et le choix du cadre humain effectués, il faut alors identifier les résidus des régions charpentes susceptibles de contribuer au site de liaison de

l'antigène et ceux qui peuvent représenter une source potentielle d'immunogénicité. Enfin, il faut choisir l'isotype de l'anticorps humain. Si les résidus sélectionnés diffèrent entre les régions charpentes murines et humaines, il faut alors considérer l'inclusion des acides aminés murins dans l'anticorps humanisé. Or, certains de ces acides aminés sont potentiellement immunogéniques : il faut alors rechercher, dans les régions charpentes murines, les résidus « atypiques », c'est-à-dire rarement retrouvés dans les régions charpentes humaines. Ces résidus sont alors remplacés dans le cadre humain par le ou les résidus les plus fréquemment retrouvés dans les régions charpentes humaines aux positions correspondantes. Pour éliminer les sites potentiels de N-glycosylation, on effectue des changements d'acides aminés susceptibles de ne modifier que légèrement la conformation des régions CDR. Enfin, le choix de l'isotype de l'immunoglobuline s'effectue souvent en faveur de l'isotype IgG1.

La troisième étape consiste à produire les anticorps humanisés. Après synthèse des régions variables, il faut choisir les vecteurs d'expression stable dans les cellules telles que la lignée d'hybridome de souris Sp2/0-Ag14, la lignée CHO ou la lignée NSO.

Après expression de l'anticorps humanisé, les dernières étapes consistent à vérifier l'affinité et l'activité biologique de l'anticorps (Bellet D and Dangles V, 2005).

L'immunogénicité peut être encore plus réduite si les CDR ne sont pas greffées dans leur intégralité : seul les résidus déterminants spécifiques (SDR, *Specificity Determining Residue*), qui sont les résidus les plus importants pour l'interaction antigène-anticorps, sont greffés sur les modules variables humains. Seuls 20 à 33% des acides aminés des régions CDR sont critiques dans l'interaction antigène-anticorps.

### **2.2.3. Les anticorps humains**

Par la suite, des anticorps totalement humains ont été produits en utilisant principalement deux techniques, celle des souris transgéniques « xenomouse » et celle de l'expression à la surface de phages.

#### **2.2.3.1. Anticorps humains à partir de souris transgéniques « xenomouse »**

Un animal est dit transgénique lorsqu'il possède, outre ses propres séquences d'ADN, des gènes supplémentaires ou modifiés, dits transgènes, qui ont été ajoutés à son patrimoine héréditaire. Ainsi, des gènes de souris peuvent être remplacés par des gènes humains codant des immunoglobulines humaines.

La « xenomouse » est une souris transgénique qui exprime la grande majorité des gènes codant les immunoglobulines humaines. Chez ces souris, la machinerie servant à la production

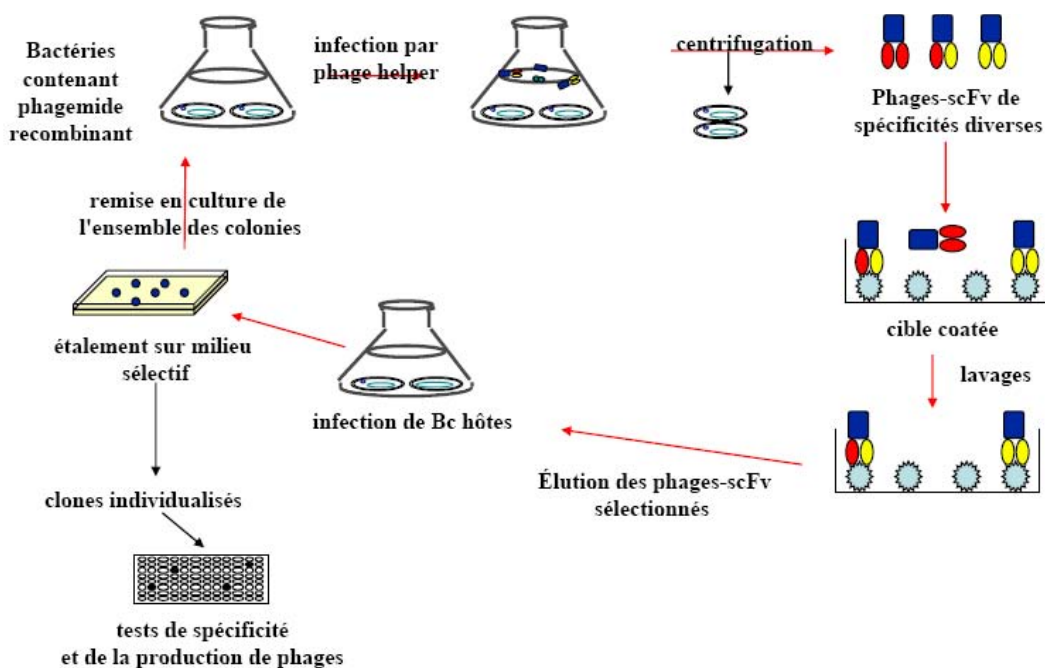
d'Ig de souris est inactivée et humanisée avec la presque totalité des locus correspondant aux gènes codant les Ig humaines afin de permettre chez la souris la production d'une large diversité d'anticorps humains de forte affinité. L'obtention de ces souris nécessite trois grandes étapes. La première consiste à inactiver les gènes codants pour les chaînes légères et lourdes de l'anticorps considéré. Cette manipulation a été réalisée dans des cellules souches embryonnaires (cellules ES pour embryonic stem). La lignée qui en résulte, homozygote pour la délétion, est incapable de produire l'anticorps murin. La seconde étape consiste à transférer chez la souris les locus correspondant aux gènes des anticorps humains. Le clonage de ces locus a été facilité par l'utilisation des chromosomes artificiels de levure (Yeast artificial chromosome, YAC) qui permet l'isolement et la manipulation génétique de grands fragments d'ADN. Ainsi, 80% du répertoire correspondant aux régions VH a été cloné et joint aux régions constantes humaines  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  ou  $\gamma 4$  pour obtenir trois YAC différents produisant trois isotopes correspondant respectivement aux IgG1, IgG2 ou IgG4 humaines. Les YAC sont alors introduits dans des cellules ES. Au final, le croisement des souris issues de cette fusion et exprimant les chaînes lourdes et légères des anticorps humains en présence d'anticorps murins avec les souris inactivées va donner naissance à des souris pouvant à la fois produire l'anticorps humain mais incapables de produire l'anticorps d'origine murine. Il est ensuite possible d'hybrider les cellules B (productrices des anticorps) de ces souris avec des cellules « immortelles » afin de créer une nouvelle lignée cellulaire productrice de l'anticorps monoclonal humain désiré (Bellet D *et al.* 2008).

### **2.2.3.2. Technique du phage display**

Les bactériophages ou phages, sont des virus qui doivent infecter une bactérie hôte afin de se multiplier, en reproduisant leur ADN en un grand nombre de copies, puis sont libérés sous forme de particules virales comportant un assemblage de protéines virales entourant cet ADN. On peut introduire dans le génome des phages des séquences d'ADN codant les anticorps, de telle façon que ceux-ci se retrouvent joints au domaine N-terminal des protéines de surface du phage sous forme de fragments scFv et Fab. Cette technique de présentation de protéines recombinantes à la surface de phage filamenteux est appelée technique du *phage display*.

Dès le début des années 1990, les travaux de plusieurs équipes notamment celle de Greg Winter du *Medical Research Council* (Cambridge, Royaume-Uni), ont démontré qu'il est possible de constituer, grâce au *phage display*, des banques d'anticorps. Cette technique permet de produire des fragments d'anticorps monoclonaux, notamment humains, de reproduire et de simuler *in vitro* le processus de maturation des anticorps, et enfin, associée à certaines techniques de biologie moléculaire telle la réaction de polymérisation en chaîne, elle permet de modifier les anticorps afin d'en optimiser l'affinité (Hingray J, 1998).

L'ARN de lymphocytes B est transcrit en ADN complémentaire (ADNc). Les ADNc codant les anticorps sont alors spécifiquement amplifiés par PCR et fusionnés avec la protéine de surface pIII du bactériophage filamenteux M13. Cette protéine pIII est responsable de l'attachement du bactériophage sur le pilus F des bactéries *Escherichia coli* mâles. Les cellules bactériennes sont ensuite infectées par un phage et l'ADN des phages recombinants est encapsidé. Après multiplication, de nouveaux phages sont alors produits en dizaines de millions d'exemplaires et présentent les fragments d'anticorps à leur surface. Les bactériophages exprimant les fragments d'anticorps dirigés contre la molécule cible sont sélectionnés et isolés par des cycles répétés d'adsorption/élution. L'obtention de ligands spécifiques à partir de larges répertoires exprimés à la surface de phages, nécessite plusieurs tours de sélection et d'amplification. Les sélections s'effectuent souvent à l'aide d'une molécule d'intérêt purifiée, et sont typiquement composées d'une étape d'adsorption, fixation des phages sur la cible ; de lavages, afin d'éliminer les phages non spécifiques ; et une étape d'élution au cours de laquelle les phages fixés sont récupérés (*figure n°8*).



*Figure n°8 : technique de sélection du phage display*

Les fragments d'anticorps dirigés contre la molécule cible sont ensuite greffés aux séquences de parties constantes d'une Ig humaine (obtenues par souris transgénique).

La construction de bibliothèques de fragments d'anticorps est donc réalisable à la surface du phage M13. D'autre part, outre des fragments d'anticorps (Fv, Fab, ScFv), le phage peut également présenter à sa surface des anticorps complets.

### **2.2.3.3. Production d'anticorps par des plantes transgéniques**

Les anticorps sont des protéines de défense produites exclusivement par les mammifères. La synthèse d'anticorps par les plantes est réalisable par la création d'un organisme génétiquement modifié, c'est-à-dire l'introduction du gène d'intérêt dans la plante.

Les plantes peuvent être régénérées assez facilement à partir d'une cellule somatique. La cellule végétale est donc apparue comme l'unité fondamentale dans le processus de la création d'une lignée de végétaux transgéniques. En revanche, la paroi pectocellulosique cellulaire rigide (absente chez les cellules animales) constitue un obstacle au transfert de gène, qui peut être contourné par l'utilisation des bactéries du genre *Agrobacterium*. Le principe de la transgénèse repose sur les caractéristiques du plasmide Ti natif portée par *Agrobacterium tumefaciens* qui est alors utilisé comme vecteur. Le plasmide natif subit une modification génétique : les gènes ONC (Auxine, Cytokinine et Opine), gènes possédant des fonctions oncogènes pour les cellules végétales, sont supprimés et remplacés par le gène d'intérêt. Dans un deuxième temps, la bactérie porteuse du vecteur est mise au contact de la plante (une blessure est réalisée sur la plante afin de permettre l'infection). Les amas de cellules sont cultivés sur un milieu sélectif (permettant de mettre en évidence la présence ou l'absence du gène de sélection). Seules les cellules transformées proliféreront et formeront des cals (amas de cellules végétales). Les cals sont alors cultivés dans des conditions permettant la régénération d'une plante complète : la plante transgénique est obtenue (Weidner M et Furelaud G, [www.snv.jussieu.fr](http://www.snv.jussieu.fr)).

Les plantes transgéniques sont capables de synthétiser de nombreuses protéines recombinantes complexes, en particulier des anticorps. De plus, il a été démontré que l'usage de ces molécules recombinantes à visées thérapeutiques ne présente aucun risque de contamination par des agents pathogènes animaux dangereux pour la santé humaine, qu'il s'agisse de virus ou de prions. En effet, il n'y a pas de virus pathogènes pour l'homme connus pour se développer dans les cellules végétales.

Le principal frein à une utilisation plus généralisée du système végétal pour la production d'anticorps résulte du fait que les plantes produisent des molécules dont la glycosylation n'est pas toujours compatible avec une application thérapeutique chez l'homme.

Des travaux ont permis de modifier le métabolisme glucidique de plantes de tabac transgénique. Ainsi remaniées, ces plantes ont ensuite été croisées avec des plantes transgéniques exprimant un anticorps. L'analyse de l'anticorps produit par des plantes de tabac issues de ce croisement a montré que la molécule recombinante présente une glycosylation partiellement humanisée (Tekoah Y *et al.*, 2004).

Afin de clarifier l'appellation de ces anticorps modifiés, une nomenclature internationale a été adoptée et des suffixes ont été introduits dans leur nom : le suffixe « momab » correspond à des anticorps monoclonaux murins, « ximab » à des anticorps chimérisés, « zumab » à des anticorps humanisés et « mumab » à des anticorps humains.

#### **2.2.4. Clonage des anticorps sous forme de fragments fonctionnels**

Les anticorps ont une large surface de contact avec leur cible et une bonne reconnaissance de celle-ci mais une aire d'action limitée à la surface membranaire. Actuellement, il y a un intérêt grandissant pour des formes plus petites d'anticorps qui allieraient une large surface de contact avec la cible et une grande aire d'action allant de la surface cellulaire au domaine intracellulaire.

##### **2.2.4.1. Fragments monovalents**

Pour un usage thérapeutique, l'utilisation de fragments d'anticorps de taille réduite et d'affinité élevée est recherchée afin de faciliter l'accès de ces fragments à la tumeur et la pénétration intratumorale ou intracellulaire. En effet, les immunoglobulines entières possèdent une taille trop importante (150 K) pour permettre un bon ciblage *in vivo* des tumeurs. En revanche, les fragments monovalents possèdent des affinités relativement réduites dues à leur site unique de liaison. L'augmentation de la valence des fragments d'anticorps permet d'accroître leur affinité grâce au phénomène d'avidité.

L'hydrolyse d'une molécule d'anticorps par la papaïne conduit à la formation de deux fragments Fab (50 K) comportant le site de liaison à l'antigène (*fragment antigen-binding*) et d'un fragment Fc (50 K, *fragment cristallisable*), alors que l'hydrolyse par la pepsine conduit à la formation d'un seul fragment Fab'2 où les deux fragments Fab restent liés par deux ponts disulfures et le fragment Fc est scindé en plusieurs peptides. Les fragments Fab et Fab'2 ont la capacité de se lier aux antigènes mais le fragment Fab'2 se lie avec une plus grande affinité.

Les fragments Fv (domaine VH associé à un domaine VL, 25K) sont rarement utilisés car n'étant pas reliés par une liaison covalente, ils se dissocient facilement à faible concentration. Ces fragments peuvent être stabilisés par un peptide de liaison qui relie artificiellement le domaine VL au domaine VH (*figure n°9*). Ce fragment, appelé scFv pour *single chain Fv*, a généralement la même affinité que le fragment Fv. L'immunogénicité des fragments scFv est faible et ils présentent une grande capacité à diffuser dans les tissus. Toutefois, il semble que ces molécules aient une demi-vie très courte lorsqu'elles sont administrées à l'animal, leur élimination par voie rénale étant très rapide (Pelegriin A *et al.*, 2000).



Plus récemment, il est apparu possible d'utiliser un seul domaine variable (12 à 15 K) pour générer une bonne affinité et spécificité. Ce type de fragment est alors appelé sdAb (*single domain antibody*).

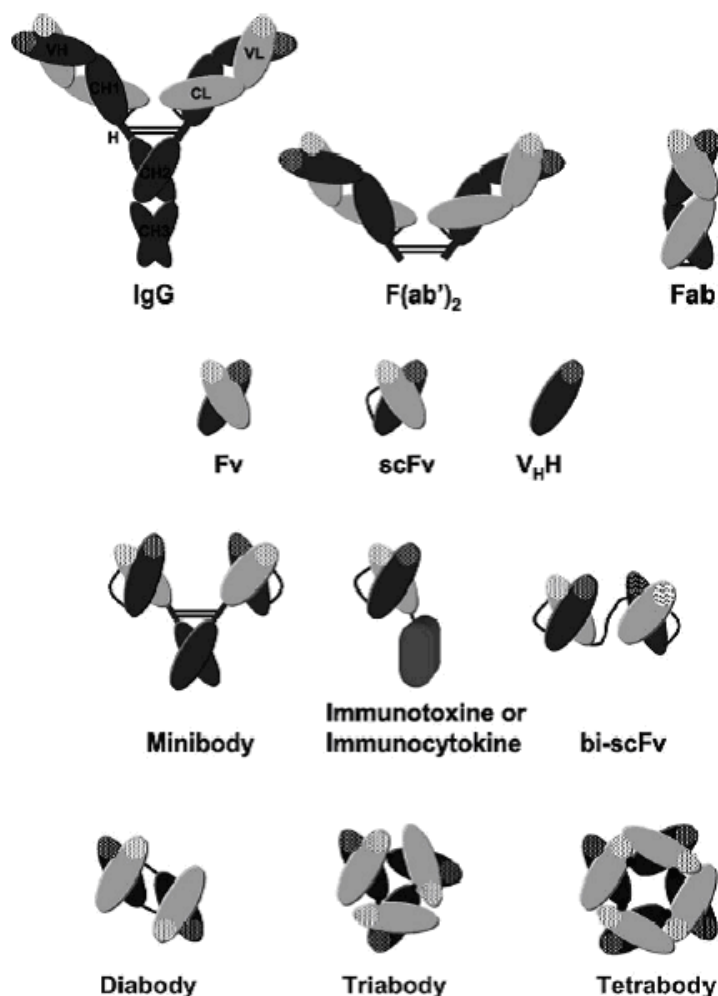
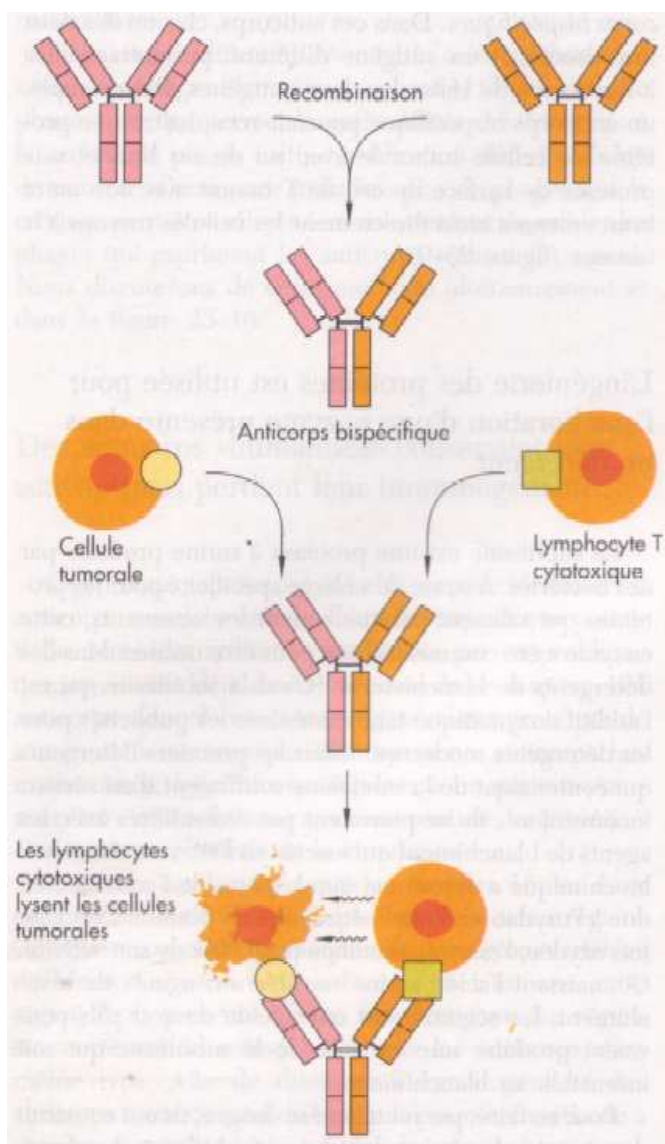


Figure n°9 : fragments monovalents et bivalents d'anticorps (Pelegri A et al., 2000)

#### 2.2.4.2. Fragments multivalents et multispécifiques

La petite taille des fragments scFv permet de les utiliser comme unité de base pour construire des molécules plus élaborées. Il est ainsi devenu aisé de produire des anticorps bivalents (présentant deux sites de liaison contre le même épitope) ou bispécifique (capables de se lier de façon simultanées à deux antigènes différents). Les anticorps bispécifiques (*figure n°10*) sont obtenus par simple liaison de deux fragments scFv par un peptide de liaison (tandem scFv). L'équipe de Greg Winter a démontré la possibilité de créer des molécules bispécifiques (diabodies) voire même trispécifiques (triabodies) et plus compactes en raccourcissant le

peptide de liaison, forçant ainsi la dimérisation ou la trimérisation de la molécule sous la forme d'une molécule compacte (*figure n°9*).



*Figure n°10 : anticorps bispécifique*

### 2.2.5. Les anticorps couplés

Des propriétés additionnelles peuvent être conférées aux anticorps monoclonaux thérapeutiques par couplage à des agents actifs tels que des toxines, des radioisotopes, des agents biologiques, des drogues ou encore des enzymes (Teilaud JL, 2000). L'efficacité thérapeutique repose alors principalement sur l'agent couplé, l'anticorps jouant le rôle de vecteur pour guider l'agent vers la cible. Cependant, l'utilisation de couplage des anticorps à des drogues rencontre de nombreuses difficultés : la dégradation des drogues par les lysosomes après endocytose et la résistance à la chimiothérapie par les cellules tumorales.

### **2.2.5.1. Les immunodrogues et immunotoxines**

Dès la découverte de la possibilité de produire des anticorps monoclonaux de spécificité prédéfinie en quantité pratiquement illimitée, est apparu l'idée d'utiliser ces anticorps comme vecteur (l'anticorps va permettre l'adhésion aux cellules) de médicaments cytotoxiques ou de toxines.

De nombreux agents antimétaboliques ont été couplés à des anticorps monoclonaux (adriamycine, bléomycine, mitomycine, méthotrexate, 5-FU, vindésine...). La difficulté réside dans la standardisation de l'activité cytotoxique obtenue. Des résultats discordants ont été observés, tant *in vitro* qu'*in vivo*, sur les possibilités de vectorisation spécifique d'une activité antimétabolique. L'adriamycine a été particulièrement étudiée sur des modèles cellulaires pour conclure à la nécessité de vectoriser un très grand nombre de molécules (jusqu'à  $2 \cdot 10^7$  par cellule) pour obtenir une activité cytotoxique. Cela est sans doute un fait limitant, d'autant plus que les possibilités de vectorisation *in vivo* sont rendues complexes du fait de problèmes d'accessibilité vasculaire et d'hétérogénéité de l'expression antigénique. Il faut de plus que la molécule soit internalisée pour exercer son activité.

De façon à pallier cet inconvénient, l'utilisation de toxines a également été explorée. Les toxines dérivées des plantes ou des bactéries (les plus utilisées sont la ricine, la toxine diphtérique et l'abrine) sont des protéines possédant habituellement un domaine de fixation non spécifique aux cellules et un domaine capable d'inhiber la synthèse protéique. En remplaçant le domaine de fixation non spécifique de la toxine par un anticorps, la toxine peut être dirigée spécifiquement vers des cellules tumorales. Après liaison à la surface de la cellule, le complexe anticorps-toxine est internalisé dans des vésicules et les compartiments de l'appareil de Golgi où la présence d'un pH faible facilite la protéolyse de la toxine. La sous-unité toxique est transportée vers le cytosol de la cellule. Dans le cytosol, le domaine catalytique de la toxine peut modifier le facteur d'élongation 2 ou inactiver l'ARN ribosomiale 28S, et de cette manière, inhiber la synthèse protéique indispensable à la survie de la cellule (Guillaume T, 1998 ; Thrush GR *et al.*, 1996).

Actuellement, un anticorps monoclonal, trastuzumab, couplé à une toxine, DM1 dérivé maytansine, est en cours de développement clinique et paraît prometteur.

### **2.2.5.2. Les radioisotopes**

Le principal avantage potentiel des radionucléides couplés aux molécules d'anticorps, par rapport aux toxines et aux agents médicamenteux, est qu'ils peuvent irradier efficacement des cellules tumorales voisines de celles sur lesquelles ils sont fixés mais qui n'expriment pas l'antigène tumoral spécifique de l'anticorps radiomarqué. En effet, l'expression d'un antigène

associé à un type particulier de tumeur est très hétérogène et varie d'une cellule à l'autre dans une même tumeur. Certaines cellules ont une densité importante de molécules d'antigène à leur surface, tandis que d'autres en sont dépourvues. Une toxine ou une drogue médicamenteuse doit être internalisée dans la cellule tumorale pour y produire son action cytotoxique. Elle doit auparavant être fixée à la surface de la cellule par l'intermédiaire de la molécule d'immunoconjugué. Quand une cellule tumorale n'exprime pas l'antigène, elle ne peut fixer l'immunoconjugué et la toxine ou la drogue ne peut avoir aucune action sur cette cellule qui va poursuivre sa prolifération. Tel n'est pas le cas du radionucléide qui, à partir de sa source d'émission (molécule de radio-immunoconjugué fixée sur l'antigène surfacique d'une cellule tumorale), peut irradier des cellules voisines n'exprimant pas l'antigène, sur une distance qui correspond au parcours maximal de son rayonnement particulaire (Douillard JF and Chatal JF, 1998).

Le profil d'activité et de tolérance d'un anticorps radiomarqué est déterminé par les caractéristiques de l'anticorps monoclonal vecteur (affinité pour l'antigène cible, paramètres de distribution et d'élimination), la sélection et le mode de couplage du radioélément (type et énergie de l'émission, période physique, parcours du rayonnement émis, labilité de la liaison entre le radio-isotope et l'immunoglobuline), le type de tumeur ciblée (radiosensibilité, expression de l'antigène), l'expression de l'antigène sur les tissus sains et sa présence libre circulant.

Compte tenu de la toxicité des radiations, la radio-immunothérapie se pratique généralement en une seule séance. D'autre part, il apparaît souhaitable que le radio-conjugué soit éliminé rapidement afin d'éviter toute sur-exposition toxique. C'est une des raisons qui conduit à utiliser des anticorps monoclonaux d'origine murine qui ont des demi-vies d'élimination plus courtes (quelques jours) que celles des anticorps chimériques ou humanisés. Les anticorps murins ont moins d'affinité pour le récepteur FcRn, exprimé notamment sur les cellules endothéliales, que les anticorps présentant un fragment Fc humain.

Concernant le radio-isotope, plusieurs types de rayonnement sont utilisables à des fins thérapeutiques (alpha, bêta moins, Auger). Actuellement, c'est le rayonnement bêta moins qui suscite le plus d'intérêt. Compte tenu de son parcours (quelques millimètres), le rayonnement bêta moins apparaît adapté pour le traitement de tumeurs volumineuses et/ou mal vascularisées. A ce jour, deux radioéléments sont utilisés, l'yttrium 90 ou  $^{90}\text{Y}$  (émetteur pur de rayonnement bêta moins) et l'iode 131 ou  $^{131}\text{I}$  (émetteur bêta moins et gamma). Le rayonnement bêta moins émis par  $^{131}\text{I}$  est plus faible en termes d'énergie maximale que celui de  $^{90}\text{Y}$  (0,606 versus 2,3 MeV) et présente un parcours moyen plus court dans les tissus mous (1 mm versus 3,6 mm). Le rayonnement gamma permet la réalisation d'une image de type scintigraphique, et donc de vérifier la distribution de l'anticorps radiomarqué dans l'organisme, mais nécessite des mesures de protection de l'entourage du patient. Le couplage de  $^{131}\text{I}$

s'effectue par halogénéation directe des résidus tyrosine de l'IgG (cas du tositumomab ou Bexxar®). L'<sup>90</sup>Y nécessite l'utilisation d'un chélateur comme le tiuxetan dans le cas de l'ibritumomab. L'utilisation du rayonnement bêta moins pourrait être intéressante pour le traitement, à l'échelle cellulaire, de micrométastases ou de cancers disséminés (leucémies).

De nombreux essais cliniques ont été menés chez des patients atteints de différents types de cancer (leucémies, lymphomes, sein, ovaire, côlon, prostate, gliomes). La radio-immunothérapie s'est principalement intéressée à la prise en charge des lymphomes non hodgkiniens compte tenu de leur radiosensibilité (Leveque D et al., 2005).

Pour les tumeurs solides, plus radiorésistantes, l'efficacité de la radio-immunothérapie n'a pas été clairement démontrée (Kraeber-Bodere F *et al.*, 2003).

### **2.2.5.3. Les abzymes**

Une autre application de la technologie des anticorps monoclonaux est la génération d'abzymes (*antibody-enzyme*), c'est-à-dire des anticorps qui se comportent comme des enzymes pour catalyser des réactions chimiques. Les anticorps et les enzymes ont en commun la capacité de reconnaître des structures moléculaires et de former avec elles des complexes spécifiques. L'enzyme est un catalyseur qui augmente de manière remarquable la vitesse d'une réaction chimique réalisée sur le substrat avec lequel elle s'est complexée. Le but de cette fusion est d'associer la capacité de reconnaissance des anticorps à l'activité catalytique des enzymes.

Historiquement, la première approche pour produire des abzymes repose sur le concept énoncé par L. Pauling selon lequel certains anticorps pourraient posséder une activité enzymatique. La grande majorité des abzymes a été produite par immunisation à l'aide d'haptènes qui sont des analogues stables d'états de transition de réactions chimiques. En 1986, A. Tramontano a produit des anticorps monoclonaux hydrolysant les liaisons esters en utilisant comme haptène une molécule de l'état de transition de l'hydrolyse des esters carboxyliques (Tramontano A *et al.*, 1986). La même année, S.J. Pollack a produit un anticorps monoclonal murin de forte affinité pour l'analogue de l'état de transition p-nitrophénylphosphorylcholine. Cet anticorps catalysait l'hydrolyse de la liaison carbonate (Pollack SJ *et al.*, 1986).

Si l'approche initiale dans la genèse d'anticorps catalytique avait essentiellement pour objet de produire des biocatalyseurs utilisables en synthèse organique, l'évolution dans ce domaine tend vers une approche plus biologique, avec le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Cette évolution est en partie liée à la découverte d'anticorps catalytiques naturels présents dans certaines pathologies et en particulier les maladies auto-immunes. Les premiers abzymes décrits chez l'homme ont été isolés chez des patients asthmatiques et clivaient le peptide intestinal vasoactif (Paul S. *et al.*, 1989). Des anticorps hydrolysant l'ADN et

l'ARN ont été isolés à partir du sérum de patients atteints de différentes maladies auto-immunes systémiques : lupus érythémateux disséminé, sclérodermie, polyarthrite rhumatoïde ou sclérose en plaque (Shuster A.M. *et al.*, 1992 ; Baranovski AG *et al.*, 2001).

Des applications thérapeutiques ont été proposées pour les abzymes, comme par exemple la possibilité de faire produire par le système immunitaire d'un malade souffrant d'une déficience enzymatique son propre médicament, à savoir des anticorps possédant l'activité enzymatique manquante. Une application principale consiste en l'activation ciblée de molécule cytotoxique pour le traitement de cellules tumorales. La stratégie de l'ADAPT (Antibody directed abzyme prodrug therapy) consiste à construire des anticorps bi-spécifiques, une moitié reconnaissant spécifiquement des marqueurs présents à la surface de cellules tumorales, l'autre moitié possédant une activité catalytique naturellement absente dans l'organisme, mais capable d'activer une molécule non toxique en molécule cytotoxique au contact de la cellule tumorale (Shabat D *et al.*, 2001).

Malgré des résultats cliniques parfois présentés comme exceptionnels, de nombreuses caractéristiques pharmacocinétiques restent à déterminer. Des études pharmacocinétiques et quelques études évaluant la relation « concentration-effets » ont été réalisées, mais sont parfois relativement légères de sorte que les modalités optimales d'utilisation des anticorps monoclonaux (doses utilisées, fréquences d'administration, durée de traitement) sont finalement assez mal précisées.

### **3. Propriétés pharmacocinétiques des anticorps monoclonaux**

#### **3.1. Administration**

Les anticorps monoclonaux sont administrés par voie intraveineuse ou par voie intramusculaire. La voie sous-cutanée, la voie intrapéritonéale et la voie intralympatique ont été utilisées lors d'essais thérapeutiques (Bowen AL *et al.*, 1997).

La cible est constituée par une protéine circulante dans le sang ou la lymphe (par exemple : le facteur tumoral nécrotique  $\alpha$  pour l'infliximab) ou bien une protéine cellulaire, elle-même circulante et/ou localisée à certains organes (par exemple : CD20 lymphocytaire pour le rituximab, HER2 de cellule tumorale mammaire pour le trastuzumab).

#### **3.2. Distribution**

La phase de distribution apparaît déterminante pour les anticorps à visée tissulaire c'est-à-dire les anticorps utilisés en oncologie. Globalement, les anticorps monoclonaux diffusent mal et de manière hétérogène dans les tumeurs.

La distribution dépend de la physiologie tumorale et des caractéristiques de l'anticorps. Des paramètres liés à la vascularisation de la tumeur (perméabilité, débit sanguin), la différence de pression observée entre le capillaire tumoral et le liquide interstitiel semblent déterminer la distribution tumorale (Sands H *et al.*, 1998). Le principal facteur limitant la diffusion tumorale des anticorps apparaît être l'affinité pour l'antigène membranaire cible et l'intensité de l'expression antigénique. La masse moléculaire peut également constituer un facteur limitant. Les fragments Fab (50 K) ou scFv (25 K) présentent une diffusion plus rapide et plus homogène que l'anticorps entier (150 K) (Yokota T *et al.*, 1992). Néanmoins, l'utilisation des fragments Fab est limitée par leur demi-vie d'élimination courte (inférieure à 12 heures) et par l'absence du fragment Fc impliqué dans l'activité cytotoxique. Compte tenu de leur rapide élimination, la fraction captée par la tumeur se révèle être inférieure à celle d'une IgG. Buist *et al.* (Buist MR *et al.*, 1993) ont étudié la cinétique tumorale d'un anticorps monoclonal radiomarqué dirigé contre un antigène de carcinome ovarien chez neuf patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire. La fraction de la dose injectée captée par la tumeur était de 5,8 %/kg (écarts : 2,2-13) pour l'IgG *versus* 0,9 %/kg (écarts : 0,4-2,3) pour le fragment Fab<sup>2</sup>. Des études effectuées avec la doxorubicine, le cisplatine, le paclitaxel, la vinblastine notamment ont montré une mauvaise diffusion tumorale (Lankelma J *et al.*, 1999 ; Tunggal JK *et al.*, 1999 ; Tannock IF *et al.*, 2002). Les agents anticancéreux diffusent théoriquement mieux que les anticorps monoclonaux (masse moléculaire largement inférieure, pas d'affinité spécifique pour la membrane néoplasique). Leur distribution limitée est probablement liée à la mauvaise vascularisation

tumorale (distance importante entre le capillaire sanguin et certaines zones tumorales) comparée au tissu sain.

Les approches destinées à optimiser la diffusion tumorale donc l'activité cytotoxique des anticorps monoclonaux sont multiples. Les recherches se portent sur les fragments Fab et Fab'2 couplés à des molécules de polyéthylène glycol (Chapman AP, 2002). La pégylation est destinée à augmenter la demi-vie d'élimination par blocage de la filtration glomérulaire. L'inconvénient de la pégylation est la diminution possible de la liaison à l'antigène lié à l'encombrement stérique. Des travaux précliniques ont mis en évidence une amélioration de l'activité cytotoxique par l'utilisation d'anticorps polymériques (rituximab homodimérique) (Ghetie MA *et al.*, 2001) ou de mélange de trois IgG monoclonales ciblant différents épitopes (sites de liaison) de la protéine HER2 (Spiridon CI *et al.*, 2002). Néanmoins, la dimérisation entraîne une affinité supérieure vis-à-vis de l'antigène (Wolff EA *et al.*, 1993) et risque ainsi de limiter la diffusion tumorale. Cela souligne les difficultés à optimiser la liaison à l'antigène, l'activité cytotoxique, la diffusion tissulaire et les paramètres d'élimination.

Le passage de la barrière hématoencéphalique a été abordé avec le trastuzumab. Les concentrations évaluées simultanément dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien, chez une patiente, montrent un très faible passage de l'anticorps monoclonal (212 ng/mL dans le liquide céphalo-rachidien *versus* 70 326 ng/mL dans le sérum) (Pestalozzi BC and Bignoli S, 2000).

### **3.3. Élimination**

Très peu de données sont disponibles sur les voies d'élimination des anticorps monoclonaux. Les monographies des spécialités commercialisées ne mentionnent aucune donnée hormis la valeur de la demi-vie terminale. Par analogie aux IgG endogènes, les anticorps monoclonaux semblent être catabolisés dans les cellules du lit vasculaire (cellules endothéliales). Les IgG endogènes sont les protéines plasmatiques qui présentent la demi-vie d'élimination la plus longue, environ trois semaines. Cette longue demi-vie est liée à un récepteur saturable appelé FcRn situé dans les cellules endothéliales, les cellules intestinales et rénales (Ghetie V and Ward ES, 2000 ; Israel EJ *et al.*, 1997 ; Kobayashi N *et al.*, 2002). Le récepteur FcRn possède deux propriétés : le passage transcellulaire et le recyclage cellulaire. Ce récepteur participe également au recyclage des IgG. Après fixation au récepteur, les anticorps sont internalisés dans la cellule endothéliale et ainsi protégés de la dégradation lysosomale jusqu'à leur recyclage à la surface de la cellule, qui permet leur relargage dans la circulation sanguine. Une réactivité différente des IgG1 murines avec le FcRn humain, associée à la formation d'anticorps neutralisants (HAMA), explique probablement la différence de demi-vie observée à la suite de l'administration à l'homme d'anticorps murins (moins de 7 jours) et humains (20 jours environ).



Les IgG non liées aux récepteurs FcRn dans les vésicules de pinocytose (les IgG en excès) sont transférées vers des lysosomes pour être dégradées.

La présence du récepteur FcRn au niveau intestinal et rénal chez l'homme laisse envisager un passage transcellulaire des IgG au niveau de ces organes. L'élimination urinaire d'un anticorps monoclonal radiomarqué administré à 22 patientes représentait 22 % de la dose injectée. L'excrétion rénale des anticorps monoclonaux actuellement commercialisés n'est pas documentée sinon de manière indirecte. Par exemple, l'insuffisance rénale ne semble pas avoir d'impact sur l'élimination du trastuzumab (McKeage K and Perry CM, 2002).

### **3.4. Paramètres pharmacocinétiques**

La cinétique des anticorps monoclonaux suit une décroissance des concentrations en fonction du temps de type mono- ou biexponentielle. Les anticorps monoclonaux sont caractérisés par une demi-vie d'élimination terminale longue (entre 8 et 28 jours) et par un faible volume de distribution variant entre 3 et 20 L (Saez-Llorens X *et al.*, 1998).

### **3.5. Pharmacodynamie**

Des relations pharmacodynamiques (par exemple relation entre un paramètre cinétique et la réponse clinique généralement pour un dosage donné) ont été recherchées.

Une relation positive a été observée chez 166 patients atteints de lymphomes non Hodgkiniens de bas grade, entre les concentrations sériques médianes de rituximab et la réponse clinique évaluée à différents moments (de la 2<sup>e</sup> cure jusqu'à 3 mois après le traitement) (Berinstein NL *et al.*, 1998). En revanche, d'après Igarashi *et al.* (Igarashi T *et al.*, 2002), la concentration résiduelle de rituximab mesurée avant la 3<sup>e</sup> injection serait un facteur affectant la survie sans progression mais non la réponse objective chez les patients atteints de lymphomes non Hodgkiniens. Aucun lien n'a été observé entre les concentrations plasmatiques de gemtuzumab ozogamicin et la réponse antitumorale chez 59 patients (Dowell JA *et al.*, 2001).

### **3.6. Variabilité cinétique**

Pour certains anticorps monoclonaux, la fixation sur la cible cellulaire s'accompagne d'une internalisation du complexe « anticorps – récepteur ». Il peut s'ensuivre une dégradation lysosomale de l'anticorps qui, cette fois, n'est pas protégé du catabolisme, ou encore une down-régulation du récepteur, réduisant ainsi progressivement les possibilités de fixation de l'anticorps. Ainsi, la non-linéarité pharmacocinétique décrite pour certains anticorps s'explique par cette phase d'élimination antigène-dépendante, saturable (Mould DR *et al.*, 2007). Pour le

cétuximab par exemple, la clairance est très élevée aux doses faibles, puis diminue avec l'augmentation des doses et se stabilise à une valeur constante correspondant à la saturation des récepteurs à l'EGF. Ces observations ont conduit à opter, s'agissant du kétuximab mais aussi d'autres anticorps comme le panitumumab et le trastuzumab pour des modalités d'administration impliquant une dose de charge suivie d'un schéma d'entretien. Cette non-linéarité pharmacocinétique n'est cependant pas retrouvée pour tous les anticorps monoclonaux, et notamment en onco-hématologie pour le rituximab et le bévacizumab. L'administration de ces anticorps s'accompagne en effet d'une diminution totale et très précoce de leurs cibles, respectivement les lymphocytes CD20 et le VEGF, ce qui explique que la phase de saturation ne soit pas apparente.

Une variabilité pharmacocinétique interindividuelle existe pour les anticorps monoclonaux, au même titre que pour les médicaments classiques. Les facteurs en cause pourraient être des paramètres relatifs à la masse tumorale ou à l'apparition d'anticorps neutralisants (Cartron G *et al.*, 2007 ; Ternant D *et al.*, 2005). Cette variabilité pharmacocinétique pourrait être importante à prendre en compte, afin de modifier la posologie, lorsqu'une relation « exposition – effets » a été mise en évidence.

### **3.7. Conséquences de la variabilité cinétique**

L'importante variabilité cinétique des anticorps monoclonaux pourrait amener à reconsidérer les posologies. Les schémas posologiques des anticorps monoclonaux sont hétérogènes. Les doses sont fixes (alemtuzumab), normalisées au poids (trastuzumab) ou bien à la surface corporelle (rituximab, ozogamycine gemtuzumab). Concernant le trastuzumab, les premiers essais ont été menés à dose fixe avant de passer, sans justification, à une posologie adaptée au poids. Les intervalles d'injection varient entre 1 jour et 8 semaines. Pour les doses normalisées, le choix de l'expression posologique (poids ou surface corporelle) apparaît arbitraire. La normalisation des posologies au poids est contestable pour un anticorps monoclonal. Compte tenu de leur masse moléculaire élevée, ces molécules diffusent peu et ont un volume de distribution faible correspondant au volume sanguin ; celui-ci est directement corrélé à la surface corporelle et non au poids. L'adaptation à la surface corporelle serait théoriquement plus licite. Néanmoins, la variabilité cinétique des anticorps monoclonaux apparaît supérieure à la variabilité de la surface corporelle observée chez l'adulte (10 à 15 %). En l'absence de données montrant un impact du poids ou de la surface corporelle sur la clairance systémique, la posologie devrait être fixe. Cette démarche éviterait les erreurs de calculs de doses et favoriserait l'utilisation de conditionnements entiers. Une alternative à la dose fixe ou normalisée pourrait être l'adaptation posologique au volume de la masse tumorale comme cela a été suggéré pour le rituximab.

Les propriétés cinétiques des anticorps monoclonaux sont marquées par une diffusion tissulaire restreinte, une élimination lente et une importante variabilité. L'excrétion rénale comme possible voie d'élimination reste à explorer. Pour certains anticorps (alemtuzumab), la connaissance des paramètres cinétiques (demi-vie) n'apparaît pas être prise en compte pour la détermination des fréquences d'administration. Des données plus approfondies sur le trastuzumab (demi-vie de 28,5 jours, faible impact du poids sur la clairance) justifient la modification du schéma actuel d'administration avec un espacement des injections.

Des études visant à évaluer l'impact des caractères morphométriques sur les paramètres d'élimination devraient être menées, *a priori*, afin de mieux définir les schémas posologiques. De plus, les relations entre l'expression de la cible, les paramètres cinétiques et la réponse clinique pourraient être recherchées afin d'optimiser l'activité.

## **4. Utilisation des anticorps monoclonaux dans le traitement des tumeurs solides**

Pour traiter les cancers, les oncologues ont disposé jusqu'alors de trois moyens : la chirurgie, la radiothérapie, et la chimiothérapie. De nombreux anticancéreux classiques donnent des taux de réponse et une augmentation de la survie acceptable, ainsi qu'une amélioration de la qualité de vie des patients. Cependant, ils sont généralement non sélectifs, induisant autant une cytotoxicité des cellules normales que des cellules cancéreuses, et ont donc souvent une mauvaise tolérance. Avec le développement de nouveaux agents anticancéreux, le but est de cibler des lésions moléculaires spécifiques des cellules tumorales afin d'augmenter le taux de guérison et de réduire la cytotoxicité des cellules normales. Dans ce contexte, l'un des développements les plus intéressants dans le domaine des thérapies anticancéreuses est celui des anticorps monoclonaux, dont l'efficacité clinique est maintenant prouvée.

### **4.1. La pathologie : le cancer**

Lorsque les mécanismes normaux de régulation n'ont plus d'effet sur la division des cellules, celles-ci se reproduisent de façon excessive et donnent naissance à une masse anormale appelée néoplasme, « nouvelle croissance ». On distingue les néoplasmes bénins et les néoplasmes malins. Un néoplasme bénin, souvent appelé tumeur, est strictement localisé. Ces néoplasmes compacts, souvent encapsulés, ont une croissance plutôt lente et tuent rarement leur hôte si on les retire avant qu'ils ne compriment un organe vital. En revanche, les néoplasmes malins (cancéreux) sont des masses non encapsulées à croissance très rapide, qui peuvent être mortelles. Leurs cellules ne sont pas aussi différenciées que celles du tissu dans lequel elles prolifèrent ; elles ont, entre autres, un rapport noyau/cytoplasme fort élevé et des nucléoles très apparents. Des cellules malignes peuvent également se détacher de la masse d'origine, nommée tumeur primitive, traverser la lame basale du tissu auquel elles appartiennent et suivre les voies sanguines ou lymphatiques pour atteindre d'autres organes où elles forment des masses cancéreuses secondaires. C'est cette capacité à créer des métastases et à envahir l'organisme qui distingue les cellules cancéreuses des néoplasmes bénins. Les cellules cancéreuses consomment de très grandes quantités de nutriments, ce qui entraîne une perte de poids et une diminution de la masse des tissus, lesquelles contribuent à la mort (Marieb EN, 1999).

#### **4.1.1. Mécanismes génétiques de la carcinogenèse**

Il est bien connu que certains facteurs physiques sont cancérigènes (rayonnement, traumatisme d'origine mécanique), de même que certaines infections virales (par exemple virus de l'hépatite B et C et cancer du foie, virus d'Epstein-Barr et lymphome de Burkitt) et de nombreuses substances chimiques (goudrons du tabac, certains produits chimiques naturellement présents dans les aliments). Le point commun de tous ces facteurs est qu'ils provoquent des mutations, c'est-à-dire des modifications de l'ADN qui altèrent l'expression de certains gènes, gènes qui jouent un rôle capital dans la croissance cellulaire. Cependant, les cancérigènes ne produisent pas toujours de tels dommages parce que la plupart d'entre eux sont éliminés par les enzymes des peroxysomes ou des lysosomes, ou bien par le système immunitaire. De plus, il ne suffit pas d'une seule mutation ; il faut apparemment une suite de plusieurs changements génétiques pour transformer une cellule normale en véritable cellule cancéreuse (ce qui est compatible avec le fait que l'incidence du cancer augmente avec l'âge). Ces mutations peuvent conduire à l'augmentation de l'activité d'oncogènes, la diminution de l'activité des gènes suppresseurs des tumeurs, la dysrégulation des facteurs de croissance ou de leurs récepteurs tels que la famille HER et ses ligands, aboutissant à des anomalies de la transmission du signal et la dysrégulation de protéines régulant le cycle cellulaire telles que p53. Ces mutations nocives se multiplient dans la cellule, débordant les contrôles habituels et permettant à la tumeur d'échapper aux défenses d'organisme. Elles aboutissent à diverses propriétés anormales, notamment l'aptitude à se diviser indéfiniment (immortalité cellulaire), l'insensibilité aux signaux apoptiques (absence de mort cellulaire programmée), la stimulation de l'angiogenèse (établissant un réseau vasculaire alimentant la tumeur) et l'aptitude à envahir d'autres tissus (métastases). L'association de ces processus induit une prolifération cellulaire incontrôlée ainsi que la croissance et la dissémination métastatique de la tumeur (Hanahan D and Weinberg RA, 2000).

##### **4.1.1.1. Oncogènes et anti-oncogènes**

Deux types de modifications géniques susceptibles de provoquer la cancérisation d'une cellule ont été identifiés : l'activation de certains gènes appelés oncogènes et l'inactivation d'autres gènes appelés anti-oncogènes. Les oncogènes et les anti-oncogènes, dans leur état sauvage (non muté), sont des gènes à l'origine de protéines qui gèrent le cycle cellulaire.

- Oncogènes

Les oncogènes sont les formes mutées de gènes cellulaires appelés proto-oncogènes. Les proto-oncogènes codent les protéines essentielles à la division, la croissance et l'adhérence cellulaire, entre autres. Cependant, beaucoup d'entre eux possèdent des sites fragiles qui se brisent lorsqu'ils sont exposés à des cancérigènes, ce qui en fait des oncogènes. Cette modification peut entraîner, par exemple, la perte d'une enzyme qui régit un processus métabolique important, ou bien la « mise en marche » de gènes dormants qui permettent aux cellules de devenir envahissantes et de former des métastases (les cellules de l'embryon et les cellules cancéreuses ont cette capacité, mais non les cellules normales).

- Anti-oncogènes

Les anti-oncogènes, gènes suppresseurs de tumeur, ont pour effet d'empêcher l'apparition du cancer. Ils agissent sur les mécanismes qui inactivent les cancérigènes, contribuent à la réparation de l'ADN et facilitent la destruction des cellules cancéreuses par le système immunitaire. Pour que l'inhibition des gènes anti-oncogènes soit efficace, c'est-à-dire pour que la protéine anti-oncogène frénatrice du cycle cellulaire normal ne soit plus produite au sein d'un tissu, il faut que les deux allèles de son gène soient non fonctionnels. L'inhibition des deux allèles se produit très rarement. Un allèle du gène modifié, la cellule continue de vivre et se multiplie normalement ; s'il arrive que l'autre allèle soit modifié, alors le gène de cette famille cellulaire n'exprime plus du tout la protéine frénatrice et la prolifération cellulaire n'est plus contrôlée. Plusieurs anti-oncogènes ont été détectés, tels que le gène p53, situé sur le bras court du chromosome 17, dont la mutation constitutionnelle est responsable du syndrome de Li-Fraumeni (familles où l'on observe plusieurs cas de cancers du sein, du cerveau, du foie, ou des ostéosarcomes) ; le gène APC en 5q dont l'altération germinale est responsable de la polypose adénomateuse familiale et les mutations somatiques se rencontrent essentiellement dans les cancers du colon ; les gènes BRCA1 et BRCA2, formes familiales de cancer du sein et de l'ovaire. Ces anti-oncogènes sont appelés gènes gardiens du cycle cellulaire parce qu'ils contrôlent les différentes transitions du cycle cellulaire (principalement passage G1-S) (Scotte F *et al*, 2002).

#### **4.1.1.2. Gènes de réparases**

D'autres gènes participent à la réparation de l'ADN lorsqu'il est lésé, ce sont les gènes de « réparases ». Ils contrôlent l'intégrité du génome et permettent la transmission fidèle de l'information génétique d'une cellule à sa descendance. Un déficit d'un de ces gènes entraîne l'accumulation de mutations favorisant l'apparition de cancers (Scotte F *et al*, 2002).

#### 4.1.2. Facteurs de croissance cellulaire

Les cellules cancéreuses sont particulièrement sensibles aux facteurs de croissance. Les proto-oncogènes transfèrent l'information du milieu extra-cellulaire (facteurs de croissance) vers le milieu intracellulaire jusqu'au noyau. Cette transduction du signal s'opère à travers une cascade de phosphorylations, les proto-oncogènes intervenant à toutes les étapes de ce processus. Ces gènes codent :

- les facteurs de croissance : petits peptides interagissant par des liaisons avec des récepteurs spécifiques pour transmettre un signal de croissance. Dans ce cas, la transformation maligne n'est possible que s'il existe une surexpression du récepteur ;
- les récepteurs des facteurs de croissance : ces glycoprotéines comportent un domaine extracellulaire auquel se lie le facteur de croissance, un domaine trans-membranaire, et un domaine intra-cytoplasmique avec une activité tyrosine-kinase. Ainsi l'oncogène *erbB* est identique au récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF) ; la perte du site de liaison à l'EGF entraîne l'activation permanente du récepteur qui envoie alors des signaux mitotiques ;
- les seconds messagers qui transmettent le signal d'activation génique jusqu'au noyau (protéines membranaires liant le GTP, tyrosine-kinases, kinases cytosoliques, protéines de liaison à l'ADN) (Scotte F *et al*, 2002).

#### 4.1.3. Facteurs d'apoptose et de dissémination

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée par la cellule pour s'autodétruire. Elle est déclenchée quand la cellule est incapable de réparer les altérations de l'ADN. L'apoptose est commandée par la protéine p53, protéine majeure dans l'élimination des cellules à potentiel anormal. La perte de la p53 ou des altérations ou mutations de la p53 peut aboutir à l'apparition de cellules cancéreuses. Le gène p53 régule le gène *bcl2*, qui contrôle négativement les phénomènes d'apoptose, et le gène *bax*, qui contrôle positivement l'apoptose (Scotte F *et al*, 2002).

#### 4.1.4. Les étapes de la carcinogenèse

Un cancer est cliniquement décelable quand il est constitué de  $10^9$  cellules. L'évolution d'une cellule normale vers une cellule cancéreuse, puis vers un cancer clinique, est longue et comporte plusieurs étapes, dont les premières sont réversibles. Les premiers événements concernent la formation de la tumeur proprement dite, ou cancérogenèse, tandis que les étapes

suivantes concernent l'évolution de la tumeur vis-à-vis de l'organisme : développement d'une néovascularisation et de métastases (*tableau II*).

Tableau II : les événements successifs de la carcinogénèse

<b>La cancérogenèse</b>	<b>Mécanismes possibles</b>
1. Initiation tumorale	Atteinte par un carcinogène Activation ou dérégulation d'un oncogène
2. Promotion et progression	Amplification des gènes Perte ou mutation de gènes suppresseurs (anti-oncogènes)
3. Prolifération incontrôlée	Dérégulation des signaux de croissance (synthèse, récepteurs, transmission du signal)
<b>Evolution de la tumeur dans l'organisme</b>	<b>Mécanismes possibles</b>
4. Angiogenèse	Synthèse de facteurs angiogéniques
5. Invasion locale	Facteurs entraînant la perte d'adhésivité favorisant une pousse désordonnée et la formation de foyers Facteurs entraînant la perte d'inhibition de contact
6. Circulation des cellules tumorales et arrêt dans les microvaisseaux	Agrégation des cellules tumorales Interaction avec les éléments du sang (fibrine, plaquettes, facteur de la coagulation) Interaction avec la membrane basale (laminines, collagène), enzymes lytiques
7. Formation des colonies métastatiques	Synthèse de facteurs angiogéniques Gènes suppresseurs de métastase mutés/délétés (ex. : anti-angiogènes)

L'initiation est la première phase de la cancérogenèse. Elle ne concerne qu'une seule cellule qui est ainsi « initiée » sur la voie de la cancérisation. La cellule initiée répond anormalement à son microenvironnement et possède déjà une régulation homéostatique de croissance perturbée, telle qu'une insensibilité à des signaux de facteurs inhibiteurs de croissance, de différenciation ou de mort cellulaire programmée. L'initiation est donc assimilable conceptuellement à la notion d'immortalisation.

La promotion consiste en une série d'étapes permettant à une cellule initiée d'aller jusqu'au cancer histologiquement décelable (cancer *in situ*). Les premières étapes sont réversibles. De multiples facteurs liés à l'hôte et de facteurs exogènes participent à la promotion d'une cellule initiée : immunité, hormones, facteurs de croissance. La promotion est assimilable conceptuellement à la notion de transformation cellulaire.

La progression est moins précisément définie. L'accroissement du taux de division cellulaire augmentant les risques de mutations, il y a un processus de sélection des clones les plus malins. La progression correspond à l'acquisition de l'indépendance de croissance, de



l'expression phénotypique de la malignité et d'une instabilité génétique de plus en plus marquée. Il s'agit d'une phase qui se prolonge avec le temps, par l'acquisition progressive de caractéristiques de plus en plus malignes, notamment des mécanismes biochimiques de l'invasion tumorale et de la capacité métastatique.

La dernière étape consiste en l'acquisition d'une résistance aux défenses naturelles de l'organisme (*Naturel Killer*, Lymphocytes T activés) ainsi qu'aux traitements chimiothérapeutiques ou autres (Scotte F *et al*, 2002).

#### **4.2. Mécanismes d'action généraux des anticorps monoclonaux en thérapeutique**

Il est étonnant de constater que, quel que soit l'anticorps et après une trentaine d'années de recherche expérimentale ou d'essais cliniques avec les anticorps monoclonaux, les mécanismes expliquant les effets thérapeutiques des anticorps monoclonaux restent hypothétiques. Initialement, l'hypothèse était que l'effet des anticorps était principalement dû au fragment Fc par l'intermédiaire de deux mécanismes : la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC), la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) et l'internalisation du récepteur de surface cellulaire par l'anticorps. Cette internalisation entraînerait la dégradation du récepteur et inhiberait les voies de transduction des signaux activés par le récepteur.

Le complément, ou système du complément, est un groupe de vingt facteurs plasmatiques normalement présents dans le sang sous forme inactive. Le complément constitue l'un des principaux mécanismes de destruction des substances étrangères dans l'organisme. Lorsqu'il est activé, il libère des médiateurs chimiques qui accentuent presque tous les aspects de la réaction inflammatoire. Le complément élimine aussi les cellules cibles par cytolyse. Le facteur C3 du complément peut être activé soit par la voie classique, soit par la voie alterne. La voie classique est déclenchée par la fixation des anticorps sur les cellules cibles et la fixation subséquente du facteur C1 aux complexes antigène-anticorps ; cette étape est appelée fixation du complément. Dans chacune des voies intervient une cascade de réactions conduisant à l'activation séquentielle des facteurs protéiques du complément, c'est-à-dire que chaque composant catalyse l'étape suivante. Les voies classique et alterne agissent toutes les deux sur le facteur C3 pour le cliver en deux fragments protéiques, les facteurs C3a et C3b. Cette étape amorce une voie terminale commune qui provoque la cytolyse, favorise la phagocytose et accentue la réaction inflammatoire. Cette séquence finale d'événements débute avec la fixation du C3b sur la surface de la cellule cible, ce qui entraîne l'insertion, dans la membrane plasmique de cette cellule, d'un groupe de protéines du complément dénommé complexe d'attaque membranaire. Puis, le complexe d'attaque membranaire forme un trou dans la membrane de la cellule cible et le maintient ouvert afin d'assurer la lyse. Les molécules du C3b qui se fixent à la

cellule cible deviennent des « sites de fixation » auxquels les récepteurs de la membrane plasmique des phagocytes peuvent adhérer, ce qui permet d'englober la cellule cible plus rapidement. Ce processus s'appelle opsonisation. Le C<sub>3a</sub> et les autres produits de clivage élaborés au cours de la fixation du complément accentuent la réaction inflammatoire en stimulant la libération d'histamine par les mastocytes et les granulocytes basophiles (vasodilatation et augmentation de la perméabilité capillaire).

Dans le cas de la cytotoxicité dépendante du complément, la liaison de l'anticorps monoclonal à l'antigène cible conduit à une opsonisation des cellules tumorales par les cellules phagocytaires exprimant les récepteurs du complément, à une lyse directe des cellules tumorales et à une réaction inflammatoire. Il a ensuite été suggéré que l'effet de l'anticorps serait principalement dû aux régions variables. En se liant à l'antigène cible présent à la surface des cellules tumorales, l'anticorps, par l'intermédiaire de ses régions variables, bloquerait l'accès de facteurs de croissance à leurs récepteurs ou inhiberait une cascade de signalisation intracellulaire. Le blocage du récepteur et/ou l'inhibition de la cascade conduirait à l'arrêt de la croissance cellulaire et à l'apoptose des cellules cibles.

En fait, les mécanismes observés *in vitro* pourraient être différents des multiples mécanismes responsables des effets thérapeutiques *in vivo*. À côté des mécanismes immunologiques précédemment évoqués et dirigés contre la cellule tumorale, d'autres effets des anticorps, tel qu'une activité anti-angiogénèse, pourraient jouer un rôle *in vivo*.

### **4.3. Anticorps monoclonaux non conjugués**

#### **4.3.1. Cible : les récepteurs à tyrosine kinase**

Les récepteurs à tyrosine kinase forment une importante famille de récepteurs transmembranaires présentant une activité tyrosine kinase intracytoplasmique. Ces récepteurs sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération cellulaire ou la différenciation.

La famille des récepteurs du facteur de croissance épidermique humain (HER = *human epidermal growth factor receptor*) comporte quatre membres : HER1 (ou EGFR), HER2 (ou cErB2/neu), HER3 et HER4 (*figure n°11*). Les récepteurs HER1/EGFR et HER2 interviennent dans la croissance et la différenciation des cellules normales et sont dysrégulés dans de nombreuses tumeurs humaines, ce qui suggère un rôle décisif dans la tumorigenèse (L'Allemain G. *et al.*, 2003). En conséquence, ces récepteurs sont un point clé dans le développement de nouveaux traitements ciblés du cancer.

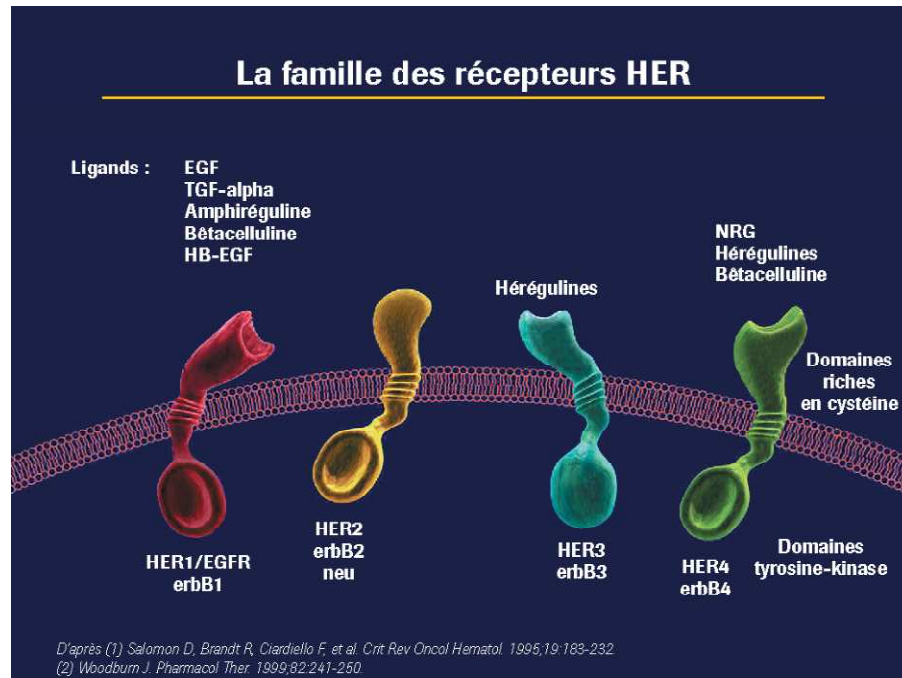
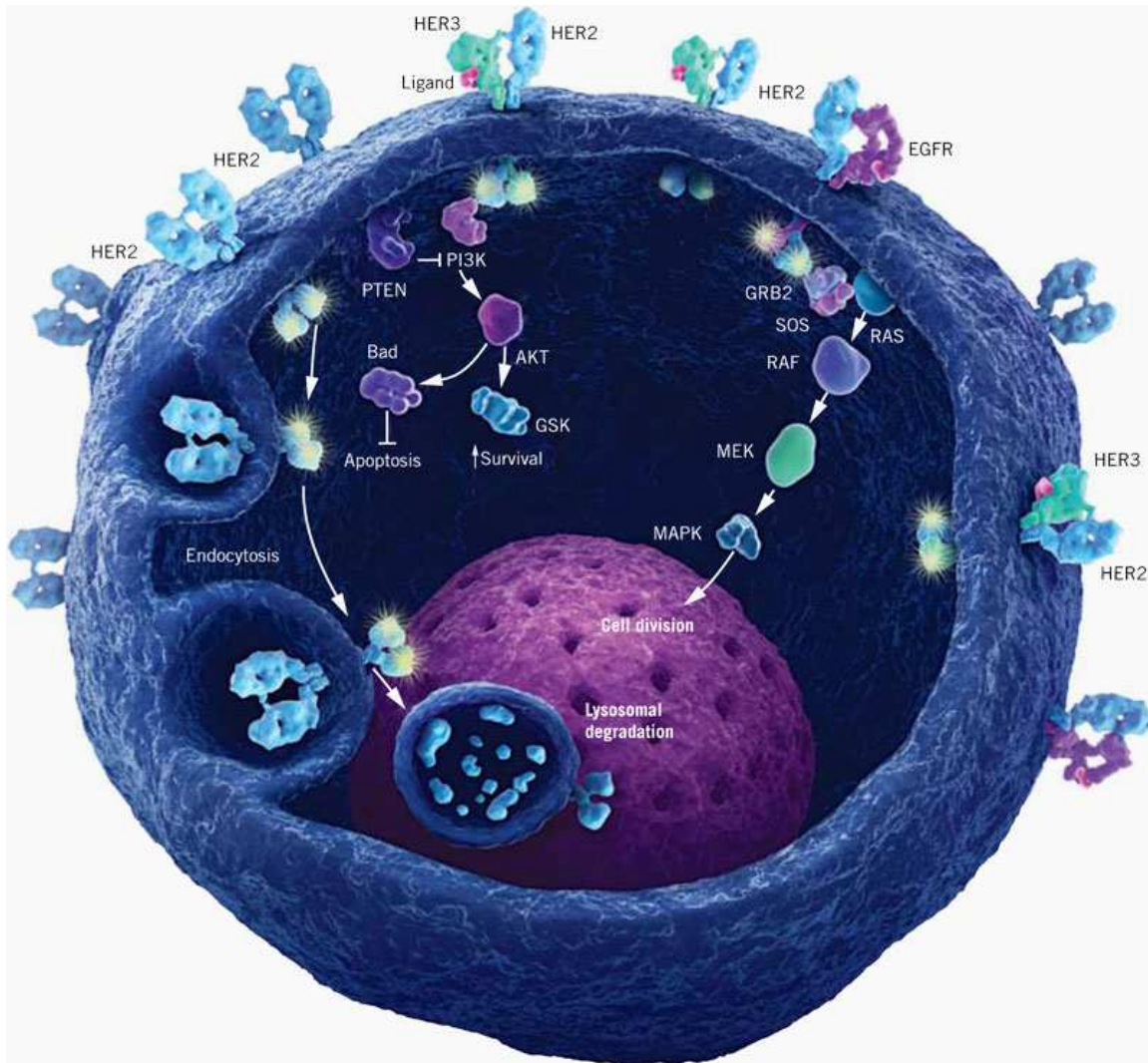


Figure n°11 : la famille des récepteurs HER (Salamon DS et al., 1995 ; Woodburn JR, 1999)

#### 4.3.1.1 Oncorécepteur HER2

Le gène HER2/*neu*, également connu sous l'appellation *neu* ou c-ErbB2, code un récepteur transmembranaire de 185 K à activité tyrosine kinase appartenant à la famille des récepteurs à tyrosine kinase (ErbB ou HER). HER2 possède une homologie partielle avec d'autres membres de la famille des récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR), appelé également HER1 ou ErbB1 (Bargmann CI *et al.*, 1986 ; Coussens L *et al.*, 1985). Le gène HER2 est situé sur le chromosome 17 dans la région 17q11.2-17q21 (Jarvinen TAH and Liu ET, 2000). Si des ligands endogènes ont été identifiés pour les autres récepteurs tels que l'EGFR (EGF, TGF $\alpha$ , HB-EGF,  $\beta$ -celluline, épériréguline, amphiréguline) (Klapper LN *et al.*, 2000), ceux du récepteur à HER2 ne sont pas encore connus (Hirsch FR *et al.*, 2002).



*Figure n°12 : mécanisme d'action de l'activité tyrosine kinase*

Comme la plupart des récepteurs à tyrosine kinase, HER2 est un récepteur transmembranaire présentant un domaine de liaison extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase. Le récepteur est exprimé à la surface de la membrane sous forme monomérique. La liaison du ligand au domaine extracellulaire induit la formation de récepteurs homo- et hétérodimères qui est essentielle à l'activation de la tyrosine kinase. L'hétérodimérisation de HER2 avec d'autres membres de la famille ErbB ainsi que l'homodimérisation de HER2 en l'absence de ligand, conduisent à l'autophosphorylation du domaine tyrosine kinase intracellulaire. Le récepteur est alors internalisé puis dégradé. Deux grandes voies de transduction du signal sont activées : la voie des MAP kinases et la voie de la PI3 kinase/AKT. Ces deux voies de transduction du signal conduisent à l'activation de protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, la migration cellulaire, la différenciation cellulaire ou bien encore la survie de la cellule (*figure n°12*).

L'oncorécepteur HER2 est surexprimé dans 20% à 30% des cancers primitifs du sein (Slamon DJ *et al.*, 1989). Il a été démontré que la surexpression de cet oncorécepteur est un facteur de mauvais pronostic (Slamon DJ *et al.*, 1987), elle est associée à une augmentation de l'agressivité de la tumeur, à la résistance de la tumeur aux traitements, à un risque augmenté de rechute et à une survie réduite (Pauletti G *et al.*, 2000). Par conséquent, limiter les conséquences de la surexpression de HER2, pour améliorer l'évolution du cancer du sein HER2+, constitue une approche thérapeutique dont l'oncorécepteur HER2 est la cible (Lewis GD *et al.*, 1993).

Il a été démontré que l'utilisation d'un anticorps monoclonal, d'origine murine au départ, dirigé contre HER2, permettait d'inhiber la croissance de tumeurs et de cellules cancéreuses présentant une surexpression de cette protéine (Baselga J *et al.*, 1996 ; Shepard HM *et al.*, 1991). Leur humanisation, par insertion d'une IgG1 humaine, a permis de réduire l'immunogénicité des anticorps murins anti-HER2 et de proposer un anticorps pour une utilisation thérapeutique : le trastuzumab. Le trastuzumab est donc un anticorps monoclonal humanisé recombinant (5% d'origine murine et 95% d'origine humaine) dirigé contre le domaine extracellulaire de l'oncoprotéine HER2.

Afin de déterminer le statut HER2 de la tumeur, trois méthodes d'évaluation de l'amplification de l'oncogène HER2 existent. La quantification de l'expression peut être déterminée par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), hybridation *in situ* chromogénique (CISH) ou par une technique simple d'immunohistochimie (IHC). Cette dernière méthode paraît être la technique de choix, car elle est très spécifique, et surtout moins onéreuse. La détection par immunohistochimie peut se faire à partir d'un prélèvement biopsique, geste fait de façon systématique pour le diagnostic des cancers du sein. Cette technique permet également de retrouver l'hyperexpression de la protéine de façon rétrospective sur un prélèvement fixé et inclus en paraffine chez des patientes opérées plusieurs années auparavant. La surexpression de HER2 se définit par un score allant de 0 à 3+ (*figure n°13*).

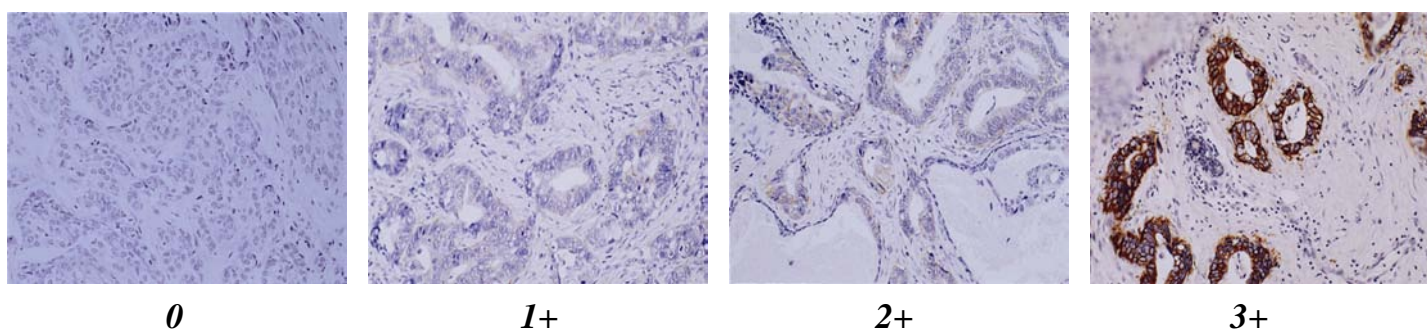


Figure n°13 : positivité de HER2 par immunohistochimie

La grille recommandée pour évaluer l'intensité de la coloration par immunohistochimie est représentée dans le tableau III.

*Tableau III : grille d'évaluation d'intensité de la coloration par immunohistochimie*

Score d'intensité de coloration	Coloration	Evaluation de la surexpression de HER2
<b>0</b>	Aucune coloration n'est observée ou la coloration de la membrane est observée dans moins de 10% des cellules tumorales	Négatif
<b>1+</b>	Une coloration faible ou à peine perceptible de la membrane est observée dans plus de 10% des cellules tumorales. Les cellules ne sont colorées que sur une partie de leur membrane	Négatif
<b>2+</b>	Une coloration faible à modérée de toute la membrane est observée dans plus de 10% des cellules tumorales	Surexpression faible à modérée
<b>3+</b>	Une coloration modérée à forte de toute la membrane est observée dans plus de 10% des cellules tumorales	Surexpression modérée à forte

Les patientes pourront bénéficier du traitement par trastuzumab, si elles présentent une forte expression de HER2, définie par un score 3+ en immunohistochimie ou par résultat positif évalué par FISH ou CISH.

#### 4.3.1.1.1. Mécanismes d'action de trastuzumab

Les deux principaux mécanismes d'action de trastuzumab sont un effet antiprolifératif : il exerce un blocage sélectif des récepteurs HER2 entraînant une inhibition de la prolifération cellulaire tumorale ; et un effet cytotoxique puissant : il fait intervenir les mécanismes immunitaires en augmentant la cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante qui entraîne une destruction spécifique des cellules surexprimant HER2.

D'autres mécanismes ont également été mis en évidence tels que la réduction de la présence des récepteurs HER2 à la surface cellulaire par activation de leur dégradation intracellulaire ; la rupture de la cascade d'activation de HER2 et opposition aux signaux de transduction intervenant dans la transformation cellulaire ; et la diminution de l'expression des facteurs de croissance vasculaire et régulation négative de l'angiogénèse tumorale.

#### 4.3.1.1.2. Développement clinique de trastuzumab

##### **Dans le cancer du sein**

- En monothérapie – étude pivotale H0649g

Trastuzumab en monothérapie a été évalué par un essai clinique de phase II multicentrique, ouvert, en deuxième ou troisième ligne de traitement du cancer du sein métastatique, HER2 positif (2+ ou 3+) évalué par immunohistochimie par un laboratoire centralisé (Cobleigh MA *et al.*, 1999).

Trastuzumab a été administré à la dose de charge de 4 mg/kg en perfusion intraveineuse, suivie d'une dose hebdomadaire de 2 mg/kg jusqu'à observation d'une progression de la maladie.

Le critère principal de cette étude était l'évaluation du taux de réponse globale (réponse complète et réponse partielle). Les critères secondaires comprenaient la durée de la réponse, le temps jusqu'à progression, la médiane de survie, la tolérance de trastuzumab et l'analyse de la qualité de vie (d'après le questionnaire QLQ-C30 version 1.0 de l'EORTC).

Les caractéristiques des patientes incluses sont présentées dans le tableau IV.

Tableau IV : caractéristiques des patientes, étude H0649g

<b>n=222 – Age médian = 50 ans (28-81)</b>	
Statut HER2 3+ (IHC)	78%
Ganglions envahis ≥ 10	27%
Récepteurs Estrogéniques négatifs	55%
Sites métastatiques ≥ 3	36%
Intervalle sans maladie < 12 mois	37%
Chimiothérapies antérieures : - à base d'anthracyclines	94%
- à base de taxanes	67%
- > 1 ligne	68%
- adjuvante	68%
- palliative	100%
Hormonothérapie antérieure	57%
Intensification thérapeutique avec autogreffe de cellules souches	25%

Les données d'efficacité cliniques sont décrites dans le tableau V (le suivi des patientes a été de 31 mois).

Tableau V : données d'efficacité clinique de trastuzumab en monothérapie chez les patientes HER2 3+, étude H0649g

Patientes HER (3+) (n=172)	Résultats	IC à 95%
Taux de réponse (%)	18%	[13 – 25]
Durée médiane de la réponse (mois)	9,1	[5,6 – 10,3]
Temps médian jusqu'à progression (mois)	3,2	[2,6 – 3,5]
Durée médiane de survie (mois)	16,4	[12,3 – NE*]

\*NE = non estimé ou non atteint

Date de fin de recueil des données : avril 1999.

Un bénéfice thérapeutique a été supérieur chez les patientes présentant une surexpression HER2 3+.

- En association

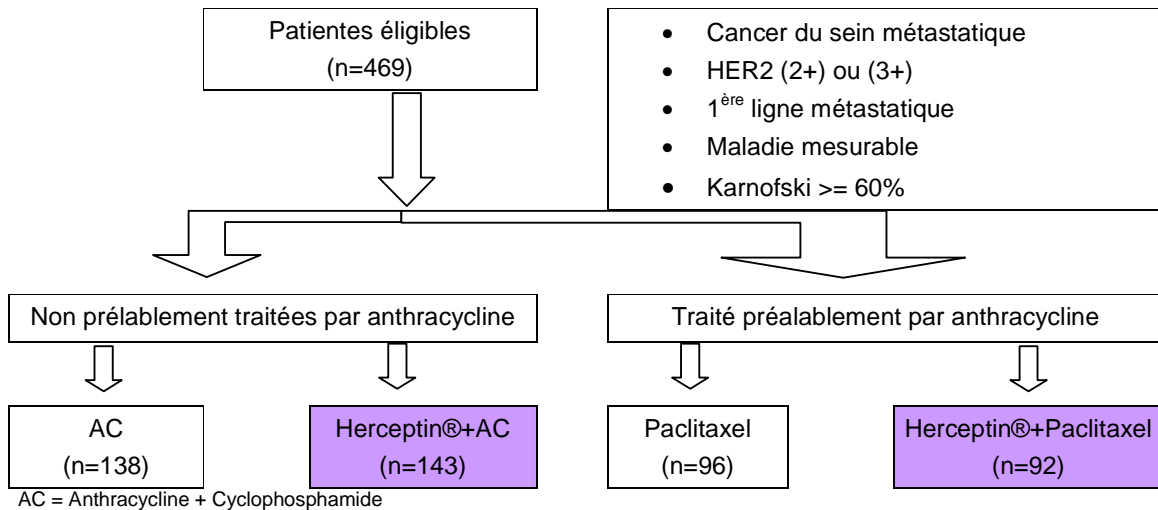
Trastuzumab a également été étudié en combinaison avec différentes chimiothérapies telles que cisplatine, paclitaxel (Taxol®), docétaxel (Taxotère®) et doxorubicine (Adriamycine® ou Adriblastine®). La meilleure efficacité *in vitro* et *in vivo* a été observée en associant le paclitaxel ou le docétaxel au trastuzumab. Il a également été observé que le trastuzumab associée à des antracyclines, telles que l'Adriblastine®, potentialise la cardiotoxicité.

- *En situation métastatique*

- Trastuzumab en association à paclitaxel – étude H0648g

Une étude de phase III internationale, multicentrique, randomisée en ouvert et prospective, a été conduite chez 469 patientes afin d'évaluer l'association trastuzumab plus chimiothérapie en première ligne métastatique. Les patientes présentaient un cancer du sein métastatique, surexprimaient l'oncogène HER2 par immunohistochimie (2+ et 3+) (Slamon DJ *et al.*, 2001). Les patientes étaient randomisées entre le bras chimiothérapie seul *versus* le bras chimiothérapie plus trastuzumab (dose de charge à 4 mg/kg suivie d'une dose hebdomadaire à 2 mg/kg jusqu'à progression de la maladie). Les patientes qui avaient reçu une chimiothérapie adjuvante à base d'antracycline recevaient un traitement par paclitaxel (175 mg/m<sup>2</sup> en perfusion de 3 heures toutes les trois semaines pendant 6 cycles). Quant aux autres, elles recevaient une association d'antracyclines : doxorubicine (60 mg/m<sup>2</sup>) ou épirubicine (75 mg/m<sup>2</sup>) plus cyclophosphamide (600 mg/m<sup>2</sup>) toutes les trois semaines pendant 6 cycles (*figure n°14*).





*Figure n°14 : schéma de l'étude H0648g, chimiothérapie seule ou associée à trastuzumab*

Le critère principal de cette étude était de comparer le temps jusqu'à progression de la maladie des différents bras. Les critères secondaires étaient la comparaison du taux de réponse globale, de la durée de la réponse, de la médiane de survie et de la tolérance.

Les caractéristiques des patientes randomisées dans le groupe paclitaxel seul ou associé à trastuzumab sont décrites dans le tableau VI.

*Tableau VI : caractéristiques des patientes, étude H0648g*

<b>n=188</b>	<b>Paclitaxel</b>	<b>Trastuzumab+Paclitaxel</b>
<b>Age médian = 51 ans (25-77)</b>	<b>n = 96</b>	<b>n = 92</b>
Statut HER2 3+ (IHC)	80%	74%
Ganglions envahis $\geq$ 4	64%	58%
Récepteurs Estrogénique négatifs	66%	58%
Sites métastatiques $\geq$ 3	35%	31%
Intervalle sans maladie (médiane)	18,9 mois	22,4 mois
Chimiothérapies à base d'anthracyclines	97%	91%
Hormonothérapie antérieure	56%	55%
Progression dans les 12 mois après la fin de la chimiothérapie adjuvante	43%	31%

Les résultats de cette étude, en termes de réponse objective (50 versus 32%,  $p < 0,001$ ), de durée de réponse (9,1 versus 6,1 mois,  $p < 0,001$ ) et de survie (25,4 versus 20,3 mois,  $p = 0,046$ ), étaient en faveur de l'association chimiothérapie-trastuzumab, quel qu'ait été le régime de chimiothérapie (paclitaxel ou anthracyclines-cyclophosphamide).

Cependant, le taux d'insuffisance cardiaque congestive était plus fréquent dans le bras anthracycline-cyclophosphamide plus trastuzumab (16% de grade 3-4) que dans le bras paclitaxel plus trastuzumab (2%).

Seules les patientes HER2 évaluées 3+ par immunohistochimie et le bras de randomisation paclitaxel plus ou moins trastuzumab ont été retenus pour l'autorisation de mise sur le marché. Les résultats cliniques sont développés dans le tableau VII (le suivi des patientes était de 25 mois).

*Tableau VII : données d'efficacité clinique en association à paclitaxel, étude H0648g*

<b>Patientes HER2 (3+)</b> n=145	<b>Trastuzumab + Paclitaxel</b> (n=68)	<b>Paclitaxel seul</b> (n=77)
<b>Temps jusqu'à progression</b>		
Médiane (mois)	7,1	3
IC à 95% (mois)	[6,2 - 12,0]	[2,0 - 4,4]
<b>Taux de réponse</b>		
Taux (%)	49	17
IC à 95% (%)	[36 - 61]	[9 - 27]
<b>Durée de réponse</b>		
Médiane (mois)	8,3	4,6
IC à 95% (mois)	[7,3 - 8,8]	[3,7 - 7,4]
<b>Survie</b>		
Médiane (mois)	25	18
IC à 95% (mois)	[18,6 - 33,7]	[11,2 - 23,8]

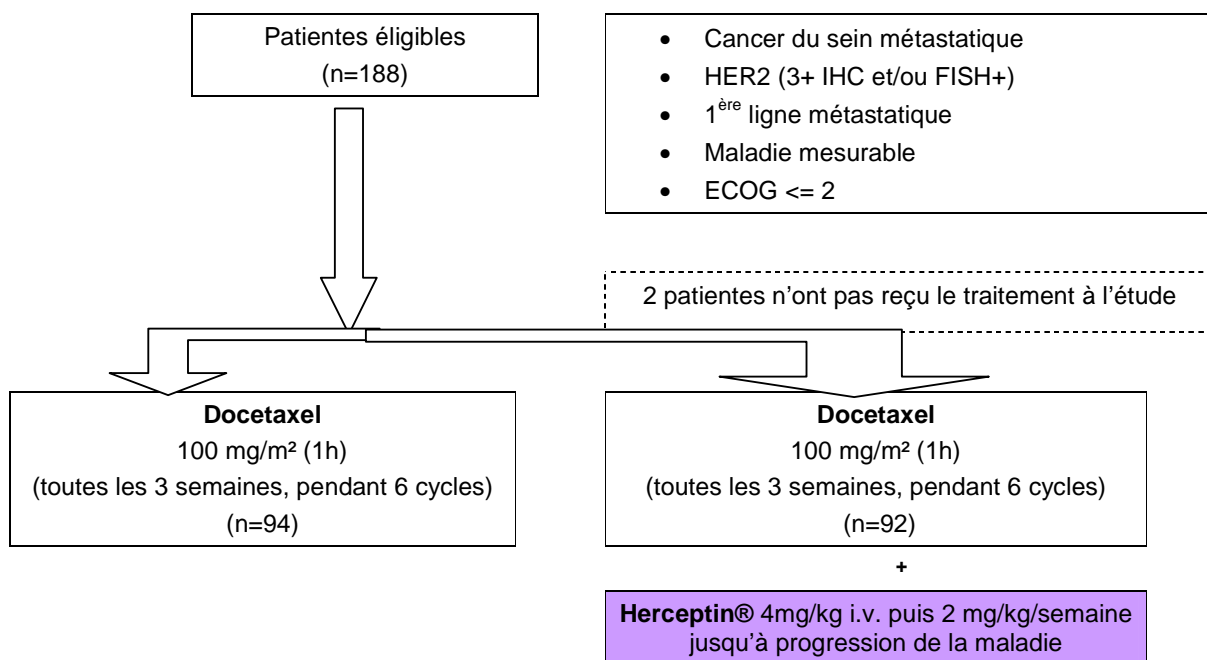
Les résultats sont en faveur de l'association paclitaxel plus trastuzumab : un taux de réponse objective de 49% versus 17%, un allongement du temps jusqu'à progression (7,1 versus 3 mois) et une survie augmentée de 6,9 mois.

- Trastuzumab en association à docetaxel – étude M77001

Une étude de phase II similaire a été conduite chez 188 patientes afin de comparer l'association de trastuzumab avec docetaxel versus docetaxel seul en première ligne, chez des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique, surexprimant HER2 (3+ évalué par IHC) (Trastuzumab, Dossier d'AMM. Rapport d'étude M77001).

Les patientes étaient randomisées dans le bras de traitement docetaxel seul (100 mg/m<sup>2</sup> en perfusion d'1 heure toutes les trois semaines pendant 6 cycles) ou le bras de traitement docetaxel plus trastuzumab (à la dose de charge de 4 mg/kg en perfusion intraveineuse suivie

d'une dose hebdomadaire à 2 mg/kg jusqu'à progression de la maladie). Les patientes randomisées dans le bras de traitement docetaxel seul pouvaient recevoir trastuzumab après progression (*figure n°15*).



*Figure n°15 : schéma de l'étude M77001, docetaxel seul ou associé à trastuzumab*

Le critère principal de cette étude était de comparer le taux de réponse globale des deux bras. Les critères secondaires étaient la comparaison de la durée de la réponse, du temps jusqu'à la progression de la maladie, de la survie globale et de la tolérance.

Les caractéristiques des patientes sont décrites dans le tableau VIII.

*Tableau VIII : caractéristiques des patientes, étude M77001*

n=186	Docetaxel n = 94	Trastuzumab + Docetaxel n = 92
Age médian (min-max)	55 (24-79)	53 (32-80)
Statut HER2 : IHC 3+	87,2%	88,0%
IHC 2+ et FISH+	4,3%	7,6%
autres	8,0%	4,0%
Statut hormonal : ER+ et/ou PgR+	56,4%	41,3%
Métastases médianes (min-max)		
Nbre lésion/patient	4 (1-12)	4 (1-12)
Nbre site/patient	2 (1-5)	2 (1-5)
Sites métastatiques ≥ 3	35%	31%
Chimiothérapie adjuvante	68,1%	70,7%
Anthracyclines en adjuvant	55,3%	64,1%
Hormonothérapie antérieure	46,8%	43,5%
Radiothérapie antérieure	66,0%	64,1%

L'évaluation des patientes a été réalisée sur 1 an (*tableau IX*).

**Tableau IX** : données d'efficacité clinique en association à docetaxel, étude M77001

	<b>Docetaxel (n=94)</b>	<b>Herceptin + Docetaxel (n=92)</b>
Taux de réponse		
• partielle [IC à 95%]	31,9% [22,7 - 42,3]	54,3% [43,6 - 64,8]
• complète [IC à 95%]	2,1% [0,3 - 7,5]	6,5% [2,4 - 13,7]
• globale [IC à 95%]	34% [25 - 45]	61% [50 - 71]
	p=0,0002	
Temps médian jusqu'à progression de la maladie [IC à 95%]	5,7 mois [5 - 6,5]	10,6 mois [7,6 - 12,8]
	p=0,0001	
Durée médiane de la réponse [IC à 95%]	5,5 mois [4,4 - 6,2]	11,4 mois [9,2 - 15]
	p=0,0002	
Survie globale [IC à 95%]	22,1 mois [17,6 - 28,9]	30,5 mois [26,8 - ne*]
	p=0,0062	

\*\* ne = non estimé

Cependant, l'analyse de la tolérance au traitement a montré dans le bras d'association une augmentation de l'incidence des événements indésirables (40% versus 31%) et une augmentation de l'incidence des événements indésirables de grade 4 (34% versus 23%).

➤ *En situation adjuvante*

L'étude HERA a évalué trastuzumab en situation adjuvante (Piccard-Gebhart *et al.*, 2005).

C'est une étude de phase III, randomisée, ouverte ayant comparée un traitement par trastuzumab pendant 1 ou 2 ans versus pas de traitement chez 5090 patientes atteintes d'un cancer du sein précoce infiltrant exprimant HER2, traitées par chirurgie suivie d'un traitement standard par chimiothérapie adjuvante plus ou moins une radiothérapie. Les patientes étaient randomisées après avoir complété au moins quatre cycles d'une chimiothérapie (néo)adjuvante choisie par l'investigateur et une radiothérapie si indiquée, dans l'un des trois groupes suivants :

- Groupe 1 (n = 1693) : pas d'administration de trastuzumab ;
- Groupe 2 (n = 1693) : administration de trastuzumab pendant 1 an (à la dose de charge de 8 mg/kg suivie d'une dose de 6 mg/kg toutes les trois semaines) ;
- Groupe 3 (n = 1704) : administration de trastuzumab pendant 2 ans (au même schéma posologique que précédemment).

Le critère principal de cette étude était la survie sans maladie, définie comme étant la durée entre la randomisation de la patiente et la survenue d'un événement (rechute loco-régionale ou à distance, cancer du sein controlatéral incluant les carcinomes canauxaires *in situ*, apparition d'un second cancer primaire, ou décès quelle qu'en soit la cause). Les critères secondaires étaient la survie sans récurrence (durée entre la randomisation et la première rechute loco-régionale ou à distance ; le décès sans rapport avec une rechute n'était pas pris en compte), la survie sans maladie à distance (durée entre la randomisation et la première rechute à distance, un second cancer primitif ou un cancer du sein controlatéral ; le décès sans rapport avec une rechute n'était pas pris en compte), la survie globale (durée entre la randomisation et le décès quelle qu'en soit la cause), la tolérance et l'incidence des dysfonctionnements cardiaques.

Les résultats disponibles sont ceux d'une analyse intermédiaire dont le suivi médian de l'étude a été de 12,5 mois (*tableau X*). 3386 patientes ont été randomisées. Plus de 90 % des patientes avaient reçu une chimiothérapie à base d'anthracycline dont environ 26 % en association à une taxane.

*Tableau X : Données d'efficacité clinique en adjuvant, étude HERA*

Paramètres	Groupe 1 non traité (n=1693)	Groupe 2 Trastuzumab (n=1693)	Valeur du p vs Observation	Risque Relatif (Hazard Ratio) vs Observation
<b>Survie sans maladie</b>				
- N patients avec événement	219 (12,9%)	127 (7,5%)	< 0,0001	0,54
- N patient sans événement	1474 (87,1%)	1566 (92,5%)		
<b>Survie sans récurrence</b>				
- N patients avec événement	208 (12,3%)	113 (6,5%)	< 0,0001	0,51
- N patients sans événement	1485 (87,7%)	1580 (93,3%)		
<b>Survie sans maladie à distance</b>				
- N patients avec événement	184 (10,9%)	99 (5,8%)	< 0,0001	0,50
- N patients sans événement	1508 (89,1%)	1594 (94,6%)		

A 1 an, il n'a pas été observé de différence significative entre les deux groupes en terme de mortalité globale : 31 (1,8 %) décès observés dans le groupe trastuzumab contre 40 (2,4 %) dans le groupe non traité (p = 0,2379). La mise à jour des données de l'étude à 2 ans a montré que la mortalité globale a été significativement réduite dans le groupe trastuzumab : 59 (3,5 %) décès observés dans le groupe trastuzumab contre 90 (5,3 %) dans le groupe non traité (p = 0,0115).

## Dans le cancer gastrique

L'étude ToGA, présentée lors du congrès international ASCO 2009, est le premier essai randomisé de phase III qui a évalué l'utilisation de trastuzumab chez des patients atteints d'un cancer gastrique HER2 positif inopérable localement évolué, récurrent et/ou métastatique. Près de 4000 patients ont été testés pour connaître le statut HER2 de la tumeur et 594 patients, qui ont participé à cette étude, ont présenté une maladie HER2 positive. Les patients ont été randomisés afin de recevoir, comme traitement de première intention, soit une association de fluoropyrimidine (capecitabine ou 5-FU intraveineux) et de cisplatine toutes les 3 semaines pendant 6 cycles, soit trastuzumab à 6 mg/kg toutes les 3 semaines jusqu'à progression de la maladie, combinée à une dose de fluoropyrimidine et de cisplatine toutes les 3 semaines pendant 6 cycles. La plupart des patients ont reçu capecitabine et cisplatine comme traitement de chimiothérapie. L'objectif principal de cette étude était de démontrer une survie globale supérieure des patients traités avec trastuzumab à ceux traités uniquement avec une chimiothérapie standard. L'analyse intermédiaire pré-planifiée a été déclenchée par l'occurrence de 347 événements. Les paramètres d'évaluation secondaires comprenaient la durée de survie sans progression, le taux de réponse global, la durée de la réponse, la sûreté et la qualité de vie. Le trastuzumab a accru la survie globale médiane de 2,7 mois, 11,1 mois dans le groupe chimiothérapie seul et 13,8 mois dans le groupe chimiothérapie associé à trastuzumab ( $p=0,0046$ ). La durée de survie sans progression observé dans le groupe chimiothérapie seul était de 5,2 mois contre 6,7 mois dans le groupe chimiothérapie plus trastuzumab ( $p=0,002$ ) et le taux de réponse global de 34,5% dans le groupe chimiothérapie seul contre 47% dans le groupe chimiothérapie plus trastuzumab ( $p=0,0017$ ). Aucun effet secondaire nouveau ou imprévu n'a été observé au cours de cette étude. L'observation d'une diminution asymptomatique de l'éjection ventriculaire gauche était plus importante dans le groupe avec trastuzumab (4-5% versus 1%) (Chustecka Z, 2009).

### 4.3.1.1.3. Principaux effets indésirables de trastuzumab

- *Événements liés à la perfusion*

Les effets secondaires les plus fréquemment observés sont la fièvre et/ou les frissons qui apparaissent lors de la première perfusion mais qui décroissent très rapidement au fur et à mesure des cycles de perfusions. Dans les rares cas, ces réactions liées à la perfusion peuvent être graves et potentiellement fatales. Ils incluent dyspnées, hypotension, bronchospasme, détresse respiratoire, réactions d'hypersensibilité de type réactions allergiques et choc anaphylactique. La majorité de ces réactions surviennent dans les 2h30 après le début de la perfusion.

- *Manifestations cardiaques*

Une réduction de la fraction d'éjection, des cas d'insuffisance cardiaque congestive avec dyspnée, œdème pulmonaire, galop..., ont été observés chez des patientes traitées par trastuzumab, le plus souvent chez des patientes déjà traitées par anthracyclines. L'insuffisance cardiaque peut être modérée à sévère, voire d'issue fatale. Toutes les patientes susceptibles d'être traitées par trastuzumab et particulièrement celles exposées aux anthracyclines, doivent bénéficier d'une évaluation cardiaque initiale et d'une réévaluation pendant le traitement. L'incidence de l'insuffisance cardiaque symptomatique a été de 8,8%, 8,5% et 2,2% respectivement dans les bras trastuzumab plus paclitaxel, trastuzumab seul et trastuzumab plus docetaxel.

- *Immunogénicité*

La production d'anticorps a été étudiée chez 903 patientes traitées par trastuzumab, seul ou en association à la chimiothérapie. Des anticorps anti-trastuzumab ont été décelés chez une patiente qui ne présentait pas de manifestations allergiques.

#### 4.3.1.1.4. Indications thérapeutiques

En septembre 1998, trastuzumab (Herceptin®), est devenu le second anticorps monoclonal approuvé par la FDA pour le traitement du cancer. Il a reçu l'autorisation des autorités européennes en septembre 2000.

Herceptin est indiqué dans le traitement du cancer du sein métastatique, avec surexpression tumorale de HER2 :

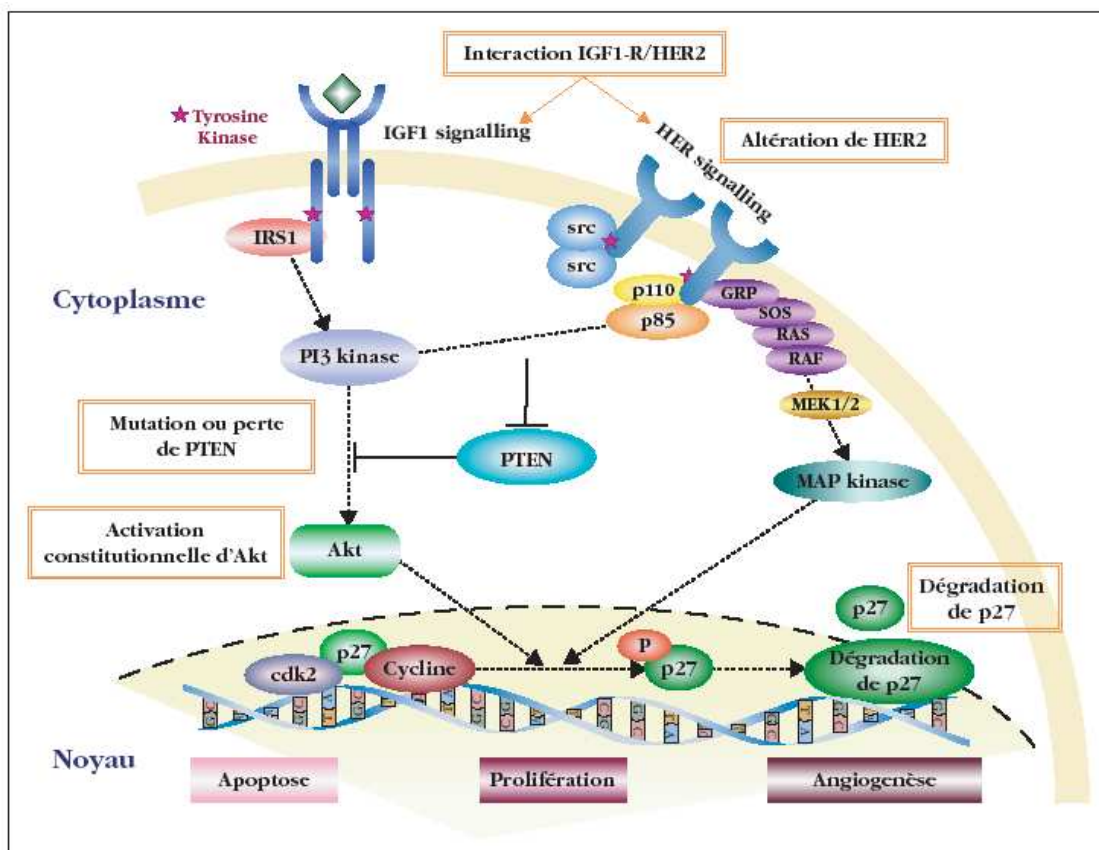
- en monothérapie, chez les patientes déjà pré-traitées par au moins deux protocoles de chimiothérapie pour leur maladie métastatique. Les chimiothérapies précédentes doivent au moins inclure une anthracycline et une taxane, sauf contre-indication. Les patientes répondeuses à l'hormonothérapie doivent également être en échec à l'hormonothérapie, sauf si ces traitements ne leur conviennent pas ;
- en association au paclitaxel, chez les patientes non pré-traitées par chimiothérapie pour leur maladie métastatique et chez lesquelles le traitement par anthracyclines ne peut être envisagé ;
- en association avec docétaxel, chez les patientes non pré-traitées par chimiothérapie pour leur maladie métastatique ;
- en association à un inhibiteur de l'aromatase, chez les patientes ménopausées ayant des récepteurs hormonaux positifs, non traitées précédemment par trastuzumab.

Herceptin est indiqué en traitement adjuvant du cancer du sein avec surexpression tumorale de HER2 après chirurgie, chimiothérapie (néo-adjuvante ou adjuvante) et radiothérapie (si indiquée).

#### 4.3.1.1.5. Mécanismes de résistance

Malgré une activité importante en association avec la chimiothérapie, trastuzumab en monothérapie présente une efficacité limitée (30% de réponses objectives) et les patientes qui répondent au trastuzumab vont présenter une rechute malgré la poursuite du traitement.

Le recul quant à l'utilisation du trastuzumab est encore relativement peu important et les mécanismes sont encore mal connus. L'activation de la prolifération cellulaire médiée par HER2 n'est pas un système isolé ; il doit être intégré dans un réseau de signalisation intracellulaire activé par différents facteurs de croissance (*figure n°16*) (Dieras V *et al.*, 2007).



*Figure n°16 : principaux mécanismes de résistance au trastuzumab (Dieras V *et al.*, 2007)*



### **Altération du récepteur :**

Le complexe sialomucine, également appelé MUC4n, est surexprimé dans les tumeurs mammaires agressives. Il a été démontré qu'il peut lier et moduler la phosphorylation de HER2 et donc potentialiser la signalisation de HER2. Il a été montré dans des modèles précliniques et des lignées cellulaires que la surexpression de MUC4 diminue la liaison des anticorps se liant spécifiquement à HER2, entraînant ainsi un mécanisme de résistance. L'inhibition de la liaison de l'anticorps anti-HER2 sur le récepteur serait due à l'encombrement stérique du complexe formé entre MUC4 et HER2.

### **IGF-I récepteur**

Le récepteur de l'IGF-I (IGF1R, *insulin like growth factor I receptor*) est un récepteur de facteur de croissance appartenant à la superfamille des récepteurs à activité tyrosine kinase intrinsèque. C'est une protéine transmembranaire qui est activée par la liaison de ligands (IGF et insuline) à son domaine extracellulaire. Le premier travail publié par Lu *et al.* (2001) sur des modèles *in vitro* démontrait que des niveaux élevés d'IGF1R inhibaient l'effet du trastuzumab sur la croissance cellulaire. Deux lignées humaines de tumeurs mammaires ont été utilisées : la lignée MCF7/HER2-18 qui surexprime à la fois HER2 et IGF1R et la lignée SKBR3 qui surexprime uniquement HER2. Dans les cellules MCF7/HER2-18, le trastuzumab inhibe la croissance tumorale uniquement lorsque l'IGF1R est bloqué par un anticorps anti-IGF1R ou par l'IGFBP3 qui séquestre l'IGF. Au contraire, les cellules SKBR3 sont sensibles au trastuzumab, mais elles deviennent résistantes lorsqu'on leur fait surexprimer l'IGF1R. L'apport d'IGFBP3, qui diminue la signalisation de l'IGF1R, restaure alors l'activité du trastuzumab.

La signalisation de l'IGF1R est probablement impliquée dans la résistance au trastuzumab mais n'est pas encore validée sur des données cliniques. Une telle validation pourrait être établie par l'étude de l'IGF1R et de ses voies de signalisation sur la biopsie initiale des patientes traitées par trastuzumab. En cas de confirmation, elle servira de rationnel au développement d'associations thérapeutiques ciblant HER2 et l'IGF1R qui pourraient prévenir ou retarder le développement de la résistance au trastuzumab.

### **Voie PI3K / Akt**

Le signal de la voie de la phospho-inositide 3 kinase passe principalement par la protéine Akt. Akt est une sérine/thréonine kinase qui joue un rôle important dans la survie cellulaire. Après activation par des facteurs de croissance, elle exerce des effets anti-apoptotiques (*figure n°17*). Clark *et al.* (2002) ont montré sur des modèles de lignées de cancer du sein, le rôle d'Akt dans la résistance à la chimiothérapie (doxorubicine, paclitaxel), au trastuzumab et au tamoxifène. Le blocage de la voie PI3K / Akt soit par un inhibiteur de PI3K (LY294002), soit en utilisant un modèle muté déficient en Akt entraîne une augmentation de l'apoptose.

La modulation de l'activité d'Akt pourrait donc offrir la possibilité d'améliorer l'efficacité thérapeutique du trastuzumab.

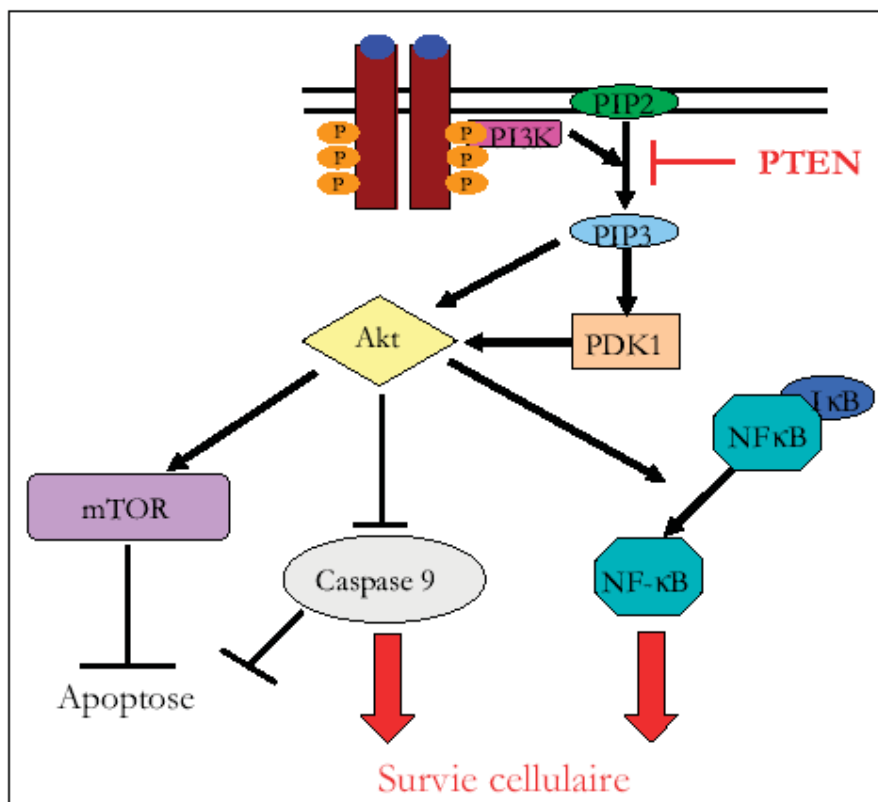


Figure n°17 : voie de signalisation de PI3 kinase / PTEN / AKT (Monnier L et al., 2004)

### Voie de signalisation PTEN

La voie de PI3 kinase peut être régulée par des phosphoinositide phosphatases telles que PTEN. PTEN est un gène suppresseur de tumeur qui a un rôle clé dans l'inhibition de la prolifération cellulaire. Il possède une activité phosphatase, il antagonise la fonction de PI3K et régule donc négativement l'activité Akt, ce qui entraîne une inactivation de la voie PI3K / Akt.

PTEN est porté par le chromosome 10 dans une région où sont retrouvées fréquemment des mutations somatiques dans différentes tumeurs solides. Dans les cancers du sein sporadiques, des mutations de PTEN sont retrouvées dans environ 6 à 7% des cas. La perte de fonction de PTEN a été rapportée dans environ 50% des cancers du sein. La restauration de PTEN inhibe les activités d'Akt et la formation tumorale.

La nature des mutations de PTEN est corrélée avec le stade et le grade de la tumeur. Par exemple, la perte complète de PTEN est plus fréquente dans les cancers métastatiques que dans la tumeur primitive. La perte d'une de ses copies augmente le risque de développement tumoral et son niveau d'expression affecte l'induction et la progression des tumeurs. PTEN est non seulement un antagoniste de la tumorigenèse, mais il sensibilise aussi les cancers du sein

au trastuzumab. L'étude Nagata *et al.* (2004) suggère que ses niveaux d'expression peuvent aussi déterminer la réponse au traitement : les patientes dont la tumeur est déficiente en PTEN répondent moins bien au trastuzumab que celles dont la tumeur présente des taux normaux de PTEN. La différence observée est très significative dans cette petite cohorte de patientes ( $p < 0,01$ ). Ainsi le statut de PTEN pourrait être utilisé comme facteur prédictif de réponse au trastuzumab en clinique. L'étude Nagata fournit de nouvelles données qui clarifient le mécanisme antitumoral du trastuzumab et aide à la compréhension des mécanismes de résistance. Il suggère que l'efficacité du trastuzumab est dépendante de son efficacité à inhiber la voie PI3K par activation de PTEN. PTEN est lié à la membrane cellulaire par un domaine C2 et est régulé négativement par src. Le trastuzumab inhibe la phosphorylation de src et inhibe donc aussi l'inactivation de PTEN. PTEN peut alors inhiber la voie PI3K / Akt. En cas d'absence ou de diminution de fonction de PTEN, les effets antitumoraux du trastuzumab sont altérés. Si l'activation de PTEN est l'un des principaux éléments responsables de l'efficacité du trastuzumab, la présence de niveaux bas de PTEN pourrait prédire l'absence de réponse au traitement. Les auteurs ont montré une corrélation entre la diminution de PTEN et la résistance au traitement dans un sous-groupe de patientes. Des études prospectives corrélant les niveaux de PTEN et la réponse au trastuzumab devraient permettre de le confirmer.

PTEN apparaît comme le facteur prédictif de réponse le plus sensible. Cela suggère l'intérêt d'associer le trastuzumab avec des inhibiteurs de PI3K pour contourner la résistance au trastuzumab. Les médicaments qui augmentent l'expression de PTEN peuvent sensibiliser les tumeurs au trastuzumab et à d'autres molécules.

#### **4.3.1.2 Récepteur du facteur de croissance épidermique – EGFR**

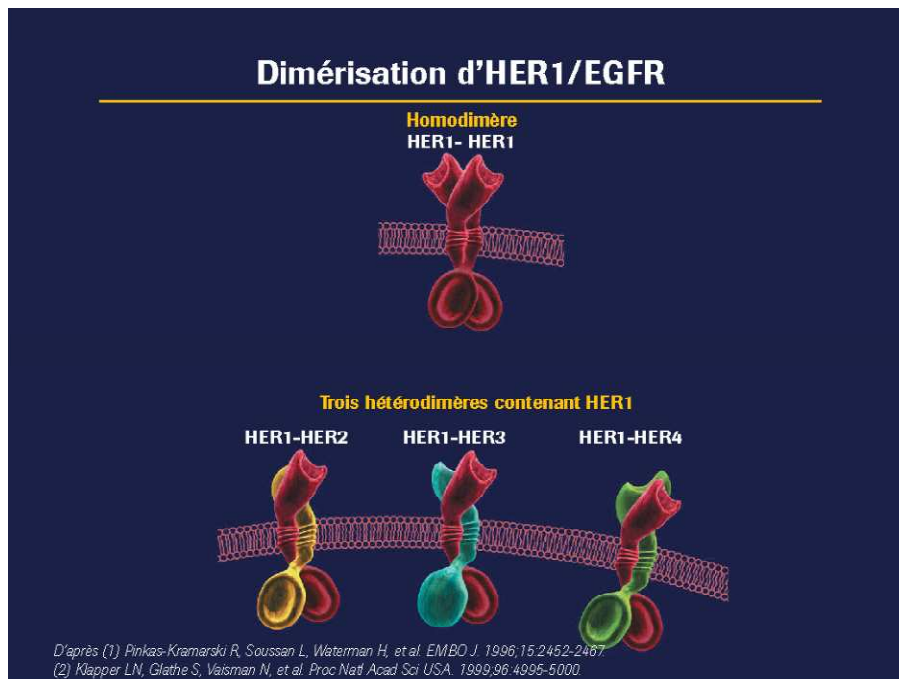
Parmi les cibles thérapeutiques potentielles en cancérologie, le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) apparaît comme un élément clé du processus tumoral, de part son fort niveau d'expression dans certains types tumoraux et de part les phénomènes qu'il régule via ses voies de signalisation : division cellulaire, angiogenèse, potentiel métastatique et inhibition de l'apoptose. Dans plusieurs types tumoraux, une augmentation de l'expression de l'EGFR a été associée à un mauvais pronostic et à la survenue de métastases (Penault-Llorca F, 2003). Les modes d'activation de l'EGFR sont assez complexes et s'intéressent au gène, à l'ARN, au récepteur lui-même ou aux ligands. Ainsi, l'immunohistochimie apparaît comme la méthode de choix pour la détection des anomalies de l'EGFR en routine.

## Structure du facteur de croissance épidermique

L'EGFR est une glycoprotéine transmembranaire de 170 K composée de trois parties (Slimane K *et al.*, 2003) :

- un segment extracellulaire avec un domaine de fixation du ligand (EGF, Epidermal Growth Factor, ou TGF $\alpha$ , Transforming Growth Factor-alpha),
- un segment transmembranaire lipophile,
- un segment intracellulaire comprenant un domaine catalytique tyrosine kinase et plusieurs sites d'autophosphorylation qui régulent l'activité du récepteur.

En l'absence de ligand, le récepteur se présente sous forme de monomère inactif. La fixation du ligand entraîne une dimérisation du récepteur qui induit une phosphorylation des résidus tyrosine et une activation de la tyrosine kinase (*figure n°18*).



*Figure n°18 : dimérisation d'HER1/EGFR*

## Effets du facteur de croissance épidermique sur la croissance cellulaire

L'EGFR joue un rôle important dans la régulation de la croissance des cellules normales et des cellules tumorales. En situation physiologique, l'EGFR est exprimé de façon très importante dans les épithéliums de revêtement, en particulier la peau et le col utérin, dans certains tissus glandulaires (hépatocytes, glandes endocrines et sébacées, canaux biliaires), dans les cellules myoépithéliales du sein et dans des épithéliums spécialisés comme celui des bronches et de la vessie. De nombreuses tumeurs, surtout de nature épithéliale, expriment de façon importante

l'EGFR, en particulier les tumeurs ORL, pulmonaires non à petites cellules, digestives et du col utérin. Des niveaux d'expression moins élevés sont retrouvés dans les tumeurs mammaires, ovariennes, rénales et urologiques. Pour les tumeurs digestives, la surexpression de l'EGFR est intense au niveau du front de progression tumorale, c'est-à-dire vers la profondeur de la tumeur. Il existe une bonne corrélation entre l'expression de l'EGFR et les métastases digestives, ovariennes et mammaires. Une augmentation de l'expression de l'EGFR est également retrouvée dans les lésions de dysplasie, notamment ORL et pulmonaires, soulevant la question du ciblage de l'EGFR dans des protocoles de prévention (Penault-Llorca F, 2003).

### **Effets du facteur de croissance épidermique sur la mobilité cellulaire et les métastases**

L'EGF et le TGF $\alpha$  stimulent la mobilité des cellules tumorales ou augmentent leur pouvoir d'invasion dans de nombreux modèles tumoraux expérimentaux. L'EGF module l'expression des métalloprotéinases matricielles, ce qui contribue à l'invasion par les cellules tumorales et facilite leur croissance. Des études précliniques suggèrent que la « down-regulation » des métalloprotéinases matricielles est capable de diminuer le potentiel invasif des cellules cancéreuses (Price JT *et al.*, 1996 ; Matsumoto T *et al.*, 1998).

### **Effets du facteur de croissance épidermique sur l'angiogenèse**

La croissance tumorale est étroitement associée à une augmentation des tissus vasculaires, qui est nécessaire aux apports de nutriments à la tumeur en développement (Hanahan D et Weinberg RA, 2000). L'activation de l'EGFR et le signal consécutif amplifient le processus d'angiogenèse de deux façons principales. Premièrement, ils stimulent la production de facteurs angiogéniques tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), qui favorise la production de nouveaux tissus vasculaires (De Jong JS *et al.*, 1998 ; Ravindranath N *et al.*, 2001). Deuxièmement, ils augmentent la production d'enzymes spécialisées appelées métalloprotéinases de la matrice (MMP) qui facilitent le remodelage de la matrice tissulaire (O-charoenrat P *et al.*, 1999) (*figure n°19*).

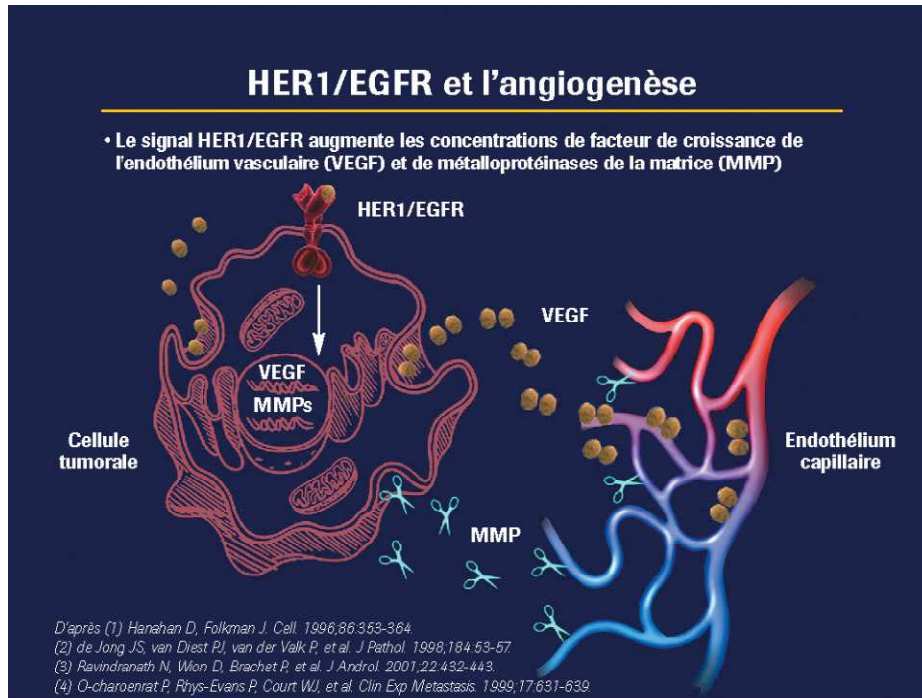


Figure n°19 : HER1/EGFR et l'angiogénèse (Hanahan D and Weinberg RA, 2000)

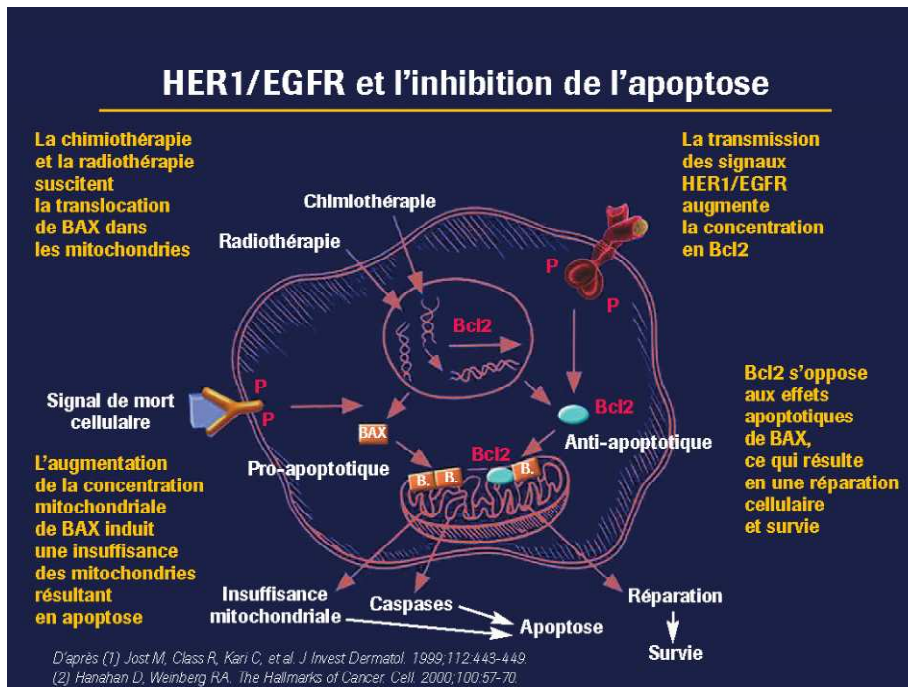


Figure n°20 : HER1/EGFR et l'inhibition de l'apoptose (Hanahan D and Weinberg RA, 2000)

## **Le facteur de croissance épidermique et l'inhibition de l'apoptose**

L'activation d'EGFR exerce un effet anti-apoptique qui induit les fonctions de réparation cellulaire et prolonge la survie des cellules après exposition à des stimuli toxiques tels que la chimiothérapie ou la radiothérapie. Dans les cellules normales, les lésions de l'ADN résultant des stimuli toxiques induisent l'expression d'une protéine appelée BAX, qui pénètre dans les mitochondries et suscite l'apoptose. De récentes recherches suggèrent que l'activation d'EGFR pourrait favoriser la survie cellulaire car l'activation d'EGFR induit l'expression de Bcl-2, protéine anti-apoptique qui bloque l'activité de BAX (Jost M *et al.*, 1999). Ainsi, l'effet anti-apoptique de l'activation d'EGFR, en association à l'amplification de la prolifération cellulaire et de l'angiogenèse régie par ces récepteurs, paraît favoriser la croissance et le développement tumoraux. Théoriquement, l'inhibition de l'activité d'EGFR réduirait l'expression de Bcl-2 sans affecter celle de BAX, favorisant l'apoptose et la restauration du contrôle de la durée de vie des cellules (*figure n°20*).

## **Agir sur le facteur de croissance épidermique : les thérapies en cancérologie**

Par des mécanismes moléculaires bien identifiés, le ciblage thérapeutique de l'EGFR aboutit à des modifications de la physiologie cellulaire touchant la prolifération, l'apoptose et la réparation de l'ADN. Ces mécanismes, seuls, peuvent expliquer les effets antiprolifératifs des molécules anti-EGFR, mais ils constituent une base rationnelle solide sur laquelle ont été bâties de nombreuses études d'association entre traitements ciblés anti-EGFR et agents cytotoxiques : chimiothérapie et radiothérapie (Milano G and Magne N, 2003).

Au plan pharmacologique, deux approches dirigées contre l'EGFR sont actuellement réalisées ou en développement :

- l'inhibition du segment extra-cellulaire de l'EGFR par les anticorps monoclonaux qui agissent en amont, en empêchant la fixation du ligand sur son récepteur ;
- l'inhibition du segment intracellulaire par les inhibiteurs réversibles ou irréversibles de la tyrosine kinase qui bloquent, en aval, la cascade de signalisations cellulaires faisant suite à la fixation du ligand sur son récepteur.

Les anticorps monoclonaux ont une forte affinité pour l'EGFR, supérieure ou égale à celle de l'EGF et à celle du TGF $\alpha$ . Ils augmentent l'activité antitumorale de certains agents cytotoxiques. Conçus pour se fixer très spécifiquement sur l'EGFR, ils empêchent la fixation du ligand et préviennent la phosphorylation du récepteur et la cascade aboutissant à la transduction du signal (Herbst RS *et al.*, 2002).

#### 4.3.1.2.1 Mécanisme d'action de Cetuximab

Cétuximab est un anticorps monoclonal chimérique IgG1 se liant spécifiquement au domaine extracellulaire du récepteur du facteur de croissance épidermique de type 1 ou EGFR. Il agit comme un antagoniste compétitif, avec une affinité d'environ 5 à 10 fois supérieure à celle des ligands endogènes. Le premier anticorps monoclonal dirigé contre EGFR, M225, a démontré une liaison à l'EGFR avec une affinité similaire au ligand endogène TGF $\alpha$ , bloquant ainsi l'activation et induisant l'internalisation du récepteur. Cependant, l'utilisation de M225 a provoqué le développement d'HAMA, résultat observé dans l'étude qui a inclus 19 patients atteints d'un cancer du poumon (Divi CR *et al.*, 1991). Afin d'éviter le développement d'HAMA, M225 a été chimérisé au niveau de la région constante de l'IgG1 humaine, formant le C225 (cétuximab). La masse moléculaire estimée de kétuximab est de 154 K. La fixation bloque ainsi la liaison des ligands endogènes de l'EGFR aboutissant à une inhibition de la fonction du récepteur. De plus, il induit l'internalisation de l'EGFR, ce qui pourrait entraîner sa régulation négative. Cétuximab recrute également les cellules immunes effectrices cytotoxiques contre les cellules tumorales exprimant l'EGFR (Résumé des Caractéristiques du Produit Erbitux® ; Baselga J. 2001 ; Herbst RS *et al.*, 2002).

#### 4.3.1.2.2 Développement Clinique de Cetuximab

##### **Cancer Colorectal**

Un test diagnostique (EGFR pharmDx) a été utilisé pour la détection immunohistochimique de l'expression d'EGFR au niveau du matériel tumoral. Une tumeur était considérée comme étant EGFR positive si une cellule marquée pouvait être identifiée. Environ 75% des patients ayant un cancer colorectal métastatique sélectionnés pour les études cliniques avaient une tumeur exprimant l'EGFR et étaient donc considérés comme éligibles pour le traitement par kétuximab. L'efficacité et la tolérance de kétuximab n'ont pas été documentées dans les tumeurs EGFR négatives.

Cétuximab en monothérapie ou en association avec une chimiothérapie a été étudié dans cinq études cliniques contrôlées, randomisées et plusieurs études complémentaires. Les cinq études ont porté au total sur 3734 patients atteints de cancer colorectal métastatique chez lesquels une expression de l'EGFR était détectable. Le caractère prédictif du statut du gène KRAS vis-à-vis du traitement par kétuximab a été confirmé par quatre études contrôlées randomisées. Le statut de mutation du gène KRAS était connu pour 1261 des patients. Seule l'étude EMR 62 202-007 n'a pas permis d'analyse.



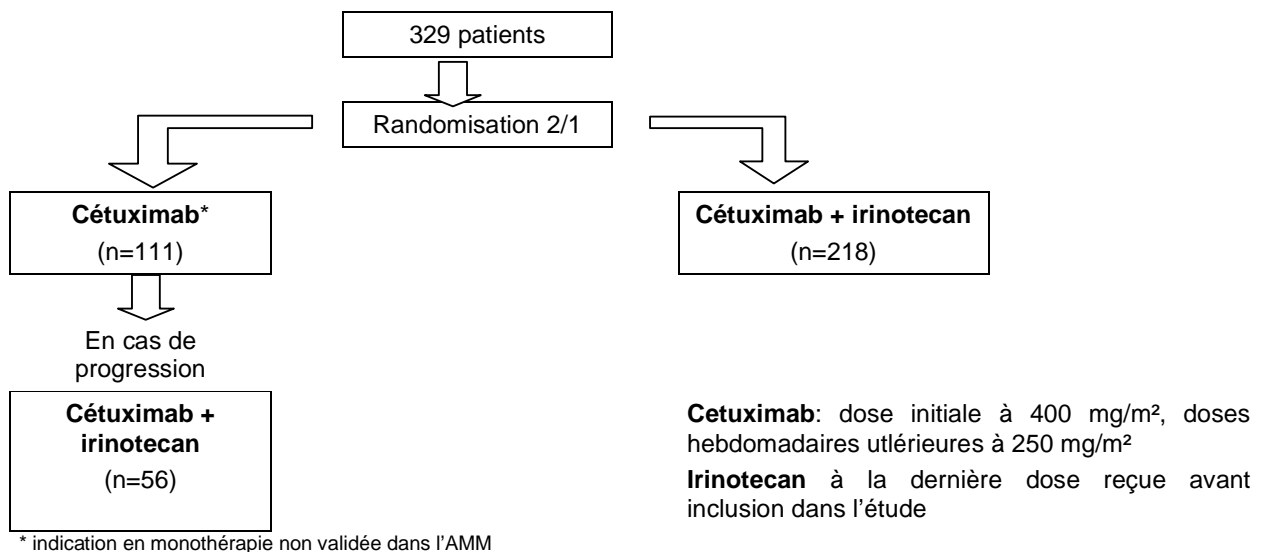
- *Cetuximab en association*

- Cetuximab associé à irinotecan

- Après échec sous irinotecan – Etude EMR 62 202-007

Cette étude randomisée, menée chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique après échec d'un traitement à base d'irinotécan pour leur maladie métastatique (dernier traitement avant l'entrée dans l'étude, progression sous irinotécan pendant le traitement ou au cours des 3 mois suivant la fin du traitement), a comparé l'association de cetuximab à irinotécan (218 patients) versus cetuximab en monothérapie (111 patients) (Cunnigham D et al., 2004).

Les patients étaient traités jusqu'à progression de la maladie ou survenue d'effets indésirables graves. En cas de progression, les patients traités par cetuximab en monothérapie pouvaient recevoir l'association irinotecan plus l'anticorps (*figure n°21*).



*Figure n°21 : schéma de l'étude EMR 62 202-007, cetuximab en monothérapie versus cetuximab associé à irinotecan*

Cétuximab associé à irinotecan a démontré une supériorité significative comparé à cetuximab seul sur la réponse au traitement, le contrôle de la maladie et la survie sans progression. Cependant, aucun effet sur la durée de survie globale n'a été démontré (*tableau XI*).

*Tableau XI : résultats cliniques, irinotecan plus cetuximab, étude EMR 62 202-007*

	<b>Irinotecan + Cétuximab n=218</b>	<b>Cétuximab monothérapie n=111</b>
<b>Taux de réponses objectives (RC + RP)</b>		
n (%)	50 (23)*	12 (11)
IC à 95%	[18 - 29]	[6 - 18]
<b>Taux de contrôle de la maladie (RC + RP + stabilisation de la maladie pendant au moins 6 mois)</b>		
n (%)	121 (56)**	36 (32)
IC à 95%	[49 - 62]	[24 - 42]
<b>Survie sans progression</b>		
Médiane (mois)	4,1***	1,5
IC à 95%	[2,8 - 4,3]	[1,4 - 2,8]
<b>Durée de survie globale</b>		
Médiane (mois)	8,6****	6,9
IC à 95%	[7,6 - 9,6]	[5,6 - 9,1]

\*p=0,007 ;

\*\*p < 0,001

\*\*\* Hazard Ration (IC à 95%) = 0,54 (0,42 - 0,72) Test du logrank : p<0,001

\*\*\*\* p=0,48

L'absence de différence significative de la médiane de survie entre les deux groupes peut être expliquée par la possibilité, pour les patients inclus dans le bras cetuximab seul, d'associer irinotecan à l'anticorps monoclonal lors de la progression de la maladie.

- Après échec sous oxaliplatine plus fluoropyrimidine – Etude CA225003

Cette étude randomisée, menée chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique ayant reçu initialement une association d'oxaliplatine plus fluoropyrimidine pour leur maladie métastatique, a comparé l'association de cetuximab plus irinotécan (648 patients) versus irinotécan en monothérapie (650 patients). Sur l'ensemble de la population des patients pour lesquels le statut du gène KRAS était évaluable, 64% présentaient des tumeurs avec gène KRAS de type sauvage.

Aucune différence significative de durée de survie globale n'a été mise en évidence par cette étude. Suite à la progression de la maladie, un traitement par des agents ciblant l'EGFR a été instauré chez 50% des patients du groupe sous irinotécan seul. Ce qui a très probablement eu un impact sur les résultats obtenus en terme de survie. Le taux de réponses objectives et la durée de survie sans progression ont été significativement améliorés avec cetuximab.

- Cetuximab associé à irinotécan et 5-fluorouracile - Etude CRYSTAL, EMR 62 202-013

Cette étude randomisée, menée chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique n'ayant pas reçu de traitement préalable pour leur maladie métastatique, a comparé l'association de cetuximab plus irinotécan et une perfusion de 5-fluorouracile / acide folinique (FOLFIRI) avec cette même chimiothérapie seule. Sur l'ensemble de la population des patients pour lesquels le statut du gène KRAS était évaluable, 64% présentaient des tumeurs avec gène KRAS de type sauvage (Van Cutsem E *et al.*, 2009).

Les données d'efficacité clinique de cette étude sont résumées dans le tableau XII.

*Tableau XII : résultats cliniques, étude EMR 62 202-013*

Variable / Statistique	Population totale		Patients avec gène KRAS de type sauvage	
	Cetuximab + FOLFIRI (n = 599)	FOLFIRI (n = 599)	Cetuximab + FOLFIRI (n = 172)	FOLFIRI (n = 176)
<b>Taux de réponses objectives (RC + RP)</b> % (IC 95%) valeur de p	46,9 (42,9 - 51,0)	38,7 (34,8 - 42,8)	59,3 (51,6 - 66,6)	43,2 (35,8 - 50,9)
	0,0038		0,0025	
<b>Durée de survie sans progression</b> Hazard Ration (IC 95%) Valeur de p	0,85 (0,726 - 0,998)		0,68 (0,501 - 0,934)	
	0,0479		0,0167	

RC = réponse complète / RP = réponse partielle

- Cetuximab associé à oxaliplatine et 5-fluorouracile – Etude EMR 62 202-047

Cette étude randomisée, menée chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique n'ayant pas reçu de traitement préalable pour leur maladie métastatique, a comparé l'association de cetuximab plus oxaliplatine et une perfusion de 5-fluorouracile / acide folinique (FOLFOX) avec cette même chimiothérapie seule. Les patients ont reçu cetuximab (dose de charge 400 mg/m<sup>2</sup> suivi d'une perfusion à 250 mg/m<sup>2</sup> une fois par semaine) plus FOLFOX-4 (oxaliplatine à 85 mg/m<sup>2</sup> au jour 1, plus leucovorin à 200 mg/m<sup>2</sup> et fluorouracile à 400 mg/m<sup>2</sup> en bolus suivi d'une perfusion à 600 mg/m<sup>2</sup> sur 22h aux jours 1 et 2) ou FOLFOX-4 seul. Le traitement était administré jusqu'à progression de la maladie ou survenue d'une toxicité inacceptable. Sur l'ensemble de la population des patients pour lesquels le statut du gène KRAS était évaluable, 58% présentaient des tumeurs avec gène KRAS de type sauvage (Bokemeyer C *et al.*, 2009).

Les données d'efficacité clinique de cette étude sont résumées dans le tableau XIII.

*Tableau XIII : résultats cliniques, étude EMR 62 202-047*

Variable / Statistique	Population totale		Patients avec gène KRAS de type sauvage	
	Cetuximab + FOLFOX (n = 169)	FOLFOX (n = 168)	Cetuximab + FOLFOX (n = 61)	FOLFOX (n = 73)
<b>Taux de réponses objectives (RC + RP)</b> % (IC 95%) valeur de p	45,6 (37,9 – 53,4)	35,7 (28,5 – 43,5) 0,064	60,7 (47,3 – 72,9)	37,0 (26,0 – 49,1) 0,011
<b>Durée de survie sans progression</b> Hazard Ration (IC 95%) Valeur de p	0,93 (0,70 – 1,23) 0,6170		0,57 (0,35 – 0,91) 0,0163	

RC = réponse complète / RP = réponse partielle

▪ *Cetuximab en monothérapie – Etude CA225025*

Cette étude randomisée, menée chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique ayant reçu antérieurement un traitement à base d'oxaliplatine, d'irinotécan et de fluoropyrimidine pour leur maladie métastatique, a comparé l'ajout de cetuximab en monothérapie au traitement symptomatique optimal (BSC, best supportive care) (287 patients) avec BSC seul (285 patients). Sur l'ensemble de la population des patients pour lesquels le statut du gène KRAS était évaluable, 59% présentaient des tumeurs avec gène KRAS de type sauvage.

L'ajout de cetuximab au BSC a réduit le risque total de décès de 23% et le risque global de progression de la maladie de 32%. Les données préliminaires concernant les patients atteints de tumeur avec gène KRAS de type sauvage ont fait apparaître des effets bénéfiques peu marqués de cetuximab en terme de durée de survie globale et de durée de survie sans progression.

**Carcinome épidermoïde de la tête et du cou**

Un niveau élevé de l'expression d'EGFR ainsi que du ligand TGF $\alpha$  a été montré dans 80 à 90% des carcinomes des cellules squameuses de la tête et du cou, comparé au niveau des muqueuses normales des patients sans cancer. Ainsi la détection par immunohistochimie de l'expression d'EGFR n'a pas été réalisée.

- Cetuximab associé à la radiothérapie en cas de maladie localement avancée - Etude EMR 62 202-206

Cette étude randomisée, menée chez des patients atteints de carcinome épidermoïde de la tête et du cou localement avancé, a comparé l'association du cetuximab et de la radiothérapie (211 patients) à la radiothérapie seule (213 patients) (Bonner JA *et al.*, 2006).

Cetuximab était administré une semaine avant la radiothérapie à une dose initiale de 400 mg/m<sup>2</sup>, suivie d'une dose hebdomadaire de 250 mg/m<sup>2</sup> pendant le traitement par radiothérapie.

La durée médiane de stabilisation locorégionale était de 24,4 mois parmi les patients traités par cetuximab et radiothérapie, et de 14,9 mois parmi ceux ayant reçu la radiothérapie seule (risque relatif pour la progression locorégionale ou le décès : 0,68 ; p=0,005). Avec un suivi médian de 54 mois, la durée médiane de survie globale a été de 49 mois chez les patients traités par le traitement combiné, et de 29,3 mois chez ceux traités par radiothérapie seule (risque relatif pour le décès : 0,76 ; p=0,03). La radiothérapie associée à cetuximab a permis de prolonger significativement la survie sans progression (*tableau XIV*).

*Tableau XIV : données d'efficacité clinique, étude EMR 62 202-206*

	Radiothérapie seule (n=213)	Radiothérapie + cetuximab (n=211)	Risque relatif (p)
<b>Contrôle locorégional (mois)</b>			
Médiane (IC 95%)	14,9 (11,8 ; 19,9)	24,4 (15,7 ; 45,1)	0,68 (p=0,005)
<b>Survie (mois)</b>			
Médiane (IC 95%)	29,3 (20,6 ; 42,8)	49,0 (32,8 ; 62,6+)	0,76 (p=0,032)

+ : indique que la limite supérieure n'a pas été atteinte au moment de la clôture

- Cetuximab associé à une chimiothérapie à base de platine en cas de maladie récidivante et/ou métastatique - Etude EMR 62 202-002

Cette étude randomisée, menée chez des patients atteints de carcinome épidermoïde de la tête et du cou récidivant et/ou métastatique n'ayant pas reçu antérieurement de chimiothérapie pour traiter cette maladie, a comparé l'association cetuximab plus cisplatine ou carboplatine et une perfusion de 5-fluorouracile (222 patients) à cette chimiothérapie administrée seule (220 patients). Le traitement du groupe sous cetuximab était composé d'un maximum de 6 cycles de chimiothérapie à base de platine en association avec l'anticorps, suivis d'un traitement d'entretien par cetuximab jusqu'à progression de la maladie (*tableau XV*).

Tableau XV : données d'efficacité clinique, étude EMR 62 202-002

Variable / Statistique	Cetuximab + Chimiothérapie (n = 222)	Chimiothérapie (n = 220)
<b>Survie globale</b>		
Médiane (mois) (IC 95%)	10,1 (8,6 ; 11,2)	7,4 (6,4 ; 8,3)
Hazard Ratio (IC 95%)	0,797 (0,644 ; 0,986)	
valeur de p	0,0362	
<b>Durée de survie sans progression</b>		
Médiane (mois) (IC 95%)	5,6 (5,0 ; 6,0)	3,3 (2,9 ; 4,3)
Hazard Ratio (IC 95%)	0,538 (0,431 ; 0,672)	
valeur de p	< 0,0001	
<b>Taux de réponses objectives (RC+RP)</b>		
% (IC 95%)	35,6 (29,3 ; 42,3)	19,5 (14,5 ; 25,4)
valeur de p	0,0001	

RC = réponse complète / RP = réponse partielle

Les patients avec un bon pronostic, indiqué par le stade de la tumeur, l'indice de performance de Karnofsky (KPS) et l'âge, ont bénéficié de manière plus distincte de la chimiothérapie à base de platine quand cetuximab y était ajouté. Contrairement à la durée de survie sans progression, aucun bénéfice n'a été démontré en terme de durée de survie globale chez les patients avec un KPS ≤ 80 et âges de 65 ans et plus.

Les données cliniques pour l'utilisation de cetuximab seul chez des patients atteints de carcinome épidermoïde de la tête et du cou récidivant ou métastatique après échec à une chimiothérapie de première ligne ne sont pas suffisantes. Une étude à un seul bras a été conduite chez 103 patients atteints d'un cancer de la tête et du cou récidivant ou métastatique (Vermorken JB *et al.*, 2007). Le taux global de réponse était de 13%, le contrôle de la maladie (réponse complète, réponse partielle et stabilité de la maladie) était de 46% et la durée médiane sans progression était de 70 jours.

### **Cancer du poumon non à petites cellules**

Cétuximab a été utilisé en association avec docetaxel en deuxième ligne chez 54 patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules réfractaires ou résistants aux platines. Le traitement consistait en une administration de kétuximab (dose initiale à 400 mg/m<sup>2</sup> en perfusion intraveineuse suivie de 250 mg/m<sup>2</sup> par semaine) et docetaxel (75 mg/m<sup>2</sup> en perfusion intraveineuse toutes les trois semaines). L'analyse en intention de traiter a montré un taux de réponse objectif de 22% (IC à 95% : 12% - 36%), une médiane de survie sans progression de 2,6 mois et une médiane de survie globale de 7,6 mois (Kim ES *et al.*, 2003).

Cétuximab a également été étudié chez des patients présentant une maladie métastatique dans deux études de phase II, en combinaison avec gemcitabine plus carboplatine (Robert F *et al.*, 2003) et en combinaison avec paclitaxel plus carboplatine (Kelly K *et al.*, 2003). L'association

de cétuximab plus cisplatine et vinorelbine a été comparée à l'association cisplatine plus vinorelbine seul dans une étude de phase II randomisée (Gatzemeier U *et al.*, 2003). Les résultats sont présentés dans le tableau XVI.

Tableau XVI : études de phases II, cetuximab en association avec d'autres chimiothérapies

Traitement	Stade de la maladie	Nbre de patients	RC+RP n (%)	PFS médiane (mois)	OS médiane (mois)
Cetuximab* Gemcitabine (1000 mg/m <sup>2</sup> IV, jours 1 et 8) Carboplatine (AUC 5, jour 1) toutes les 3 semaines	IV	35	10 (29%)	5,5	10,3
Cetuximab* Paclitaxel (225 mg/m <sup>2</sup> IV, jour 1) Carboplatine (AUC 6, jour 1) toutes les 3 semaines	IV	31	9 (29%)	34,5	15,7
Cetuximab* Cisplatine (80 mg/m <sup>2</sup> IV, jour 1) Vinorelbine (25 mg/m <sup>2</sup> IV, Jours 1 et 8) toutes les 3 semaines <b>versus</b> Cisplatine (80 mg/m <sup>2</sup> IV, jour 1) Vinorelbine (25 mg/m <sup>2</sup> IV, Jours 1 et 8) tutes les 3 semaines	IIIb / IV	30	16 (53%)	NR	NR
		31	10 (32%)	NR	NR

\* dose initiale : 400mg/m<sup>2</sup> IV puis 250mg/m<sup>2</sup> IV par semaine

RC = réponse complète, RP = réponse partielle, PFS = survie sans progression, OS = survie globale, NR = non reporté

Ainsi, cetuximab peut être combiné, avec une tolérance acceptable, aux associations standard de chimiothérapies, pour le traitement des patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules.

#### 4.3.1.2.3 Effets indésirables de Cetuximab

- *Réactions liées à la perfusion*

Les symptômes apparaissent habituellement pendant et jusqu'à 1h après la fin de la première perfusion, mais peuvent apparaître après plusieurs heures et lors des perfusions suivantes.

- *Affections respiratoires*

De rares cas d'atteinte interstitielle pulmonaire ont été rapportés, sans lien de causalité évident avec cetuximab.

- *Réaction cutanée*

Des réactions cutanées ont été rapportées chez plus de 80% des patients. Elles se présentent principalement sous forme d'éruption acnéiforme et/ou moins fréquemment sous forme de prurit, de sécheresse cutanée, de desquamation, d'hypertrichose ou d'anomalies unguéales (par exemple paronychie). Environ 15% des réactions cutanées sont sévères, incluant des cas isolés de nécrose cutanée. La plupart des réactions cutanées se développent au cours des 3 premières semaines de traitement. En général, elles disparaissent sans séquelles au cours du temps suite à l'arrêt du traitement et ajustements posologiques. Ces réactions cutanées sont corrélées à un meilleur taux de réponse au traitement (*tableau XVII*).

*Tableau XVII : corrélation entre efficacité et réactions cutanées, étude EMR 62 202-007*

	Réponse au traitement %		Survie médiane (mois)	
	Cétuximab + irinotecan (n=218)	Cétuximab monothérapie (n=111)	Cétuximab + irinotecan (n=218)	Cétuximab monothérapie (n=111)
Pas de toxicité cutanée	6,3	0	3,0	2,5
Toxicité cutanée	26*	13*	9*	8*

\*p=0,005

#### 4.3.1.2.4 *Indications thérapeutiques de Cetuximab*

Erbix®<sup>®</sup>, en association avec irinotecan, est indiqué dans le traitement des patients présentant un cancer colorectal métastatique exprimant le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), après échec d'une chimiothérapie à base d'irinotecan.

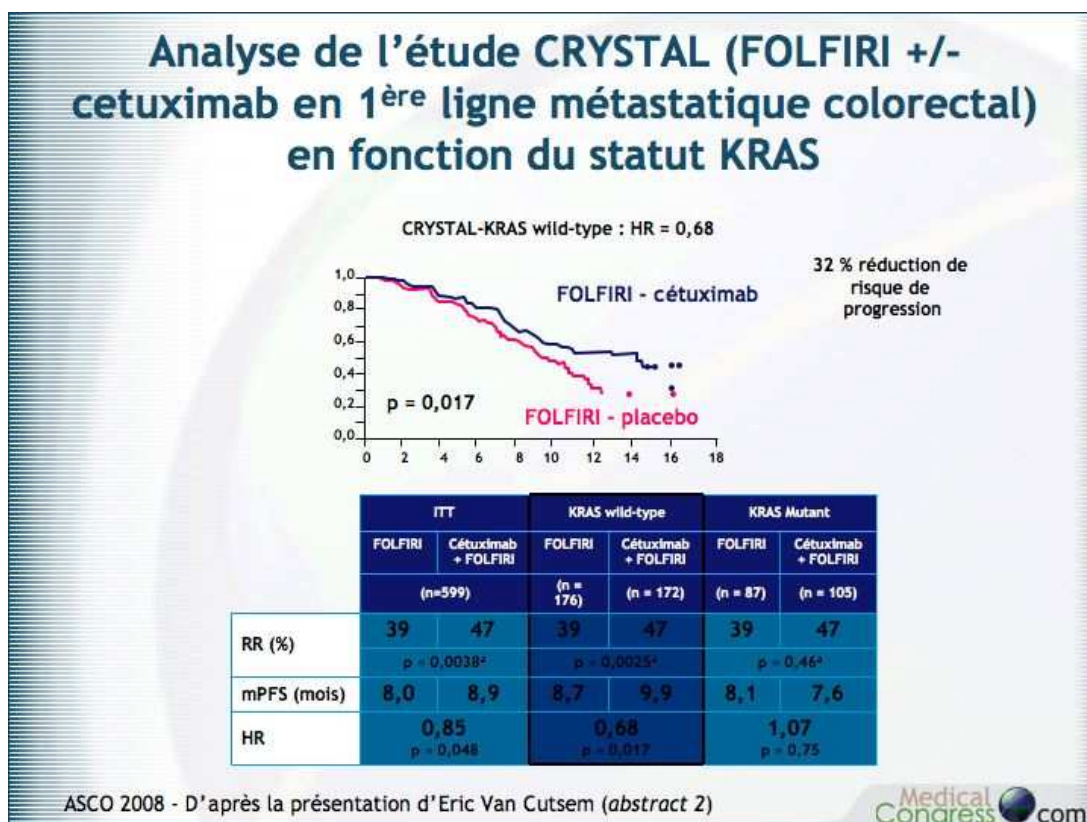
Erbix®<sup>®</sup>, en association avec la radiothérapie, est indiqué dans le traitement des patients présentant un carcinome épidermoïde localement avancé de la tête et du cou.

#### 4.3.1.2.5 *Mécanismes moléculaires prédictifs de la réponse au cetuximab*

Les mécanismes moléculaires prédictifs de la réponse à cetuximab dans les cancers colorectaux métastatiques sont actuellement mal définis. Le nombre de copies de HER1 et le statut mutationnel de KRAS ont été rapportés comme ayant une valeur prédictive de la réponse au traitement. La protéine produite par le proto-oncogène KRAS (Kristen rat sarcoma 2 viral oncogene homologue) joue un rôle central dans la transduction des signaux de l'EGFR en aval. Au sein des tumeurs, l'activation du gène KRAS par l'EGFR contribue à l'augmentation de la prolifération, de la survie et de la production des facteurs angiogéniques favorisés par l'EGFR. Le gène KRAS est l'un des oncogènes les plus fréquemment activés dans le cadre des cancers humains. Les mutations du gène KRAS au niveau de certains hot-spots (principalement les



codons 12 et 13) engendrent une activation constitutive de la protéine KRAS indépendamment des signaux de l'EGFR. Dans les cancers colorectaux métastatiques, l'incidence du gène KRAS est comprise entre 30 et 50%. A partir de l'étude CRYSTAL, une nouvelle analyse a été réalisée afin de rechercher si le statut KRAS pouvait avoir un impact sur l'efficacité de cetuximab. Le statut KRAS (muté versus sauvage) de la tumeur de 587 des 1198 patients ont été analysés ; 37,6% des tumeurs analysées ont présenté une mutation KRAS. Les données d'efficacité dans les deux bras en fonction du statut KRAS ont été revues et ainsi ont mis en évidence une différence très significative d'efficacité. Dans les formes KRAS non mutées, la différence en termes de survie sans progression est significativement en faveur du bras cetuximab (43% versus 25% pour la PFS à 1 an ;  $p=0,017$ ) soit une réduction de 32% du risque de progression. De la même façon, dans ce groupe la réponse tumorale est de 59% versus 43% dans le groupe FOLFORI seul ( $p=0,0025$ ) (figure n°22). En revanche, dans le groupe KRAS muté, aucun bénéfice à l'ajout de cetuximab n'a pu être mis en évidence, la survie sans progression est identique dans les deux groupes de même que le taux de réponse (Van Cutsem E *et al.*, 2009).



*Figure n°22 : résultats de l'étude CRYSTAL en fonction du statut KRAS*

#### 4.3.1.2.6 Autres anticorps monoclonaux ciblant EGFR en développement

D'autres anticorps monoclonaux ciblant EGFR sont actuellement en développement clinique ou préclinique, tels que Panitumumab (ABX-EGF), Matuzumab (EMD-72000), Nimotuzumab (h-R3), MDX-447 (un anticorps bispécifique dirigé contre l'EGFR) et le récepteur Fc et mAb806, qui reconnaît une forme mutée du EGFR, EGFRvIII (Rocha-Lima CM *et al.*, 2007) (*tableau XVIII*).

Tableau XVIII : développement d'anticorps monoclonaux ciblant EGFR

Anticorps Monoclonaux	Cible tumorale	Développement
Cetuximab (C225)	Cancer colorectal, tête et cou, poumon non à petites cellules, pancréas, sein, cervical, endomètre, gastrique, hépatocellulaire, ovaire, rénal	Approbation dans le cancer colorectal et de la tête et du cou  Phase II/III pour les autres indications
Panitumumab (ABX-EGF)	Cancer colorectal, rénal, poumon non à petites cellules	Approbation dans le cancer colorectal  Phase II/III
Matuzumab (EMD-72000)	Cancer de la tête et du cou, colorectal, poumon non à petites cellules, gastro-oesophage, ovaire, cervical	Phase I/II
Nimotuzumab (h-R3)	Gliome, cancer du poumon non à petites cellules	Phase I/II
MDX-447	Cancer de la tête et du cou	Phase I/II
mAb806	Gliome	préclinique

##### 4.3.1.2.6.1 Panitumumab – Vectibix®

Panitumumab est le premier anticorps entièrement humain utilisé en clinique. Il est produit par une souris transgénique appelée « xenomouse ». Il se fixe au domaine de liaison du ligand de l'EGFR et inhibe l'autophosphorylation du récepteur induite par tous les ligands connus de l'EGFR.

Panitumumab a été étudié lors d'une étude ouverte, internationale, de phase III, incluant 463 patients atteints d'un cancer du côlon et du rectum, exprimant EGFR, dont la maladie s'est aggravée durant ou après un traitement précédent incluant une fluoropyrimidine, oxaliplatine et irinotecan. Les patients ont été randomisés pour recevoir soit une administration de 6 mg/kg de panitumumab plus des soins palliatifs (n=231), soit des soins palliatifs seuls (n=232) jusqu'à

progression de la maladie ou décès. Les résultats de l'étude ont été analysés séparément pour 243 patients dont la tumeur présentait le gène KRAS non muté et pour 184 patients chez lesquels le gène KRAS comportait la mutation. Chez les patients avec gène KRAS non muté, panitumumab a prolongé la durée précédant la progression de la maladie ou le décès du patient : la moyenne était de 12,3 semaines chez les patients recevant panitumumab plus soins palliatifs contre 7,3 semaines chez ceux recevant seulement les soins palliatifs. En revanche, panitumumab n'a présenté aucun effet chez les patients porteurs du gène KRAS muté au niveau de leur tumeur, avec une durée moyenne de 7,3 semaines avant la progression de la maladie ou le décès dans les deux bras (Van Cutsem E *et al.*, 2007).

Vectibix® est indiqué en monothérapie pour le traitement des patients atteints de cancer colorectal métastatique exprimant EGFR et présentant le gène KRAS non muté (type sauvage) après échec des protocoles de chimiothérapie à base de fluoropyrimidine, oxaliplatine et irinotecan (Giusti RM *et al.*, 2007).

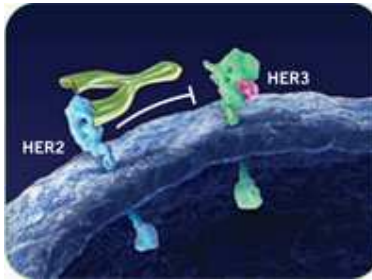
#### 4.3.1.2.6.2 Matuzumab

Matuzumab est un anticorps monoclonal humanisé qui cible EGFR. Cet anticorps monoclonal est actuellement en phase II, dans le cancer colorectal, pulmonaire et gastrique. En août 2007, Merck a annoncé que les résultats préliminaires de matuzumab associé à irinotecan dans le cancer colorectal métastatique étaient moins prometteurs que ce qui était attendu. Le développement dans le cancer colorectal est donc abandonné.

### **4.3.1.3 Inhibiteur de la dimérisation d'HER**

#### 4.3.1.3.1 Mécanisme d'action de pertuzumab

Pertuzumab, 2C4, est un anticorps humanisé de type IgG1 qui appartient à une nouvelle classe thérapeutique, les inhibiteurs de la dimérisation d'HER (*figure n°23*). Ils ont la caractéristique de se lier au domaine de la dimérisation du récepteur HER2 et ainsi de bloquer l'interaction entre HER2 et les autres membres de la famille des récepteurs HER (HER1/EGFR, HER2, HER3 et HER4). La dimérisation de HER est essentielle à l'activation de la tyrosine kinase (Adams CW *et al.*, 2006).



*Figure n23 : mécanisme d'action de pertuzumab*

Cette nouvelle classe d'agent, due à son mode d'action unique, a un potentiel d'action dans une grande variété de tumeurs, incluant celles ne surexprimant pas HER2. L'objectif ici est de cibler une voie spécifique et non un type de tumeur spécifique.

#### 4.3.1.3.2 Développement clinique de pertuzumab

### **Cancer du sein**

Les résultats d'une étude de phase II évaluant l'association de trastuzumab plus pertuzumab chez des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique HER2 positif, ayant progressé suite à un traitement par trastuzumab, a été présentée à Chicago lors du congrès international de l'ASCO 2008.

Les patientes avaient reçu leur dernier traitement par trastuzumab dans les 9 semaines précédant l'inclusion dans l'étude et pouvaient avoir eu au total 3 lignes de traitement incluant une chimiothérapie adjuvante. 66 patientes ont été incluses et ont reçu une administration intraveineuse de trastuzumab à 2 mg/kg chaque semaine ou 6 mg/kg toutes les 3 semaines, et une administration intraveineuse de pertuzumab à une dose de charge de 840 mg puis 420 mg toutes les 3 semaines.

Le critère principal était le taux de réponse et le bénéfice clinique ; les critères secondaires le temps de réponse, la durée de la réponse, le temps à la progression et la survie sans progression. Concernant le critère principal, une réponse objective a été observée chez 6 des 33 patientes évaluable (1 réponse complète et 5 réponses partielles). De plus, 7 patientes ont vu leur maladie se stabiliser pendant au moins 6 mois (et 10 patientes ont présenté une stabilisation d'une durée inférieure à 6 mois). La tolérance au traitement a été bonne, aucune des patientes n'est sortie de l'essai.

Cet essai de phase II est la base de l'étude CLEOPATRA (Clinical Evaluation of Pertuzumab And Trastuzumab), une étude de phase III randomisée en double aveugle, comparant l'association pertuzumab, trastuzumab et docetaxel versus placebo, trastuzumab et docetaxel, chez des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique HER2 positif non traité.

## **Cancer du poumon non à petites cellules**

Dans le cancer du poumon non à petites cellules, l'amplification du gène HER2 est présente dans seulement 2 à 5% des tumeurs. Ainsi, peu de patients atteints d'un cancer du poumon peuvent bénéficier de trastuzumab. Pertuzumab, du à son mécanisme d'action, peut avoir une activité anti-tumorale chez des patients présentant HER2 au niveau de la tumeur mais sans amplification du gène (Johnson BE and Jann PA, 2006).

Une étude de phase II évaluant l'efficacité et la tolérance de pertuzumab en monothérapie a été conduite chez 43 patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules localement avancé ou métastatique, préalablement traité. Pertuzumab a été administré à une dose de charge de 840 mg suivie de 420 mg toutes les 3 semaines. Sur les 43 patients traités, aucune réponse n'a été observée, 18 (41,9%) et 9 (20,9%) patients ont vu la maladie se stabiliser à 6 et 12 semaines respectivement. La médiane de survie sans progression était de 6,1 semaines. La tolérance fut bonne.

L'exploration de l'activité pharmacodynamique a également été évaluée par PET-scan (IF-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography) qui consiste à mesurer le métabolisme du glucose au niveau de la tumeur. Chez les 22 patients pour lesquels un PET-scan a été réalisé, 6 (27,3%) ont une réponse métabolique à pertuzumab (Herbst RS *et al.*, 2007)

## **Cancer de l'ovaire**

Une étude de phase II a évalué l'activité clinique de pertuzumab dans le cancer de l'ovaire avancé et réfractaire aux chimiothérapies à base de sel de platine. 61 patientes (bras 1) ont reçu pertuzumab à la dose de charge de 840 mg suivie de 420 mg toutes les 3 semaines ; et 63 patientes (bras 2) ont reçu pertuzumab à 1050 mg toutes les 3 semaines.

55 patientes dans le bras 1 et 62 patientes dans le bras 2 étaient évaluables pour l'analyse d'efficacité. 5 réponses partielles (taux de réponse de 4,3%) ont été observées, 8 patientes (6,8%) ont présenté une stabilité de la maladie pendant au moins 6 mois, et la diminution du CA 125 d'au moins 50% a été observé chez 10 patientes. La survie sans progression était de 6,6 semaines. 8 des 28 biopsies tumorales disponibles (28,6%) était HER2 positif. Pour les patientes HER2 positif, la survie sans progression était de 20,9 semaines contre 5,8 semaines pour les patientes HER2 négatif, et 9,1 semaines pour les patientes dont le statut HER2 était inconnu (Gordon MS *et al.*, 2006).

#### 4.3.1.4 Inhibiteur de l'IGF-1R

La liaison des ligands IGF-1 et IGF-2 induit l'activation du récepteur à tyrosine kinase IGF-1R, qui, au travers de la voie PI3K/AKT, provoque l'inhibition de l'apoptose et l'augmentation de la prolifération cellulaire. Cette activation augmente la résistance des cellules tumorales aux effets apoptotiques des chimiothérapies, radiations et thérapies hormonales. Le récepteur de l'IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) est sur-exprimé ou sur-activé dans de nombreux types de cancers (cancer du sein, de la prostate, du côlon, du poumon, des ovaires...).

Le récepteur de l'IGF-1 fait partie de la famille du récepteur de l'insuline (IR), avec lequel il présente 60% d'homologie. La liaison du ligand à son récepteur induit l'autophosphorylation du récepteur, ce qui stimule l'activité tyrosine kinase du récepteur envers des substrats intracellulaires. L'IGF-1R est généralement considéré comme un récepteur contrôlant la croissance cellulaire, alors que l'IR est plutôt considéré comme un récepteur contrôlant le métabolisme énergétique. Le risque théorique des anticorps monoclonaux anti-IGF-1R est d'interférer avec l'action de l'insuline malgré une forte spécificité pour l'IGF-1R et donc d'observer une hyperglycémie.

Plusieurs anticorps monoclonaux ciblant le récepteur IGF-1 sont actuellement en développement clinique dans divers cancers (*tableau XIX*).

*Tableau XIX : Anticorps monoclonaux ciblant l'IGF-1R en développement clinique*

	Phase de développement
<b>CP-721,871</b>	Phase III (cancer du poumon non à petites cellules) Phase II (cancer du sein, colorectal, prostate, sarcome d'Ewing)
<b>AMG 479</b>	Phase II (cancer du sein, lymphome, ovaires, pancreas, sarcoma)
<b>IMC-A12</b>	Phase II (cancer du sein, colorectal, tête et cou, foie, pancréas, prostate, sarcome)
<b>RI507</b>	Phase I
<b>BIIB022</b>	Phase I

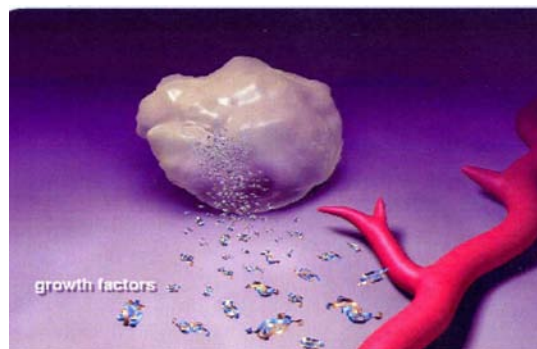
Les résultats de l'étude randomisée de phase II évaluant l'anticorps monoclonal CP-721,871 dans le cancer du poumon non à petites cellules sont encourageants. 178 patients ont reçu carboplatine plus paclitaxel associés à CP-721,871 (bras actif) et 143 patients ont reçu carboplatine plus paclitaxel seul (bras contrôle). Les patients ayant répondu ou présenté une stabilité de leur maladie dans le bras actif ont continué le traitement par CP-721,871, et les patients du bras contrôle ayant progressé étaient éligibles pour recevoir CP-721,871. Il a été observé un taux de réponse supérieur dans le bras actif (51% versus 36% ;  $p < 0,01$ ) ainsi qu'une survie sans progression meilleure (hasard ration = 1.18). CP-721,871 est actuellement en phase III dans le cancer du poumon non à petites cellules (Ma W et Adjei A, 2009).

### 4.3.2. Cible : l'angiogenèse

Une autre approche thérapeutique dans le traitement du cancer consiste à cibler le réseau vasculaire qui irrigue une tumeur. Des études ont montré que l'angiogenèse est un facteur pronostique dans diverses tumeurs, notamment le cancer du sein, du rein, de la prostate, du côlon et du cerveau, ainsi que dans le mélanome. En effet, des chercheurs ont constaté non seulement que le taux de récurrence des tumeurs fortement vascularisées était plus élevé que celui des tumeurs faiblement vascularisées, mais aussi que le phénotype angiogénique est déterminé très tôt au cours de l'évolution de la tumeur.

#### 4.3.2.1. Mécanisme de l'angiogenèse

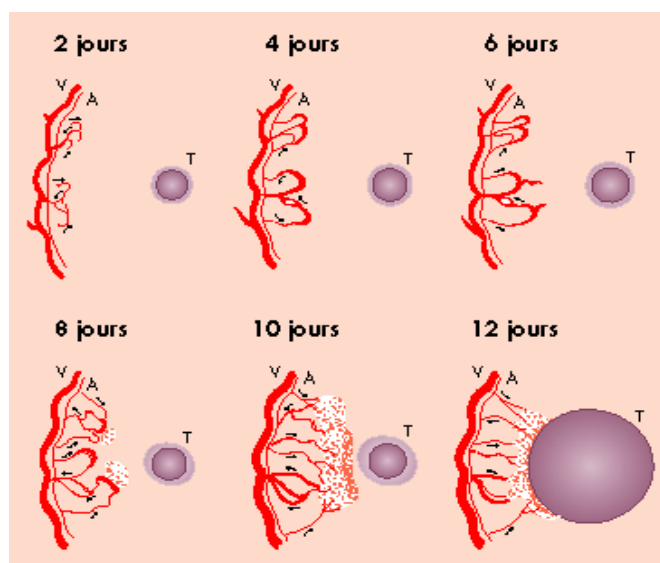
La formation de nouveaux vaisseaux sanguins est essentielle pour assurer le transport de l'oxygène, des éléments nutritifs et des déchets lorsque de nouveaux besoins se manifestent dans l'organisme. Ainsi, le développement d'une masse de cellules cancéreuses au-delà de 1 mm<sup>3</sup> dépend de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Ces néovaisseaux permettent à une tumeur de se brancher sur la circulation générale pour obtenir les éléments nutritifs indispensables à sa croissance (*figure n°24*). Sans l'approvisionnement sanguin, les tumeurs peuvent avoir de l'oxygène et des nutriments par diffusion, et ne grossissent pas plus de 1 à 2 mm (Kerbel R and Folkman J, 2002 ; Bergers G and Benjamin LE, 2003).



*Figure n°24 : initiation de l'angiogenèse*

Une des preuves expérimentales classiques de l'importance de l'angiogenèse pour le développement tumoral vient de l'observation du comportement d'un fragment de tumeur implanté dans un site avasculaire comme la cornée (Folkman J, 1990). Quelques jours après l'implantation, des nouveaux capillaires se forment par bourgeonnement à partir des vaisseaux

préexistants ; le volume de la tumeur augmente de façon exponentielle à partir du moment où les artérioles et les veinules vont l'atteindre, se connecter entre elles par anastomose et véhiculer le sang (*figure n°25*).



*Figure n°25 : réponse angiogénique observée dans une cornée de souris après implantation d'un fragment de tumeur à un millimètre environ des vaisseaux du limbus (Muthukkaruppan and Auerbach, 1979)*

L'implantation d'un fragment de tumeur dans la cornée montre que les cellules cancéreuses sont capables d'émettre des facteurs diffusibles qui induisent la formation de nouveaux vaisseaux. C'est effectivement à partir du milieu conditionné par des lignées de cellules en culture qu'ont été isolés plusieurs facteurs angiogéniques.

Pour l'ensemble de ces processus, le schéma général de l'angiogenèse reste le même. L'activation des cellules endothéliales conduit à la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire environnante. La migration orientée est suivie d'une phase proliférative. Les cellules se différencient ensuite en une structure de type capillaire pour former un réseau vasculaire nécessaire au développement des tissus. L'angiogenèse n'est pas contrôlée par un seul facteur, mais par une balance d'inducteurs et d'inhibiteurs produits par les cellules normales ou tumorales. On connaît aujourd'hui plus d'une douzaine de ces facteurs.

Parmi ces polypeptides, le facteur de croissance des fibroblastes-2 (FGF-2) et le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) sont apparus comme étant des régulateurs clés de l'angiogenèse (*figure n°26*) (Bergers G and Benjamin LE, 2003).





Figure n°26 : facteur de croissance endothéliale vasculaire, VEGF

Lors de sa sécrétion par la tumeur, le facteur de croissance endothéliale vasculaire se lie aux récepteurs des cellules endothéliales des vaisseaux les plus proches, entraînant directement la prolifération de cellules endothéliales et la stimulation de la croissance de nouveaux vaisseaux (*figure n°27*) (McMahon G, 2000).

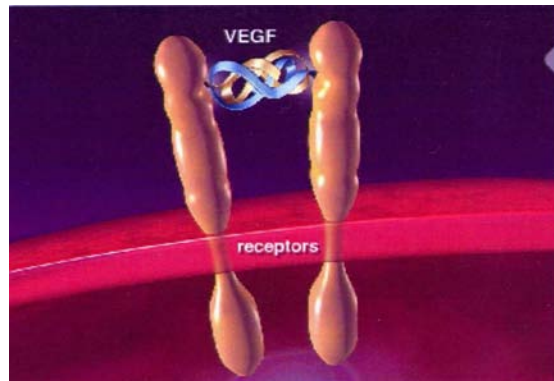


Figure n°27 : rôle du VEGF

Les nouveaux capillaires envahissent et entourent la tumeur, permettant ainsi sa croissance et offrant aux cellules cancéreuses une voie pour s'échapper de la tumeur primitive et aller établir des métastases (*figure n°28*) (Kerbel R and Folkmann J, 2002 ; McMahon G, 2000).

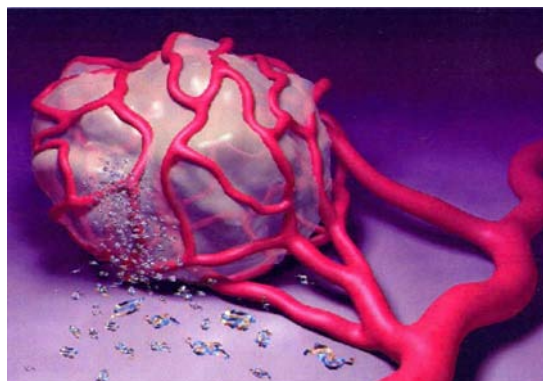
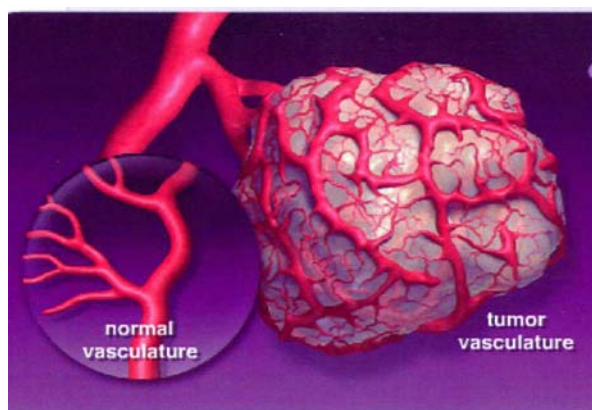


Figure n°28 : angiogenèse et croissance tumorale

Dans une tumeur, la vascularisation est généralement inadéquate : construite dans la hâte, elle est tortueuse, mal organisée et comporte des shunts artérioveineux (*figure n°29*). Elle oppose souvent une résistance importante au flux sanguin. La pression des fluides interstitiels est forte à cause de la forte perméabilité de ces vaisseaux et aussi de l'absence de vaisseaux lymphatiques. Cette pression facilite l'exportation, et freine l'importation des médicaments anticancéreux (Bergers and Benjamin LE, 2003 ; McMahon G, 2000).



*Figure n°29 : vascularisation normale et tumorale*

C'est au début des années 70 que Judah Folkman a suggéré que la croissance tumorale dépend de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Selon cette hypothèse, on devrait pouvoir « poser des garrots sur les tumeurs » pour les détruire.

Le traitement fondé sur l'anti-angiogénèse offre plusieurs avantages par rapport aux thérapies anticancéreuses classiques : une spécificité d'action antitumorale, une cible plus facilement accessible, un risque moins élevé de résistance, une efficacité dans le traitement d'association avec des anticancéreux classiques et la possibilité de chimioprophylaxie.

#### **4.3.2.2. Description et mécanisme d'action de bevacizumab**

Bevacizumab est le premier anticorps monoclonal IgG1 recombinant humanisé (93% d'origine humaine et 7% d'origine murine), qui se lie au facteur de croissance endothéliale vasculaire humain (VEGF) empêchant ainsi l'interaction avec ses récepteurs présents à la surface des cellules endothéliales (*figure n°30*).

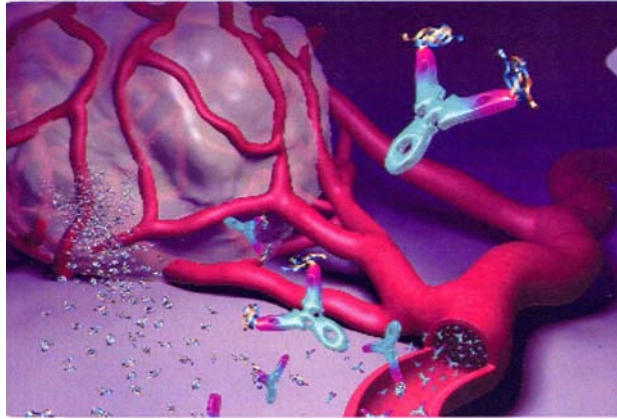


Figure n°30 : inhibition de VEGF

Le blocage de VEGF provoque la réduction de la croissance microvasculaire, la diminution de la densité vasculaire, du diamètre et de la perméabilité (*figure n°31*). Cet effet vasculaire réduit l'approvisionnement sanguin vital tumoral (Jain RK, 2001).

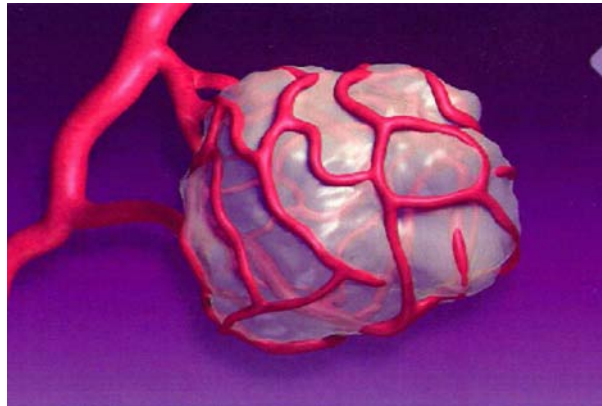


Figure n°31 : régression de la nouvelle vascularisation

La réduction de la distribution d'oxygène et des nutriments à la tumeur due à une vascularisation inadéquate, inhibe la croissance tumorale (*figure n°32*) (Kerbel R. and Folkmann J, 2002).

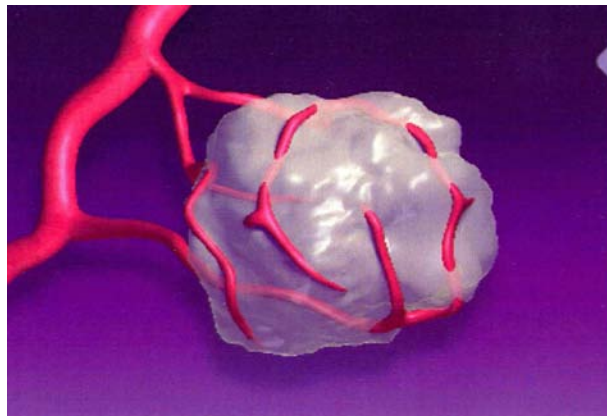


Figure n°32 : vascularisation inadéquate

### 4.3.2.3. Développement clinique de bevacizumab

#### Cancer colorectal métastatique

▪ Bevacizumab associé à irinotecan et 5-fluorouracile - Etude AVF2107g

Cette étude de phase III, randomisée, en double aveugle, a évalué l'association de bevacizumab (à la dose de 5 mg/kg toutes les 2 semaines) avec une chimiothérapie IFL (irinotecan 125 mg/m<sup>2</sup> + 5-fluorouracile 500 mg/m<sup>2</sup> en bolus + acide folinique 20 mg/m<sup>2</sup> de façon hebdomadaire pendant 4 semaines consécutives, toutes les 6 semaines) contre la chimiothérapie IFL seule chez des patients non prétraités pour un cancer colorectal métastatique (Hurwitz H *et al.*, 2004).

923 patients ont été randomisés dans l'un des 3 bras suivants (*figure n°33*) :

- IFL + placebo (n=411)
- IFL + bevacizumab (n=402)
- 5-FU/acide folinique + bevacizumab (n=110)

Une analyse intermédiaire portant sur la tolérance était prévue dans le protocole de l'étude avec arrêt de l'inclusion dans le 3<sup>ème</sup> bras, 5FU/AF + bevacizumab, lorsque la tolérance de bevacizumab associé au schéma IFL a été établie et jugée acceptable.

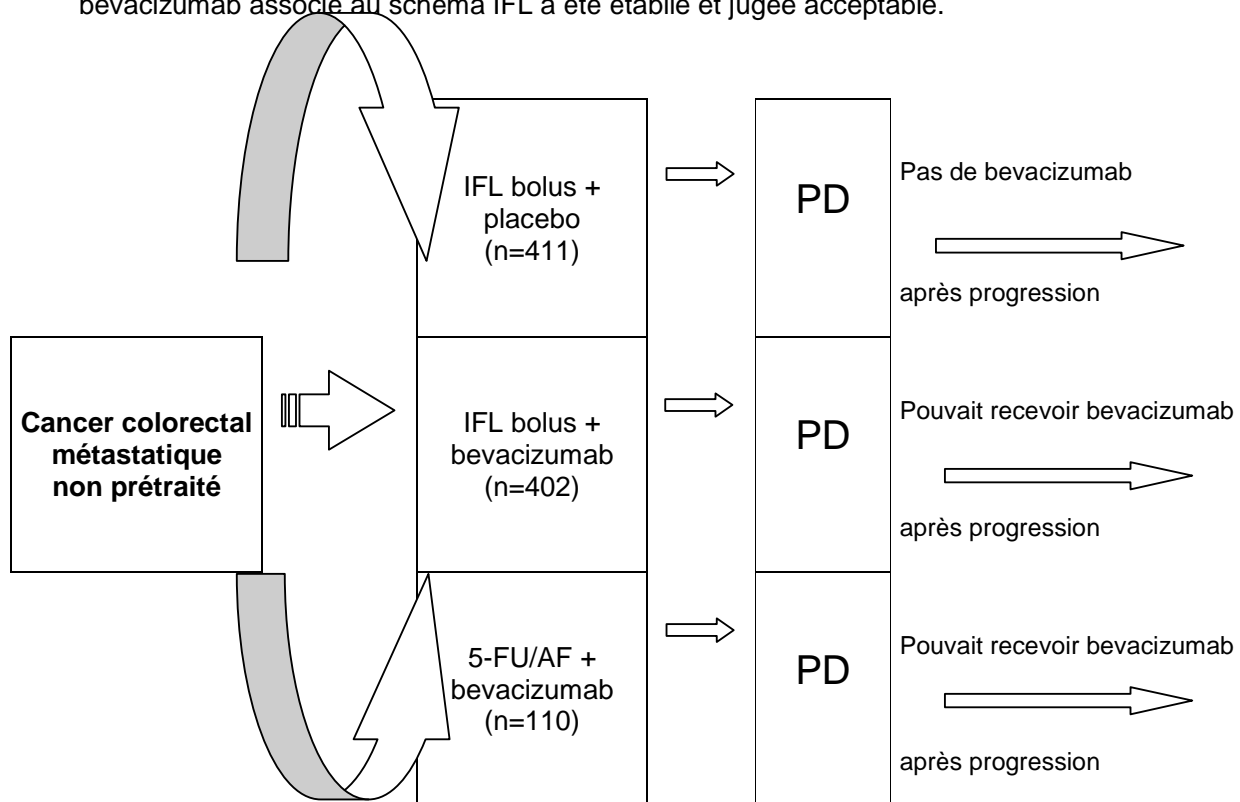


Figure n°33 : schéma de l'étude AVF2107g

Dans les trois bras, le traitement était poursuivi jusqu'à progression de la maladie, et dans un maximum de 96 semaines (sauf en cas de toxicité inacceptable, de décès ou du refus du patient à poursuivre le traitement), après quoi les patients pouvaient recevoir une seconde ligne de traitement dont le choix était laissé à l'appréciation de l'investigateur.

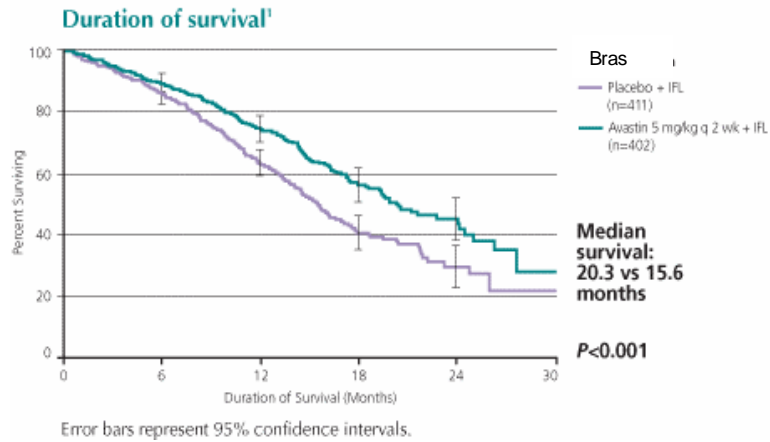
Le critère principal de cette étude était de comparer la durée de survie globale. Les critères secondaires étaient l'étude de la survie sans progression, du taux de réponse globale, de la durée de la réponse, de la qualité de vie et de la tolérance.

L'association IFL + bevacizumab a démontré une supériorité statistiquement significative par rapport à l'IFL seul sur l'ensemble des critères d'évaluation de l'étude. En effet, l'addition de bevacizumab au schéma IFL augmente significativement la médiane de survie globale de 15,6 mois à 20,3 mois ( $p < 0,001$ ) (*figure n°34*), prolonge significativement la médiane de survie sans progression de 6,2 mois à 10,6 mois ( $p < 0,001$ ) (*figure n°35*), améliore significativement le taux de réponse globale de 34,8% à 44,8% ( $p = 0,004$ ) et augmente significativement la médiane de durée de réponse de 7,1 mois à 10,4 mois ( $p = 0,001$ ) (*tableau XX*).

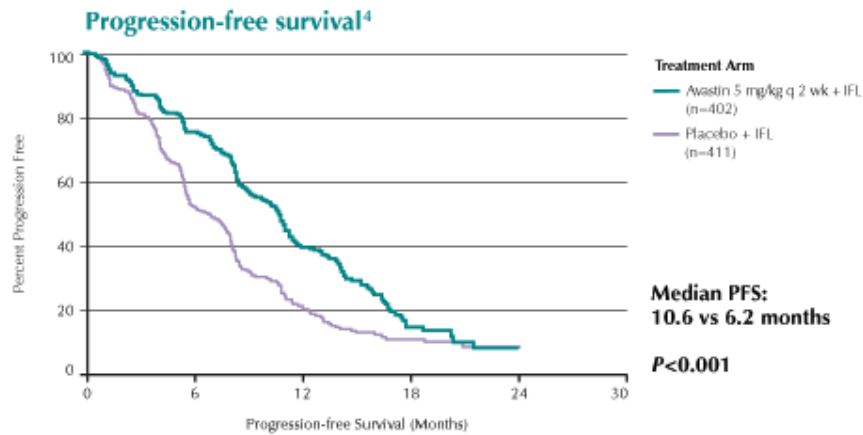
*Tableau n°XX : analyse de l'efficacité, étude AVF2107g*

	IFL / placebo n = 411	IFL / Avastin® n = 402	p
<b>Survie globale</b>			
Temps médian (mois)	15,6	20,3	<0,001
IC à 95%	14,29 - 16,99	18,46 - 24,18 RR=0,66	
<b>Survie à 1 an (%)</b>	63,4	74,3	<0,001
<b>Survie sans progression</b>			
Temps médian (mois)	6,2	10,6	<0,001
		RR=0,54	
<b>Taux de réponse globale (%)</b>	34,8	44,8	0,004
IC à 95%	30,2 - 39,6	39,9 - 49,8	
<b>Réponse complète</b>	2,2	3,7	
<b>Réponse partielle</b>	32,6	41,0	
<b>Médiane de durée de réponse (mois)</b>	7,1	10,4	0,001

RR = risque relatif (par rapport au groupe témoin)



*Figure n°34 : survie globale, étude AVF2107g*



*Figure n°35 : survie sans progression, étude AVF2107g*

De plus, l'addition de bevacizumab au schéma IFL augmente le taux de survie à 1 an de 63,4% à 74,3%.

Chez les 110 patients randomisés dans le groupe 3 (5-FU/AF + bevacizumab), la médiane de survie globale a été de 18,3 mois, la médiane de survie sans progression de 8,8 mois, le taux de réponse global de 39% et la durée de réponse de 8,5 mois.

- Bevacizumab associé à 5-fluorouracile et oxaliplatine - Etude E3200

Cette étude clinique de phase III, randomisée, contrôlée en ouvert, a étudié l'association de bevacizumab (10 mg/kg) à la leucovorine (200 mg/m<sup>2</sup>), au 5-fluorouracile en bolus (400 mg/m<sup>2</sup>) puis en perfusion (600 mg/m<sup>2</sup> pendant 22h), et à l'oxaliplatine (85 mg/m<sup>2</sup>) versus FOLOFX-4 seul, administrés toutes les 2 semaines, chez des patients atteints d'un cancer colorectal avancé en seconde ligne (Giantonio BJ *et al.*, 2007).

Le critère principal de cette étude était la survie globale, définie entre le temps de la randomisation et celui du décès, quelle que soit la cause. 829 patients ont été randomisés dans trois bras de traitement différents (292 patients dans le bras FOLFOX-4, 293 dans le bras bevacizumab plus FOLFOX-4 et 244 dans le bras bevacizumab en monothérapie). L'ajout de bevacizumab à FOLFOX-4 a prolongé la survie de manière significative. Une augmentation significative de la survie sans progression et du taux de réponse objective ont également été observés (*tableau XXI*)

***Tableau XXI : résultats d'efficacité de l'étude E3200***

	<b>FOLFOX-4 (n=292)</b>	<b>FOLFOX-4 + bevacizumab (n=293)</b>
<b>Survie globale</b>		
Temps médian (mois)	10,8	13,0
IC 95%	10,12 – 11,86	(12,09 – 14,03)
Risque relatif	0,751 (p=0,0012)	
<b>Survie sans progression</b>		
Temps médian (mois)	4,5	7,5
Risque relatif	0,518 (p< 0,0001)	
<b>Taux de réponse objective</b>	8,6%	22,2%
	(p< 0,0001)	

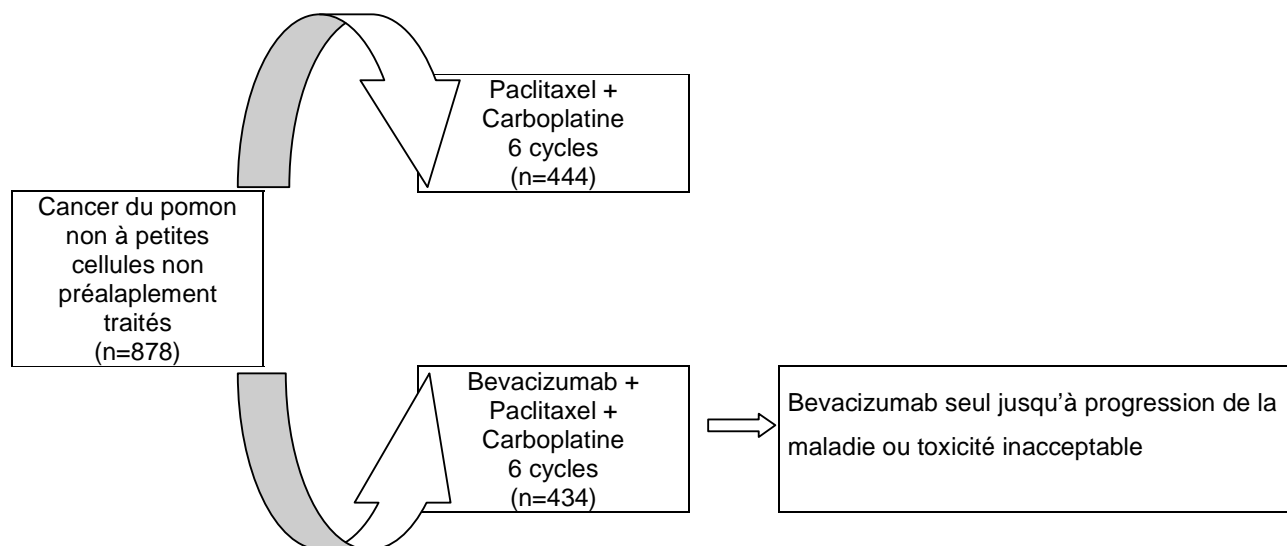
Aucune différence significative n'a été observée en terme de durée de survie globale entre les patients qui ont reçu bevacizumab en monothérapie comparés à ceux traités avec FOLFOX-4. La survie sans progression et le taux de réponse objective ont été inférieurs dans le groupe avec bevacizumab en monothérapie comparé à celui de FOLFOX-4.

### **Cancer du poumon non à petites cellules**

- **Bevacizumab associé à paclitaxel et carboplatine - Etude E4599**

L'étude E4599 est une étude de phase III, ouverte, randomisée et contrôlée, dans laquelle ont été inclus 878 patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules localement avancé, métastatique ou récurrent, non préalablement traité, d'histologie non à prédominance épidermoïde (Sandler AB *et al.*, 2005).

Les patients ont été randomisés pour recevoir paclitaxel (200mg/m<sup>2</sup> toutes les trois semaines) plus carboplatine (AUC = 6 toutes les trois semaines) avec ou sans bevacizumab à 15 mg/kg toutes les trois semaines, pendant six cycles, suivi de bevacizumab à 15 mg/kg toutes les trois semaines jusqu'à progression de la maladie dans le groupe bevacizumab plus chimiothérapie (figure n°36).



*Figure n°36 : schéma de l'étude E4599*

Les résultats ont montré que les patients recevant bevacizumab en association à paclitaxel et carboplatine ont bénéficié d'une amélioration de 25% au niveau de la survie globale, critère d'évaluation principal de l'étude, par rapport aux patients sous chimiothérapie seule. La survie médiane des patients traités par bevacizumab plus chimiothérapie a été de 12,3 mois contre 10,3 mois chez les patients sous chimiothérapie seule.

L'étude a également montré une amélioration de 54% au niveau de la survie sans progression. Le taux de réponse chez les patients avec une tumeur mesurable était de 29% dans le groupe bevacizumab plus chimiothérapie, contre 13% dans le groupe chimiothérapie seule.

Roche a mis en route une nouvelle étude, dite AVAiL, qui doit explorer le potentiel d'un nouveau protocole associant bevacizumab à une autre chimiothérapie combinée à base de platine (cisplatine/gemcitabine). AVAiL est une étude internationale, multicentrique, de phase III, randomisée et contrôlée, visant à explorer chez 1050 patients non préalablement traités, atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules au stade avancé, l'effet de deux doses de bevacizumab (7,5 ou 15 mg/kg toutes les trois semaines) administré en association avec gemcitabine et cisplatine. L'objectif principal de cette étude est de démontrer la supériorité – en terme de survie sans progression – de l'association par rapport au groupe témoin.



## Cancer du sein métastatique

- Bevacizumab associé à paclitaxel - Etude E2100

Cette étude était une étude de phase III, ouverte, randomisée, contrôlée, évaluant bevacizumab en association à paclitaxel en première ligne du cancer du sein métastatique ou en rechute locale (Sledge G, 2005). Les patientes étaient randomisées pour recevoir soit paclitaxel en monothérapie (90 mg/m<sup>2</sup> une fois par semaine, trois semaines sur quatre) soit paclitaxel en association à bevacizumab (10 mg/kg toutes les deux semaines) jusqu'à progression de la maladie. Un traitement antérieur de la maladie métastatique par hormonothérapie était autorisé. Un traitement adjuvant antérieur par taxane était autorisé, uniquement s'il avait été terminé au moins 12 mois avant l'entrée dans l'étude. Parmi les 722 patientes de l'étude, la majorité (90%) avait un statut HER2 négatif. Un petit nombre de patientes avait un statut inconnu (8%) ou un statut HER2 positif confirmé (2%) et avait été précédemment traitées par trastuzumab ou considérées comme non éligible au trastuzumab. Par ailleurs, 65% des patientes avaient reçu une chimiothérapie adjuvante comportant des taxanes (19%) et des anthracyclines (49%). Dans le cas où un arrêt prématuré de la chimiothérapie était nécessaire, le traitement par bevacizumab en monothérapie était poursuivi jusqu'à progression. L'objectif principal de l'étude était la survie sans progression.

Les résultats de cette étude sont présentés dans le tableau XXII.

*Tableau XXII : résultats d'efficacité de l'étude bevacizumab/paclitaxel versus paclitaxel seul*

	<b>Bevacizumab plus Paclitaxel (n=368)</b>	<b>Paclitaxel (n=354)</b>	<b>p</b>
Survie sans progression (mois) Médiane	11,3	5,8	<0,0001
Survie (mois) Médiane	26,5	24,8	0,1378

## Cancer du rein avancé et/ou métastatique

- Bevacizumab associé à interféron alfa-2a - Etude BO17705

Cette étude était une étude randomisée de phase III, en double aveugle, qui a évalué l'efficacité de bevacizumab en association à l'interféron (IFN) alfa-2a comparativement à l'IFN alfa-2a seul, en traitement de première ligne du cancer du rein métastatique. Bevacizumab, à la posologie de 10 mg/kg toutes les 2 semaines, était administré jusqu'à la progression de la maladie. L'IFN

alfa-2a était administré pendant 52 semaines ou jusqu'à progression de la maladie à une posologie initiale recommandée de 9 MUI trois fois par semaine, avec une réduction de la dose à 3 MUI autorisé en deux paliers. A la date de l'analyse, 505 progressions de la maladie avaient été observées (sur 649 patients inclus), 111 patients étaient encore en cours de traitement, 287 avaient arrêté le traitement (les arrêts de traitement dus à des événements indésirables étaient de 12% sous IFN alfa-2a seul contre 28% pour l'association IFN alfa-2a plus bevacizumab) et 251 patients étaient décédés. Comme pré-spécifié dans le protocole, la dose d'IFN alfa-2a a été réduite de 9 MUI à soit 6 MUI, soit 3 MUI trois fois par semaines chez 97 patients du groupe IFN alfa-2a et 131 patients du groupe bevacizumab. D'après le taux de survie sans progression de la maladie au cours du temps, cette réduction de la dose d'IFN alfa-2a ne semble pas avoir eu d'effet sur l'efficacité de l'association bevacizumab et IFN alfa-2a. Les 131 patients du groupe bevacizumab plus IFN alfa-2a ayant reçu une dose d'IFN alfa-2a réduite à 6 ou 3 MUI, maintenu dans l'étude, ont eu un taux de survie sans progression de la maladie à 6,12 et 18 mois respectivement 73, 52 et 21% comparé à 61, 43, 17% dans la population totale de patients ayant été traités par bevacizumab plus IFN alfa-2a. L'association de bevacizumab à l'IFN alfa-2a a significativement augmenté la survie sans progression de la maladie et le taux de réponse tumorale objective (*tableau XXIII*)

*Tableau XXIII : résultats d'efficacité de l'étude BO17705*

	Placebo + IFN (n=322)	Bevacizumab + IFN (n=327)	Valeur de p
<b>Survie sans progression</b>			
Médiane (mois)	5,4	10,2	< 0,0001
<b>Taux de réponse objective (%)</b>			
Nbre de patients avec une lésion mesurable	289	306	
Taux de réponse	12,8%	31,4%	< 0,0001

#### **4.3.2.4. Effets indésirables de bevacizumab**

Les effets indésirables les plus graves rapportés chez les patients ayant reçu bevacizumab en monothérapie ou associé à une chimiothérapie, étaient des perforations gastro-intestinales, des hémorragies, dont des hémorragies pulmonaires/hémoptysies, plus fréquentes chez les patients atteints d'un cancer bronchique non à petites cellules, et des thromboembolies artérielles.

La survenue d'une hypertension artérielle et d'une protéinurie lors du traitement par bevacizumab est probablement dose-dépendante.

#### **4.3.2.5. Indications thérapeutiques de bevacizumab**

Avastin® est indiqué :

- chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique, en association à une chimiothérapie intraveineuse à base de fluoropyrimidine ;
- chez les patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules avancé et non opérable, métastatique ou en rechute, en association à une chimiothérapie à base de sels de platine, dès lors que l'histologie n'est pas à prédominance épidermoïde ;
- en traitement de première ligne, chez les patientes atteintes de cancer du sein métastatique, en association à paclitaxel ;
- en traitement de première ligne, chez les patients atteints de cancer du rein avancé et/ou métastatique, en association à l'interféron alfa-2a.

#### **4.3.2.6. Facteurs pronostiques et prédictifs**

Lors de l'étude E4599, dans le cancer du poumon non à petites cellules, des marqueurs ont été analysés avant prise du traitement et à semaine 7 : VEGF plasmatique, bFGF (basic fibroblast growth factor), ICAM (intercellular adhesion molecule-1) et E-Selectine (Dowlati A *et al.*, 2006). Les mesures ont été faites chez 166 patients avant traitement et 112 patients post-traitement. Seul le marqueur ICAM montre une association significative avec une réponse. Les patients avec un niveau faible d'ICAM à la baseline, dans les deux bras, ont une réponse de 29% versus 13% pour les patients avec un niveau élevé d'ICAM ( $p=0,03$ ), et une survie significativement plus importante ( $p=0,00005$ ). La survie à un an est de 65% dans le groupe de patients qui présentent un niveau faible d'ICAM versus 25% dans le groupe présentant un niveau élevé.

### 4.3.3. Cible : l'apoptose

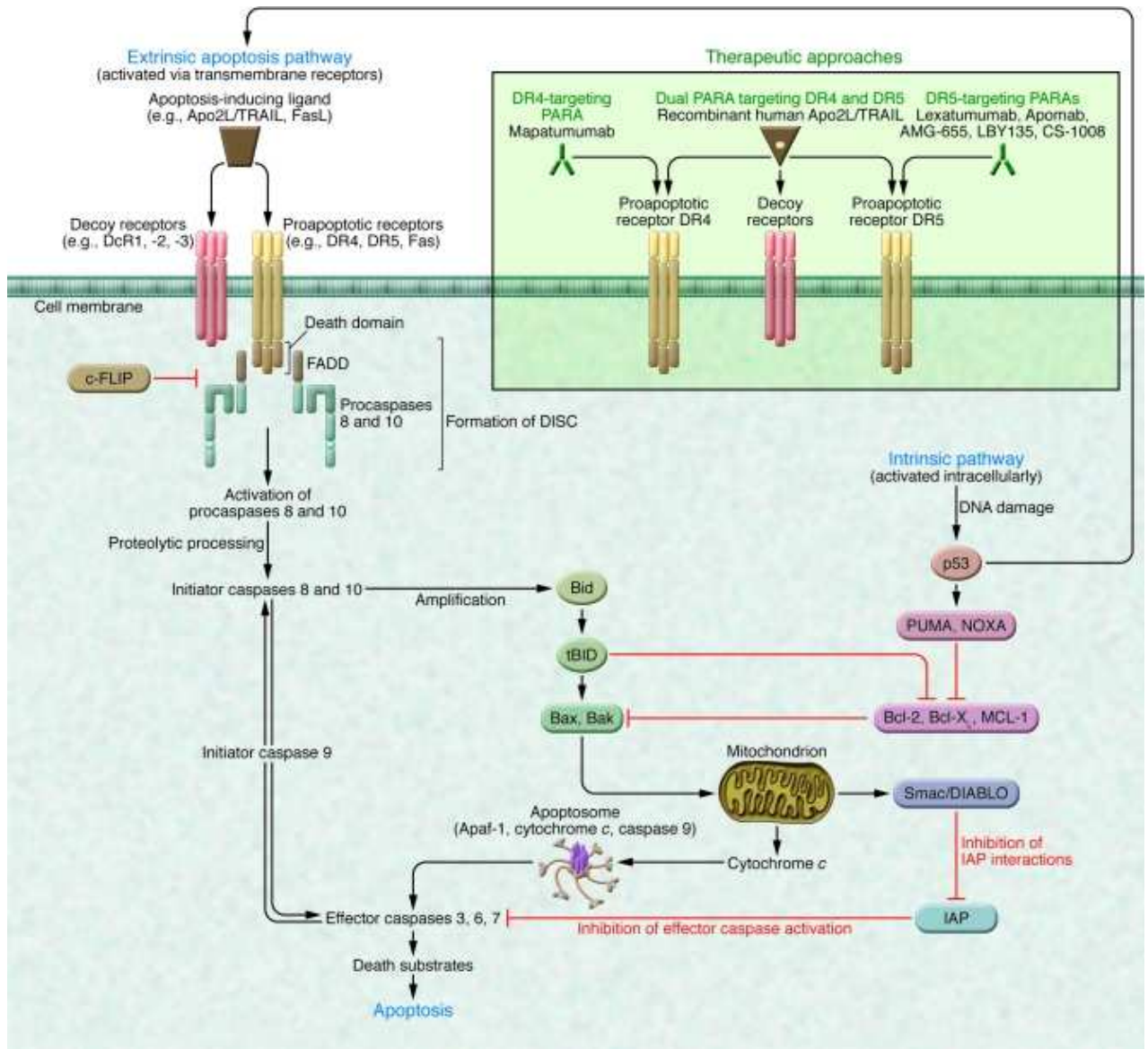
L'apoptose est un processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. C'est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire.

L'apoptose est médiée par une famille de protéases à cystéines appelées caspases. Pour que l'apoptose soit sous contrôle, les caspases initiateuses, telles que les caspases 8, 9 et 10, sont activées par oligomérisation, les précurseurs sont clivés pour donner des caspases effectrices telles que les caspases 3, 6 et 7.

Le mécanisme d'apoptose est gouverné par deux voies principales d'activation (*figure n°37*).

Une voie extrinsèque qui est activée par des récepteurs de mort cellulaire (appartenant au sous-groupe de la famille des récepteurs TNF, facteur de nécrose des tumeurs) présents à la surface de la cellule. La fixation de ligands, tels que FasL (ou CD95L) ligand Apo2/TRAIL sur leur récepteur, récepteur Fas et récepteurs DR4 et DR5 respectivement, induit le recrutement de la protéine adaptatrice FADD (Fas associé au domaine de mort, *Fas associated death domain*) et des procaspases initiateuses (caspases 8 et 10) pour la synthèse d'un complexe multimoléculaire appelé DISC (Complexe induisant le signal de mort, *Death Signaling Inducing Complex*) qui permet l'activation des caspases initiateuses responsables du déclenchement de l'apoptose.

Une voie intrinsèque qui est activée par différents stress intra ou extracellulaires tels que l'hypoxie, un endommagement de l'ADN ou des oncogènes. Ces stimuli provoquent l'augmentation de la protéine p53, facteur de transcription. Elle fonctionne en se fixant de manière spécifique sur les régions régulatrices de différents gènes tels que *puma*, *nox*, *Bax*, *fas* et *DR5*. Bax, en se dimérisant, va perforer la membrane mitochondriale et va engendrer un relargage de cytochrome C ainsi que d'autres molécules proapoptotiques, la formation de l'apoptosome (composé de cytochrome C, de APAF1, facteur activateur des protéases apoptotique 1, et de caspase 9) et l'activation des caspases 3, 6 et 7. Cependant, cette voie est contrôlée par interaction entre des protéines de la famille Bcl-2 pro- et antiapoptotique. Ainsi, les protéines Bcl-2, Bcl-X et MCL-1, en inhibant Bax, vont promouvoir la survie de la cellule.



*Figure n°37 : voie extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose*

L'activation de l'apoptose est une cible intéressante dans le traitement des cancers. C'est le principe de la chimiothérapie et de la radiothérapie qui stimule l'apoptose par la voie intrinsèque. Cependant, près de 50% des cancers humains ont une p53 mutée qui a perdu ses capacités apoptotiques et qui explique une résistance de la tumeur aux traitements par chimiothérapie et radiothérapie. La voie extrinsèque étant indépendante de la protéine p53, le développement d'une thérapie ciblant directement cette voie extrinsèque paraît prometteuse. Le ligand FasL a montré une activité cytotoxique dans différents types cellulaires tumoraux, mais une toxicité hépatique observée limite l'utilisation thérapeutique.

La stimulation des récepteurs proapoptiques DR4 et DR5 (*figure n°38*) semble moins toxique. L'expression de DR4 et DR5 est plus élevée à la surface des cellules cancéreuses comparée à la surface des cellules normales. Plusieurs anticorps monoclonaux ciblant le récepteur DR4 (mapatumumab) ou le récepteur DR5 (lexatumumab, apomab et AMG 655) utilisés en monothérapie ou en association à une chimiothérapie sont actuellement en développement clinique dans le lymphome non-hodgkinien ou dans des tumeurs solides (cancer colorectal et cancer du poumon non à petites) (Ashkenazi A and Herbst RS, 2008).



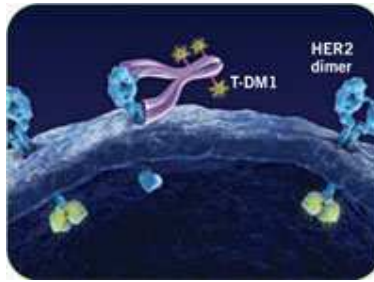
*Figure n°38 : mécanisme d'action de l'apomab*

#### **4.4. Anticorps monoclonaux conjugués**

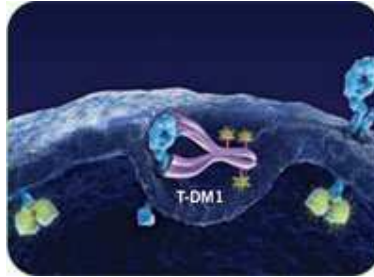
##### **4.4.1. Anticorps monoclonaux vecteurs de médicaments ou de toxines**

De nombreux agents antimétaboliques ou toxines ont été couplés à des anticorps monoclonaux. La difficulté de développer ces anticorps monoclonaux couplés réside dans la standardisation de l'activité cytotoxique obtenue. Actuellement, un anticorps monoclonal couplé à une toxine est en développement clinique.

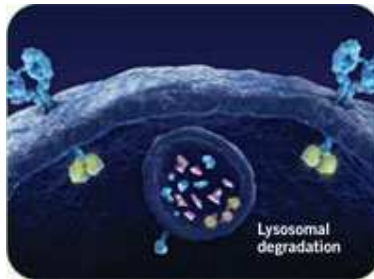
T-DM1 est un anticorps monoclonal, trastuzumab, conjugué à un agent cytotoxique anti-microtubule (dérivé maytansine) qui cible les récepteurs HER2. Une fois l'anticorps fixé sur son récepteur, le complexe récepteur-anticorps-agent cytotoxique va être internalisé dans le cytoplasme de la cellule par endocytose. Le complexe va subir une protéolyse par des lysosomes ce qui va permettre la libération de la maytansine et inhiber la polymérisation de la tubuline de la cellule et donc stopper le cycle cellulaire (*figure n°39*).



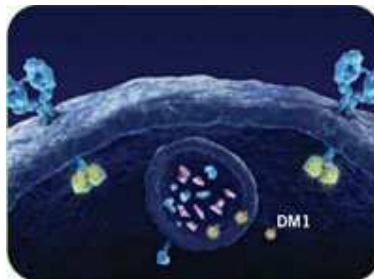
Fixation de T-DM1 sur le récepteur HER2



Endocytose du complexe récepteur-T-DM1



Dégradation lysosomale



Libération de DM1 dans le cytosol de la cellule

***Figure n°39 : mécanisme d'action de Trastuzumab-DM1***

Des résultats intermédiaires de l'étude clinique de phase II étudiant l'efficacité en monothérapie du trastuzumab-DM1 chez des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique HER2 positif, préalablement traitées par une thérapie ciblant HER2, ont été présentés lors du congrès international de San Antonio 2008 (Abstract 33, Vukelja S, 2008). Le critère principal de cette

étude est l'évaluation du taux de réponse objective (ORR) revu par un comité radiologique indépendant. 112 patientes ont reçu T-DM1 à 3,6 mg/kg toutes les 3 semaines.

Les résultats sont présentés dans les tableaux XXIV et XXV.

*Tableau XXIV : caractéristique des patientes, T-DM1 en monothérapie*

Thérapie précédente	N = 112
Nombre médian de chimiothérapies pour la maladie métastatique	3 (1-12)
Taxane, n (%)	94 (83,9)
Anthracycline, n (%)	78 (69,6)
Durée de traitement médian par trastuzumab, mois	17,8 (1-152)
Lapatinib, n (%)	67 (59,8)
Durée de traitement médian par lapatinib, mois	6,0 (1-24)

*Tableau XXV : données d'efficacité, T-DM1 en monothérapie*

	Evaluation par une radiologue indépendant N (%)	Evaluation par les investigateurs N (%)
Meilleure réponse objective		
Réponse complète	0	3 (2,7)
Réponse partielle	28 (25,0)	40 (35,7)
Maladie stable	54 (48,2)	43 (38,4)
Progression de la maladie	21 (18,8)	22 (19,6)
Non évaluable	9 (8,0)	4 (3,6)
Taux de réponse objective	28 (25,0)	43 (38,4)
IC 95 %	17,5-33,6	29,8-47,5
Taux du bénéfice clinique (CR+PR+SD≥6 mois)	39 (34,8)	50 (44,6)
IC 95%	26,1-43,9	35,5-54,3

La tolérance au traitement fut bonne, les principaux effets secondaires, de grade 3 et 4, étant la thrombocytopénie, la fatigue et l'hypokaliémie. Deux patientes ont présenté une diminution de l'éjection ventriculaire gauche qui n'a pas entraîné un arrêt du traitement. Aucune élévation de la troponine I n'a été observée.



#### **4.4.2. Anticorps radiomarqués**

Le développement d'anticorps radiomarqués pour traiter les tumeurs solides fut relativement décevant.

Plusieurs antigènes associés aux carcinomes de types histologiques variés ont été ciblés par des anticorps sous forme entier ou de fragments Fab'2. La plupart de ces études cliniques ont été de phase I destinées à définir l'activité maximale tolérée en incluant des volumes tumoraux souvent importants. En terme d'efficacité, les réponses objectives ont été très rares. Plusieurs caractéristiques des cibles tumorales visées et des radionucléides utilisés pour le marquage des anticorps peuvent expliquer le faible taux des réponses objectives. La majorité des tumeurs étudiées avaient un volume élevé, souvent de quelques dizaines, voire quelques centaines cm<sup>3</sup>. Dans ces conditions, la vascularisation et le flux sanguin dans la tumeur sont très hétérogènes avec des zones de dimensions relativement importantes qui sont mal vascularisées et fixent donc une faible proportion de l'activité du radioanticorps injecté. De cette faible fixation résulte une dose tumorale d'irradiation trop faible pour être tumoricide. Certaines zones tumorales peuvent même échapper à toute irradiation si elles ne fixent pas le radioanticorps et si leurs dimensions sont supérieures au parcours maximal du rayonnement particulaire émis par le radionucléide (1,1 mm pour l'iode 131). Quelques exemples montrent la difficulté d'observer des résultats positifs.

##### **4.4.2.1. Pentumomab**

Pentumomab est un anticorps monoclonal murin qui se fixe spécifiquement sur une forme anormale de mucine (MUC1), une protéine présente à la surface des cellules dans plusieurs types de tumeurs solides, dont celles de l'ovaire, de l'estomac, du poumon, du sein et de la prostate. En pathologie tumorale, la surexpression de MUC1 est liée à un mauvais pronostic et à une survie plus courte. Cet anticorps est fixé au radio-isotope yttrium 90, qui lui donne la capacité d'irradier et de détruire les cellules fixées par l'anticorps ainsi que les cellules avoisinantes.

Une étude clinique de phase III comparant <sup>90</sup>Y-pentumomab plus un traitement standard versus traitement standard seul a été réalisée chez des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire épithélial après rémission clinique complète suite à une chirurgie et une chimiothérapie à base de sels de platine. Au total, 844 patientes de stade Ic à IV ont été screenées ; 447 patientes avec une laparoscopie deuxième look négative ont été randomisées pour recevoir <sup>90</sup>Y-pentumomab plus traitement standard (224 patientes) ou traitement standard seul (223 patientes). Les cancers ovariens se caractérisant par une diffusion dans la cavité abdominale, <sup>90</sup>Y-pentumomab est injecté directement dans cet espace, à une dose de 25 mg. Après un suivi

médian des patientes de 3,5 ans (1 à 6 ans), 70 patientes sont décédées dans le bras <sup>90</sup>Y-pemtumomab comparé à 61 patientes dans le bras contrôle (pas de différence significative) et 104 patientes ont réchuté dans le bras actif comparé à 98 patientes dans le bras contrôle (pas de différence significative). De plus, le traitement avec <sup>90</sup>Y-pemtumomab a été associé à des thrombocytopénies occasionnelles de grade 3 ou 4. L'administration de <sup>90</sup>Y-Pemtumomab dans le cancer de l'ovaire n'a pas augmenté la survie ni le temps de rechute (Verheizen RH *et al.*, 2006)

#### **4.4.2.2. Labetuzumab**

Labetuzumab est un anticorps monoclonal qui cible l'antigène carcino-embryonnaire (ACE). Cet anticorps est capable de se lier aux métastases qui ne peuvent être détectées par l'imagerie médicale. L'iode radioactif (<sup>131</sup>I) auquel l'anticorps est couplé va ensuite éliminer ces cellules cancéreuses.

Un essai clinique de phase II a montré qu'une injection unique de l'anticorps monoclonal <sup>131</sup>I-Labetuzumab augmente significativement l'espérance de vie des patients atteints d'un cancer du colon et ayant préalablement subi une intervention chirurgicale. 23 patients, après chirurgie des métastases hépatiques, ont reçu une dose de 40 à 60 mCi/m<sup>2</sup> de <sup>131</sup>I-Labetuzumab. Les données d'efficacité ont été comparées à un groupe similaire contrôle (19 patients) traités dans le même centre hospitalier à la même période. Les patients traités avec <sup>131</sup>I-Labetuzumab ont survécu en moyenne 68 mois après le traitement, comparé à la médiane de survie observé dans le groupe contrôle, 31 mois (p=0.032). La médiane de survie sans maladie observée était de 18 mois dans le bras traitement actif comparé à 12 mois dans le bras contrôle (p=0,565). Le taux de survie à 1 an était de 94,7% ; à 2 ans, 78,9% ; à 3 ans, 68,4% et à 5 ans, 42,1% pour les patients traités par l'anticorps monoclonal ; comparé à 94,7%, 68,4%, 36,8% et 15,8% respectivement dans le bras contrôle. Bien que ces résultats soient très prometteurs, son efficacité thérapeutique doit être prouvée sur un plus grand échantillon de patients, lors d'essais cliniques de phase III (Liersch T *et al.*, 2007).

## **5. Anticorps utilisés pour le traitement d'hémopathies malignes**

L'identification de plusieurs antigènes localisés spécifiquement à la surface des lymphocytes a conduit à développer une immunothérapie relativement ciblée des lymphomes non Hodgkiniens. Dès le début des années 1980, le travail « pionnier » du groupe de Richard Miller et de Ronald Levy allait démontrer l'efficacité d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'immunoglobuline de surface de clones B malins pour le traitement de lymphomes à cellules B (Miller RA *et al.*, 1982). Cependant, le développement pour chaque patient d'un anticorps dirigé spécifiquement contre l'idiotype exprimé par l'immunoglobuline de surface était trop difficile et coûteux pour faire l'objet d'une large utilisation clinique. De plus, la plupart des réponses étaient temporaires, en raison notamment de l'internalisation de l'antigène cible par les lymphocytes malins. Cependant, ces premières tentatives ont démontré qu'une immunothérapie ciblée grâce à des anticorps monoclonaux était potentiellement efficace pour le traitement de lymphomes, conduisant au développement d'anticorps dirigés contre d'autres cibles à la surface des lymphocytes.

### **5.1. Cible : antigène CD20**

#### **5.1.1. Anticorps monoclonal « nu » : rituximab – MabThera®**

Comme résultat direct des travaux « pionniers » du groupe de Richard Miller et de Ronald Levy, le rituximab (IDEC-C2B8 ou Rituxan® aux Etats-Unis, au Japon et au Canada, ou MabThera® partout ailleurs dans le monde) est devenu, en novembre 1997, le premier anticorps monoclonal accepté par la FDA pour le traitement des lymphomes.

##### **5.1.1.1. Description et mécanisme d'action de rituximab**

Le rituximab est un anticorps chimérique, IgG1 kappa, dirigé contre l'antigène CD20, protéine transmembranaire hydrophobe localisée à la surface des cellules B précurseurs et des lymphocytes B matures. Cet antigène s'exprime dans plus de 95% des cellules B des lymphomes non Hodgkiniens. Il est présent sur les cellules B normales et malignes mais est absent sur les cellules souches hématopoïétiques, les plasmocytes normaux, les cellules pro-B ou les tissus normaux, et non retrouvé sous forme libre dans la circulation (Nadler LM *et al.*, 1981). L'antigène CD20 est une excellente cible, il s'agit d'une protéine membranaire bien ancrée qui n'est pas relarguée de la surface leucocytaire ou internalisée, et pour laquelle on ne connaît pas de modulation d'expression ou de mutant. Après liaison à l'antigène CD20, la

portion Fc du rituximab se lie aux récepteurs Fc des cellules effectrices (lymphocytes T cytotoxiques ou cellules Natural Killer) et stimule une réaction lytique conduisant à la mort cellulaire. L'anticorps active également la cascade du complément. De plus, la liaison de l'anticorps à l'antigène CD20 entraîne une augmentation du calcium intracellulaire des cellules cibles, bloquant les cellules en phase G1 et conduisant à l'apoptose de ces cellules. Les cellules souches des lymphocytes B dans la moelle osseuse n'ont pas d'antigène CD20 ce qui permet aux cellules B saines de se régénérer après le traitement et de revenir à un niveau normal dans un délai de quelques mois. Ce mécanisme expliquerait l'effet de synergie observé entre l'anticorps anti-CD20 et les molécules utilisées en chimiothérapie (Grillo-Lopez AJ *et al.*, 1999).

#### **5.1.1.2. Etudes cliniques**

##### **Dans le lymphome folliculaire non-hodgkinien**

###### En monothérapie

- *Traitement initial, administration une fois par semaine pendant 4 semaines*

Dans l'étude pivotale, 166 patients présentant un lymphome folliculaire non-hodgkinien à cellules B ou un lymphome de bas grade, en rechute ou chimiorésistant, ont reçu 375 mg/m<sup>2</sup> de rituximab par voie intraveineuse une fois par semaine pendant 4 semaines. Le taux de réponse globale observé a été de 48%, avec 6% de réponse complète et 42% de réponse partielle. Le temps médian jusqu'à progression de la maladie pour les patients répondeurs a été de 13,0 mois.

- *Traitement initial, administration une fois par semaine pendant 8 semaines*

Afin de tester un autre schéma d'administration, une étude multicentrique a été conduite chez 37 patients présentant un lymphome folliculaire non-hodgkinien à cellules B ou un lymphome de bas grade, en rechute ou chimiorésistant, avec un schéma d'administration de 375 mg/m<sup>2</sup> de rituximab en perfusion intraveineuse une fois par semaine pendant 8 semaines. Le taux de réponse globale observé a été de 58%, avec 14% de réponse complète et 43% de réponse partielle. Le temps médian jusqu'à progression de la maladie pour les patients répondeurs était de 19,4 mois.

- *Traitement initial, masse tumorale importante, administration une fois par semaine pendant 4 semaines*

Dans les données poolées de trois études, une sub-analyse a été réalisée sur 39 patients ayant une masse tumorale importante (lésion supérieure ou égale à 10 cm de diamètre) et a montré un taux de réponse globale de 36% avec 3% de réponse complète, 33% de réponse partielle et un temps médian jusqu'à progression de la maladie de 9,6 mois.

- *Retraitement, administration une fois par semaine pendant 4 semaines*

De façon intéressante, il a été montré que, lors de la rechute de malades traités par rituximab, une nouvelle série d'injections permettait d'obtenir une nouvelle rémission dans 38% des cas. La nouvelle rémission avait une durée légèrement plus longue que celle observée lors de la première rémission, avec une médiane de 17,8 mois. Aussi, il paraît raisonnable d'effectuer de nouvelles cures tant que ne s'installe pas une résistance définitive, d'autant que les injections répétées sont bien tolérées sans toxicité cumulative (*tableau XXVI*).

Tableau XXVI : résumé des données d'efficacité de rituximab en monothérapie

	Traitement initial 4 x par semaine n = 166	Traitement initial 8 x par semaine n = 37	Traitement initial, lésion > 10 cm 4 x par semaine n = 39	Ré administration 4 x par semaine n = 60
Taux de rémission globale	48%	57%	36%	38%
Taux de réponse complète	6%	14%	3%	10%
Taux de réponse partielle	42%	43%	33%	28%
TTP (mois)	13,0	19,4	9,6	17,8

TTP = temps médian jusqu'à progression de la maladie

### En association à une chimiothérapie

Dans une étude ouverte randomisée, un total de 322 patients, non traités préalablement, présentant un lymphome folliculaire, a été randomisé pour recevoir soit une chimiothérapie CVP (cyclophosphamide 750 mg/m<sup>2</sup>, vincristine 1,4 mg/m<sup>2</sup> et prednisolone 40 mg/m<sup>2</sup> pendant 5 jours) toutes les 3 semaines pendant 8 cures, soit l'association CVP à rituximab à la dose de 375 mg/m<sup>2</sup> (R-CVP).

Les résultats issus de trois autres études randomisées utilisant rituximab en association à une chimiothérapie autre que CVP (CHOP, MCP, CHVP/Interferon-α) ont aussi montré des améliorations significatives des taux de réponses, des paramètres dépendants du temps et de la survie globales. Les résultats clés de ces quatre études sont résumés dans le tableau XXVII.

Tableau XXVII : données d'efficacité de rituximab en association

Etude	Traitement (n)	Suivie médian (mois)	Taux de réponse globale (%)	Réponse complète (%)	TTP/ TTF/ SSP/ EFS	Taux de survie globale * (mois)
<b>M39021</b>	CVP (159) R-CVP (162)	53	57 81	10 41	TTP médian 14,7 mois 33,6 mois p< 0,0001	71,1 80,9 p=0,029
<b>GLSG'00</b>	CHOP (205) R-CHOP (223)	18	90 96	17 20	TTF median 2,6 ans non atteint p< 0,001	90 95 p=0.016
<b>OSHO-39</b>	MCP (96) R-MCP (105)	47	75 92	25 50	SSP médiane 28,8 mois non atteint p< 0,0001	74 87 p=0,0096
<b>FL2000</b>	CHVP-IFN (183) R-CHVP-IFN (175)	42	85 94	49 76	EFS médiane 36 mois non atteint p< 0,0001	84 91 p=0,029

\* au moment de l'analyse

EFS = survie sans événement

TTP = temps jusqu'à progression ou décès

SSP = survie sans progression

TTF = temps jusqu'à échec au traitement

### Traitement d'entretien

Dans une étude internationale multicentrique prospective ouverte de phase III, 465 patients présentant un lymphome folliculaire non-hodgkinien en rechute ou réfractaire, ont été randomisés, dans un premier temps pour recevoir un traitement d'induction par CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisolone ; n=231) ou l'association rituximab plus CHOP (R-CHOP ; n=234). Dans un deuxième temps, 334 patients ayant présenté une rémission complète ou partielle à la suite du traitement d'induction ont été randomisés pour recevoir un traitement d'entretien par rituximab (n=167) ou pour rentrer dans une période d'observation (n=167). Le traitement d'entretien par rituximab consistait en une perfusion de 375 mg/m<sup>2</sup> tous les 3 mois jusqu'à progression de la maladie ou pendant une durée maximale de 2 ans.

Après une durée médiane d'observation de 31 mois des patients randomisés dans la phase d'induction, le R-CHOP a significativement amélioré l'évolution des lymphomes non-hodgkinien folliculaires en rechute ou refractaire comparativement au CHOP (*tableau XXVIII*).

*Tableau XXVIII : phase d'induction : résumé des résultats d'efficacité de CHOP vs R-CHOP*

	CHOP	R-CHOP	Valeur de p
Taux de réponse globale	74%	87%	0,0003
Réponse complète	16%	29%	0,0005
Réponse partielle	58%	58%	0,9449

Chez les patients randomisés lors de la phase d'entretien de l'étude, la durée médiane d'observation a été de 28 mois à partir de la randomisation. Le traitement d'entretien par rituximab a amélioré de façon clinique et statistiquement significative la survie sans progression (délai entre la randomisation et la rechute, ou la progression ou le décès) comparativement à l'observation seule ( $p < 0,0001$ ). La survie sans progression médiane a été de 42,2 mois dans le bras entretien par rituximab comparé à 14,3 mois dans le bras observation. Les résultats sont résumés dans le tableau XXIX.

*Tableau XXIX : phase d'entretien : résumé des résultats d'efficacité de rituximab vs observation*

Paramètres d'efficacité	Délai médian jusqu'à événement (mois)			Réduction du risque
	Observation (n=167)	Rituximab (n=167)	Valeur du p	
Survie sans progression	14,3	42,2	< 0,0001	61%
Temps jusqu'à nouveau traitement	20,1	38,8	< 0,0001	50%
Survie sans maladie	16,5	53,7	0,0003	67%
<b>Analyse en sous-groupe</b>				
Survie sans progression				
CHOP	11,6	37,5	< 0,0001	71%
R-CHOP	22,1	51,9	0,0071	46%
RC	14,3	52,8	0,0008	64%
RP	14,3	37,8	< 0,0001	54%

### Lymphome non-hodgkinien agressif diffus à grandes cellules B

Dans une étude randomisée, ouvert, 399 patients âgés (de 60 à 80 ans), naifs, présentant un lymphome agressif diffus à grandes cellules B ont reçu soit une chimiothérapie CHOP standard (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisolone ; n= 197) toutes les 3 semaines pendant 8 cycles, soit une chimiothérapie CHOP associée à rituximab (R-CHOP ; n=202).

L'analyse finale d'efficacité a inclus tous les patients randomisés avec une durée médiane de suivi d'environ 31 mois. Elle a confirmé que le protocole R-CHOP était associé à une amélioration de la survie sans événement cliniquement et statistiquement significatifs avec une durée médiane de la survie sans événement de 35 mois dans le bras R-CHOP contre 13 mois dans le bras CHOP, représentant une diminution de risque de 41%. Le taux de réponse complète après 8 cycles de R-CHOP était de 76,2% contre 62,4% dans le groupe CHOP (p=0,0028). A 24 mois, l'estimation de la survie globale était de 68,2% dans le bras R-CHOP contre 57,4% dans le bras CHOP.

### **Dans la leucémie lymphoïde chronique**

Dans une étude randomisée en ouvert, un total de 817 patients atteints de leucémie lymphoïde chronique, non préalablement traités, ont été randomisés afin de recevoir soit une chimiothérapie FC (fludarabine 25 mg/m<sup>2</sup>, cyclophosphamide 250 mg/m<sup>2</sup>, jours 1 à 3) toutes les 4 semaines pendant 6 cycles, soit rituximab (375 mg/m<sup>2</sup> pendant le premier cycle puis 500 mg/m<sup>2</sup> les cycles suivants) en association à FC (R-FC).

L'analyse d'efficacité porte sur un total de 810 patients (403 patients dans le bras R-FC et 407 patients dans le bras FC) et est résumée dans le tableau XXX.

Tableau XXX : résumé des résultats d'efficacité de rituximab + FC versus FC seul

Paramètres d'efficacité	Délai médian jusqu'à événement (mois)			Réduction du risque
	FC (n=407)	R-FC (n=403)	Valeur du p	
Survie sans progression	32,2	39,8	< 0,0001	44%
Survie sans événement	31,1	39,8	< 0,0001	45%
Taux de réponse globale	72,7%	86,1%	< 0,0001	Non applicable
Taux de réponse complète	17,2%	36,0%	< 0,0001	
Durée de la réponse	34,7	40,2	0,0004	39%

(durée médiane d'observation = 20,7 mois)



### **5.1.1.3. Indications thérapeutiques**

#### **Lymphome non-hodgkinien :**

Rituximab est indiqué :

- en association à une chimiothérapie pour le traitement des patients présentant un lymphome folliculaire de stade III-IV n'ayant jamais été précédemment traités
- en traitement d'entretien chez les patients présentant un lymphome folliculaire en rechute ou réfractaire répondant à un traitement d'induction par chimiothérapie avec ou sans rituximab
- en monothérapie pour le traitement des patients atteints de lymphomes folliculaires de stade III-IV en cas de chimiorésistance ou à partir de la deuxième rechute après chimiothérapie
- en association à une chimiothérapie CHOP pour le traitement des patients présentant un lymphome non Hodgkinien agressif diffus à grandes cellules B, CD20 positif.

#### **Leucémie lymphoïde chronique :**

Rituximab est indiqué en traitement de première ligne chez les patients atteints de leucémie lymphoïde chronique en association à une chimiothérapie.

### **5.1.1.4. Effets indésirables**

Les effets indésirables les plus fréquemment observés chez les patients recevant rituximab étaient des réactions liées à la perfusion qui surviennent principalement lors de la première infusion.

En dépit de la déplétion des lymphocytes B matures après traitement par rituximab, une augmentation des infections bactériennes et opportunistes n'a pratiquement pas été observée.

Au cours des essais de phase III, les effets adverses ont été observés chez 84% des patients.

Une plus large expérience clinique a permis d'identifier un syndrome particulier et peu commun, le syndrome de lyse tumorale. Les patients à risque pour un tel syndrome ont un nombre élevé de lymphocytes malins circulants. L'ensemble des signes cliniques qui surviennent brutalement durant la première injection de rituximab incluent des réactions sévères liées à cette injection : rigidité, fièvre, bronchospasme, thrombocytopenie, hypoxémie, diminution rapide du nombre de lymphocytes circulants et évidence biochimique d'une lyse cellulaire avec hyperuricémie, hypercalcémie et élévation des LDH. Bien qu'incomplètement compris, ce syndrome est probablement dû à une agglutination des lymphocytes, induite par rituximab, dans les poumons, le foie et la rate. Le traitement symptomatique de ce syndrome permet de poursuivre le traitement en utilisant une dose plus faible d'anticorps ou en retardant l'injection d'une journée.

## 5.1.2. Anticorps monoclonaux conjugués : radio-immunothérapie

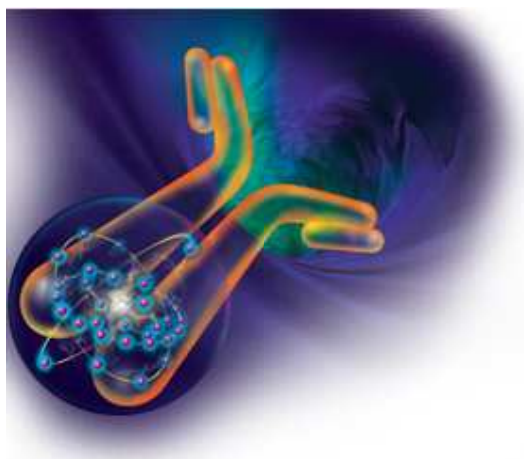
### 5.1.2.1. **Anticorps monoclonal conjugué à l'yttrium 90 : ibritumomab tiuxétan – Zevalin®**

#### 5.1.2.1.1. Description et mécanisme d'action d'ibritumomab tiuxétan

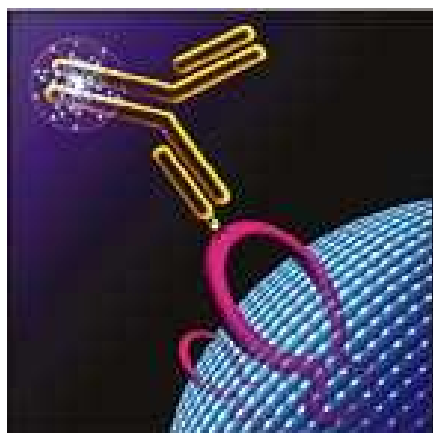
L'ibritumomab est un anticorps monoclonal murin IgG1 kappa, recombinant, spécifique de l'antigène CD20, lié de façon covalente au tiuxétan, chélateur du radio-isotope yttrium 90 qui va permettre une radiation dirigée contre les cellules antigène positif. Ainsi, Zevalin® combine un ciblage par l'anticorps monoclonal anti-CD20 au pouvoir cytotoxique d'un rayonnement  $\beta$  émis par l'isotope yttrium 90 pour détruire les cellules lymphomateuses (*figure n°40*).

Le radio-isotope yttrium 90 émet un rayonnement  $\beta$  pur avec une demi-vie physique de 64 heures. Dans le tissu mou, 90% de l'énergie émise par le radio-isotope est absorbée avec une distance moyenne de 5 mm, ce qui permet de distribuer une radiation aux cellules cibles ainsi qu'aux cellules tumorales voisines. L'émission de rayons  $\beta$  va induire un dommage des cellules cibles et des cellules voisines (5 mm correspond à une distance de 100 à 200 cellules de diamètre) par formation de radicaux libres. Comparé à l'iode 131, l'yttrium 90 a une demi-vie plus courte et une pénétration plus importante.

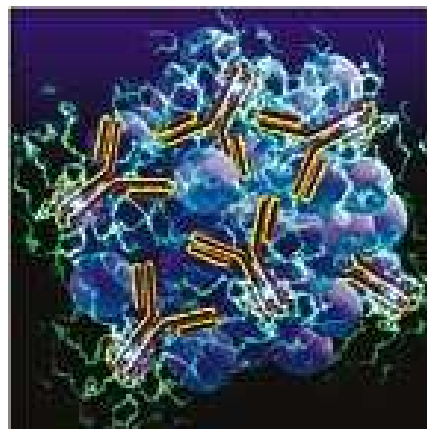
La courte demi-vie de l'isotope ainsi que l'absence d'émission de rayonnements  $\gamma$  permet d'alléger les procédures liées à la protection de l'entourage lors de l'administration de l'ibritumomab tiuxétan (*figure n°41*).



*Figure n°40 : ibrutinomab tiuxétan*



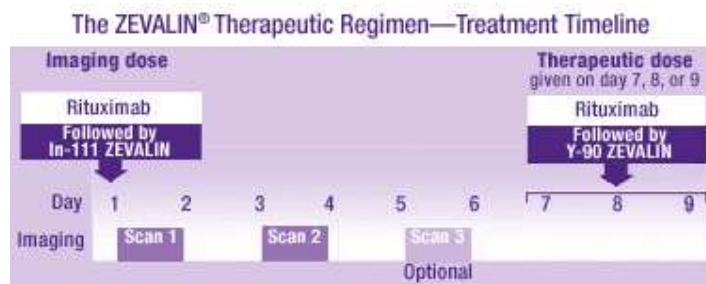
*Figure n°41 : L'anticorps monoclonal cible l'antigène CD20*



*L'anticorps endommage la cible et les cellules voisines*

5.1.2.1.2. Procédure d'administration d'ibrutinomab tiuxétan

Le traitement par <sup>90</sup>Y ibrutinomab tiuxétan ne comporte qu'un cycle. Il inclut un prétraitement par rituximab administré au jour 1 et jour 8, à la posologie de 250 mg/m<sup>2</sup>.



*Figure n°42 : schéma thérapeutique de Zevalin*

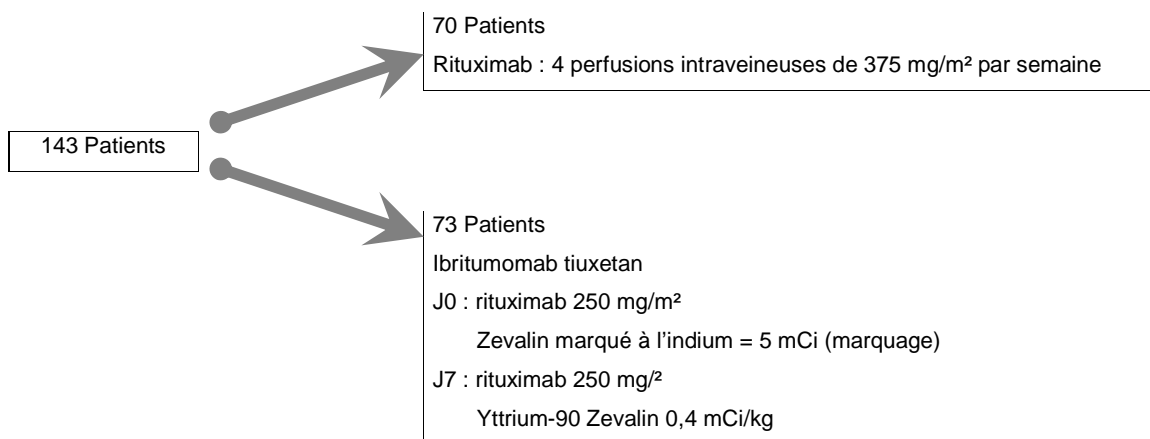
Les deux injections de rituximab visent à saturer les sites CD20 circulants de la rate et à optimiser la biodistribution de l'ibritumomab tiuxétan. La posologie de l'<sup>90</sup>Y ibritumomab tiuxétan est adaptée au poids et à la numération plaquettaire du patient et exprime l'activité du médicament radiopharmaceutique mesurée en mégabecquerels (MBq). La posologie d'ibritumomab tiuxétan marqué *in vitro* à l'<sup>90</sup>Y est de 15 MBq/kg (sans dépasser 120 MBq) si le nombre de plaquettes est supérieur à 150x10<sup>9</sup>/L. Il est administré au jour 8 après la deuxième injection de rituximab. Pour les patients présentant une numération plaquettaire comprise entre 100 et 150x10<sup>9</sup>/L. La dose est réduite à 11 MBq/kg (sans dépasser 1200 MBq). Sur une base pondérale (mg) et à poids moléculaires comparables, la dose d'ibritumomab tiuxétan est 200 fois plus faible qu'une dose thérapeutique de rituximab (3,6 mg *versus* 700 mg en moyenne par administration). Aux Etats-Unis, le protocole d'administration est sensiblement différent. Au cours de la semaine précédant l'administration du conjugué marqué à l'<sup>90</sup>Y, deux ou trois scintigraphies sont réalisées après l'injection d'une activité de 185 MBq d'ibritumomab tiuxétan marqué à l'indium 111 (<sup>111</sup>In, émetteur de rayonnements gamma) (*figure n°42*). Ces images sont réalisées afin de mettre en évidence d'éventuelles perturbations de distribution tissulaires du conjugué qui peuvent contre-indiquer son utilisation. Ces anomalies se caractérisent par une accumulation trop importante du conjugué au niveau des poumons, des reins, de la moelle osseuse et du tube digestif. Une étude rétrospective, menée pendant la première année de commercialisation aux Etats-Unis, a montré que ces perturbations étaient peu fréquentes car elle concernaient environ 0,6% des patients (12/953) (Conti P *et al.*, 2004).

#### 5.1.2.1.3. Etudes cliniques

L'efficacité et la tolérance du traitement par l'ibritumomab tiuxetan ont été évaluées principalement lors de deux essais multicentriques, menés sur un total de 197 patients, au cours desquels le traitement a été administré en deux étapes.

La première étude était une étude à groupe unique portant sur 54 patients atteints d'un lymphome folliculaire récidivant, réfractaire au traitement par rituximab. Les patients ont été considérés comme réfractaires si un précédent traitement par rituximab ne s'était pas traduit par une réponse complète ou partielle ou si le délai jusqu'à progression de la maladie avait été inférieur à 6 mois. Le principal critère d'évaluation de l'efficacité a été le taux de réponse globale, déterminé selon les critères de Réponse de l'Atelier International. Les critères secondaires d'évaluation de l'efficacité ont été le délai jusqu'à progression de la maladie et la durée de la réponse. Une analyse secondaire comparant la réponse objective sous traitement par l'ibritumomab tiuxetan à celle du traitement par rituximab le plus récent a montré une durée de réponse médiane de 6 mois sous ibritumomab tiuxetan contre 4 mois sous rituximab (Witzig TE, Flinn IW *et al.*, 2002). Le tableau XXXI résume les résultats d'efficacité de cette étude.

La deuxième étude était une étude multicentrique randomisée et contrôlée de phase III comparant le traitement par ibritumomab tiuxetan au traitement par rituximab chez 143 patients atteints de lymphomes non Hodgkiniens de faible grade ou folliculaire, réfractaire ou en rechute (*figure n°43*). Respectivement, 56 et 64% des patients étaient résistants à la chimiothérapie (Witzig TE, Gordon LI, *et al.*, 2002).



*Figure n°43 : schéma de l'étude comparative ibritumomab tiuxetan / rituximab*

Les réponses étaient déterminées selon les critères de réponse International Workshop. Le taux de réponse global des 73 patients randomisés dans le bras ibritumomab tiuxetan était de 80% (avec 30% de réponses complètes), statistiquement supérieur à 56%, taux de réponse global observé chez les 70 patients qui ont reçu rituximab (avec 16% de réponses complètes) ( $p=0,002$ ). Le taux de réponse complète non confirmée était de 4% dans les deux bras de traitement (*tableau XXXI*).

*Tableau XXXI : réponses cliniques des études avec ibritumomab tiuxetan*

	Etude 1	Etude 2	
	Ibritumomab tiuxetan (n=54)	Ibritumomab tiuxetan (n=73)	Rituximab (n=70)
Taux de réponses	74%	80%	56%
Réponse complète	15%	30%	16%
Réponse complète non confirmée	0	4%	4%
Réponse partielle	-	45%	36%
Durée de la réponse médiane (mois)	6,4	13,9	11,8
Délai jusqu'à progression de la maladie médian (mois)	6,8	11,2	10,1

Les taux de réponses obtenus sont plus élevés quand l'anticorps est couplé à un isotope radioactif. La qualité de vie apparaît par ailleurs supérieure chez les malades traités par l'anticorps radiomarqué. Il s'agit toutefois d'une procédure lourde, posant notamment des problèmes délicats de dosimétrie.

La toxicité hématologique est importante et variable d'un patient à l'autre. Il a été observé dans le groupe ibritumomab tiuxetan 6% de thrombopénies de grade 4 et 32% de neutropénies de grade 4, dont 8% nécessitant une hospitalisation en raison d'une complication infectieuse.

#### 5.1.2.1.4. Indication thérapeutique

Zevalin marqué à l'yttrium-90 est indiqué dans le traitement de consolidation après induction d'une rémission chez les patients atteints d'un lymphome folliculaire non traités antérieurement. Les bénéfices de Zevalin suite à l'utilisation du rituximab associé à une chimiothérapie n'ont pas été démontrés.

Zevalin marqué à l'yttrium-90 est indiqué dans le traitement des patients adultes atteints d'un lymphome non Hodgkinien à cellules B folliculaires, CD20 positif, de type folliculaire, réfractaire ou en rechute après traitement par rituximab.

#### **5.1.2.2. Anticorps monoclonal conjugué à l'iode 131 : tositumomab – Bexxar®**

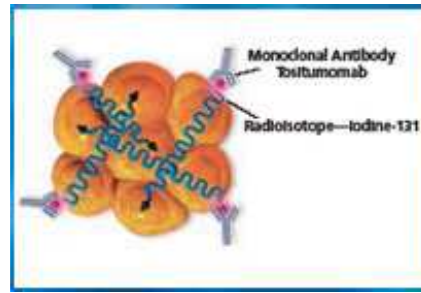
##### 5.1.2.2.1. Description et mécanisme d'action de tositumomab

Tositumomab est un anticorps monoclonal murin IgG2a lambda dirigé contre l'antigène CD20, sur lequel est fixée la molécule radioactive iode 131. Ainsi, tositumomab combine un ciblage par l'anticorps monoclonal anti-CD20 au pouvoir cytotoxique d'un rayonnement  $\gamma$  et  $\beta$  émis par l'isotope iode 131 pour détruire les cellules lymphomateuses (*figure n°44*).

Le radio-isotope iode 131 émet un rayonnement  $\beta$  et  $\gamma$  avec une demi-vie physique d'environ 8 jours. Le rayonnement  $\beta$  a une moyenne d'énergie de 191,6 keV et le rayonnement  $\gamma$  une moyenne d'énergie de 364,5 keV (Weber DA *et al.*, 1989). La pénétration de l'énergie émise par le radio-isotope est de 1 mm (Bexxar prescribing information, GlaxoSmithKline).



*Iodine I 131 Tositumomab se lie à l'antigène CD20 des lymphocytes normaux et malins*



*L'émission de rayons  $\gamma$  et  $\beta$  va induire un dommage des cellules cibles et des cellules voisines*

Figure n°44 : description de tositumomab

#### 5.1.2.2.2. Procédure d'administration de tositumomab

La thérapie par tositumomab est administrée selon deux étapes distinctes : l'étape dosimétrique et d'imagerie au jour 1 suivie de l'étape thérapeutique au jour 8.

L'étape dosimétrique a pour but d'évaluer la pharmacocinétique et la biodistribution de l'anticorps pour chaque patient. Si cette biodistribution est altérée, la dose thérapeutique ne doit pas être administrée. L'étape dosimétrique est réalisée par une injection intraveineuse de tositumomab (anticorps monoclonal anti-CD20 non radiomarké, 450 mg) afin de saturer rapidement les sites CD20 des tissus normaux, suivie d'une injection intraveineuse de iodeine  $^{131}\text{I}$  tositumomab de 185 MBq. Lors de l'injection de l'anticorps radiomarké, les sites antigéniques non tumoraux ne sont donc plus disponibles pour fixer les molécules de radioanticorps qui sont alors lentement et préférentiellement fixées sur les sites tumoraux. La dosimétrie et la biodistribution sont évaluées par trois scintigraphies. Cette étape permet également de déterminer la cinétique d'élimination de  $\text{I}^{131}$ .

L'étape thérapeutique consiste à injecter par voie intraveineuse, au jour 8, tositumomab suivie de iodeine  $^{131}\text{I}$  tositumomab, avec une dose spécifique à chaque patient selon la pharmacocinétique (dosimétrie) évaluée par l'intermédiaire du rayonnement  $\gamma$  de l'iodine 131.

Des mesures de protection du personnel soignant ainsi que de l'entourage du patient (isolement) doivent être prises compte tenu des rayonnements gamma émis par  $\text{I}^{131}$ . De plus, le patient reçoit de l'iodure de potassium avant le traitement et deux semaines après la dernière étape afin de prévenir la fixation de l'iodine radioactif sur la thyroïde.

#### 5.1.2.2.3. Etudes cliniques

L'efficacité de tositumomab a été évaluée dans deux principales études conduites chez des patients atteints d'un lymphome folliculaire, de faible grade ou en transformation histologique.

La première étude est une étude de phase II, multicentrique, simple bras, incluant 40 patients prétraités (médiane 4 lignes dont le rituximab). Parmi les 40 malades inclus, 24 présentaient une maladie qui n'avait pas répondu à leur dernier traitement par rituximab, 11 avaient une maladie qui avait répondu sous rituximab avec une durée de réponse supérieure ou égale à 6 mois. Les résultats observés sont résumés dans le tableau XXXII.

Tableau XXXII : résultats cliniques, tositumomab

	Réponse globale (n=40)	Réponse complète (n=40)
<b>Taux de réponse</b> IC 95%	68% (51% - 81%)	33% (19% - 49%)
<b>Durée médiane de réponse</b> IC 95%	16 mois (10 mois, NR*) (1+ à 38+ mois)	NR* (15 mois, NA*) (4 à 38+ mois)

+ indique une réponse en cours

\* NR = non atteint. Durée moyenne de suivie = 26 mois

Parmi les 40 patients inclus, 35 (88%) étaient considérés comme réfractaires à rituximab, c'est-à-dire absence de réponse ou durée de réponse inférieure à 6 mois. Les réponses dans ce groupe de patients ont montré des résultats également très intéressants (Horing SJ *et al.*, 2005).

Tableau XXXIII : résultats cliniques, tositumomab chez des patients réfractaires à rituximab

	Réponse globale (n=35)	Réponse complète (n=35)
<b>Taux de réponse</b> IC 95%	63% (45% - 79%)	29% (15% - 46%)
<b>Durée médiane de réponse</b>	25 mois (4 à 38+ mois)	NR* (4 à 38+ mois)

+ indique une réponse en cours

\* NR = non atteint. Durée moyenne de suivie = 26 mois

La deuxième étude était également une étude multicentrique, simple bras, ouverte, incluant 60 patients atteints de lymphome non-hodgkinien de bas grade ou transformés, réfractaires aux chimiothérapies, (médiane 4 lignes) pour lesquels 53 patients n'avaient aucune réponse à leur première thérapie et 7 patients une réponse inférieure à 6 mois (Kaminsky MS *et al.*, 2001).

Les résultats observés sont résumés dans le tableau XXXIV.



Tableau XXXIV : résultats cliniques, tositumomab

	Réponse globale (n=60)	Réponse complète (n=60)
Taux de réponse IC 95%	47% (34% - 60%)	20% (11% - 32%)
Durée médiane de réponse IC 95%	12 mois (7 à 47 mois) (2 à 47 mois)	47 mois (47 mois à NA*) (9 à 47 mois)

\* NR = non atteint. Durée moyenne de suivie = 26 mois

Le principal effet secondaire associé à l'administration de tositumomab est une cytopénie sévère et prolongée (71% de cytopénie grade 3 ou 4), avec 53% de thrombopénie grade 3 ou 4 et 63% de neutropénie grade 3 ou 4. Quatre patients ont développé une myélodysplasie environ 3 ans après le traitement par tositumomab et 5 ans après la première administration d'agents alkylants.

#### 5.1.2.2.4. Indications thérapeutiques aux Etats-Unis

L<sup>131</sup>I tositumomab est indiqué dans le traitement de lymphomes non hodgkinien folliculaires CD20 positifs transformés ou non, réfractaires au rituximab et ayant rechuté après chimiothérapie.

## 5.2. Cible : antigène CD52 : alemtuzumab – MabCampath®

### 5.2.1. Antigène CD52

L'antigène CD52 est une glycoprotéine de 12 acides aminés (Treumann A *et al.*, 1995) fortement exprimée par les lymphocytes B et T normaux et pathologiques (en moyenne  $5 \cdot 10^5$  molécules/cellule), à un moindre degré par les monocytes et macrophages humains. Il est présent sur moins de 5% de cellules humaines granuleuses et normalement absent de la membrane des globules rouges, des plaquettes et des cellules souches médullaires. Aucune différence d'affinité n'a été décelée sur des lymphocytes humains normaux ou pathologiques. Cependant, les lymphocytes provenant des sujets atteints de leucémie lymphoïde chronique B et de leucémies prolymphocytaires T expriment constamment et fortement CD52 (Hale G *et al.*, 1990).

## 5.2.2. Famille des anticorps Campath

Le premier anticorps, de type IgM (Campath-1M) exprime *in vitro* une forte activité de lyse complément dépendante sur des lymphocytes T, mais pas sur les progéniteurs médullaires ni sur des cellules lymphoïdes tumorales. Une forte affinité anti-tumorale de type cytotoxicité anticorps dépendante est observée avec l'isotype IgG2b (Campath-1G), mais l'utilisation de ce dernier fut limitée par l'apparition d'anticorps neutralisants. Pour éviter cet inconvénient, une méthode de production d'anticorps chimériques fut alors mise au point : les gènes codant les six domaines hypervariables de l'anticorps de rat Campath-1G furent introduits par substitution au sein du cadre de lecture de l'extrémité Fab d'une immunoglobuline humaine IgG1. L'anticorps résultant de ce procédé (Campath-1H) associe une forte affinité anti-CD52 liée aux séquences CDR murines et une forte affinité pour le complément liée au fragment Fc de l'IgG1 humaine (Riechmann L *et al.*, 1998). Ainsi, le risque de réponse anticorps chez l'homme, en particulier anti-isotypique, est théoriquement très faible.

## 5.2.3. Description et mécanisme d'action d'alemtuzumab

Alemtuzumab (Campath-1H) se lie avec une forte affinité sur les cellules présentant l'antigène CD52 entraînant ainsi leur lyse. L'antigène CD52 est exprimé à la surface de plus de 95% des lymphocytes normaux circulants et des lymphomes à cellules B ou T. L'anticorps provoque principalement une cytotoxicité à médiation cellulaire anticorps dépendante. Un processus d'apoptose est un mécanisme également évoqué (Byrd JC *et al.*, 1999). Alemtuzumab ne semble pas endommager les cellules souches hématopoïétiques ni les cellules progénitrices.

## 5.2.4. Etudes cliniques

### Premières études cliniques

Les premiers travaux étudiant alemtuzumab dans les proliférations lymphoïdes tumorales furent conduits sur une série de malades atteints de maladies lymphoïdes diverses : lymphomes non Hodgkinien, leucémies aiguës polymphocytaires, leucémies lymphoïdes chroniques et leucémies à tricholeucocytes. Deux de ces malades furent traités avec l'anticorps Campath-1M puis dix-huit autres par l'anticorps Campath-1G (Hale G *et al.*, 1988).

L'administration d'une dose (non saturante) de l'ordre de 25 mg par jour pendant 10 jours provoquait une disparition des lymphocytes anormaux du sang, une profonde lymphopénie, et une importante réduction de l'infiltration lymphoïde pathologique de la rate et de la moelle osseuse. Les masses ganglionnaires furent peu modifiées par ce traitement. Des résultats

similaires furent observés avec l'anticorps génétiquement modifié (Campath-1H) chez des patients atteints de leucémies (Lim SH *et al.*, 1993).

En fonction de ces premiers résultats encourageants, les études cliniques de Campath-1H ont été centrées sur les hémopathies lymphoïdes à expression leucémique, principalement la leucémie lymphoïde chronique B et la leucémie prolymphocytaire T.

Tous les essais ont été menés en monothérapie.

#### *Patients atteints de leucémie lymphoïde chronique B précédemment traités*

Un essai non comparatif, prospectif, de phase II, multicentrique (étude CAM211), a été conduit chez 93 patients afin d'évaluer le taux de réponse total de l'administration d'alemtuzumab chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique B qui ont déjà reçu un agent alkylant et dont le traitement par fludarabine n'a pas donné de réponse. Les objectifs secondaires étaient de documenter le profil de sécurité d'alemtuzumab et l'efficacité clinique dans une population de patients lourdement prétraités (Keating M *et al.*, 2002).

Une dose initiale de 3 mg était augmentée à 10 mg puis 30 mg si la tolérance des premières perfusions était convenable. Chez la plupart des patients, l'augmentation de la dose jusqu'à 30 mg/jour fut atteinte en 3 à 7 jours. Le traitement était continué à 30 mg, trois fois par semaine, pendant au maximum de 12 semaines.

Selon les critères de NCIWG (*National Cancer Institute-sponsored Working Group*), une rémission complète est définie comme une absence de signes cliniques de la maladie (absence d'adénopathies et d'hépatosplénomégalie, moins de 30% de petits lymphocytes dans la moelle osseuse, avec une NFS normale sans transfusion : hémoglobine > 11 g/L, neutrophiles > 1,5  $10^9$  /L, lymphocytes < 4  $10^9$  /L, plaquettes > 100  $10^9$  /L), pendant au moins 2 mois. La rémission partielle est définie comme une réduction d'au moins 50% du nombre de lymphocytes dans le sang et une réduction d'au moins 50% des adénopathies et/ou d'hépatosplénomégalie. Au moins une de ces observations doit être maintenue pendant au moins 2 mois : hémoglobine > 11 g/L ou amélioration de 50%, neutrophiles > 1,5  $10^9$  /L sans transfusion, plaquettes > 100  $10^9$  /L. La progression de la maladie est définie comme une augmentation des adénopathies, du nombre de lymphocytes périphériques, de l'hépatosplénomégalie (de 50% ou plus), ou d'une histologie montrant une image plus agressive.

Les taux de réponses partielle et complète sont résumés dans le tableau XXXV.

Tableau XXXV : résumé des réponses de l'étude CAM211

Réponse (n=93)	Evaluation selon les critères NCIWG (%)
Réponse globale	31 (33%)
Réponse complète	2 (2%)
Réponse partielle	29 (31%)
Réponse complète avec cytopénie	6 (7%)
Réponse partielle nodulaire	5 (5%)
Maladie stable	50 (54%)

Les médianes de temps de réponse sont présentées dans le tableau XXXVI.

Tableau XXXVI : médianes de temps de réponse de l'étude CAM211

	Mois
Durée médiane jusqu'à la réponse	1,5 (0,4 à 3,7)
Durée médiane de réponse	8,7 (2,5 à 22,6+)
Temps médian de progression chez les répondeurs	9,5 (3,5 à 23,6+)
chez tous les patients	4,7 (0,2 à 23,6+)
Survie sans progression	4
Médiane de survie	16

La toxicité de cet anticorps anti-CD52 est plus importante que celle des anticorps anti-CD20, avec une neutropénie ou une thrombopénie chez plus de 25% des patients et une lymphocytopénie durable chez tous les malades. Enfin, des infections opportunistes, probablement liées à la lymphocytopénie, ont constamment été rapportées chez un petit nombre de patients dans toutes les études.

#### Patients atteints de leucémie lymphoïde chronique B traités en première ligne

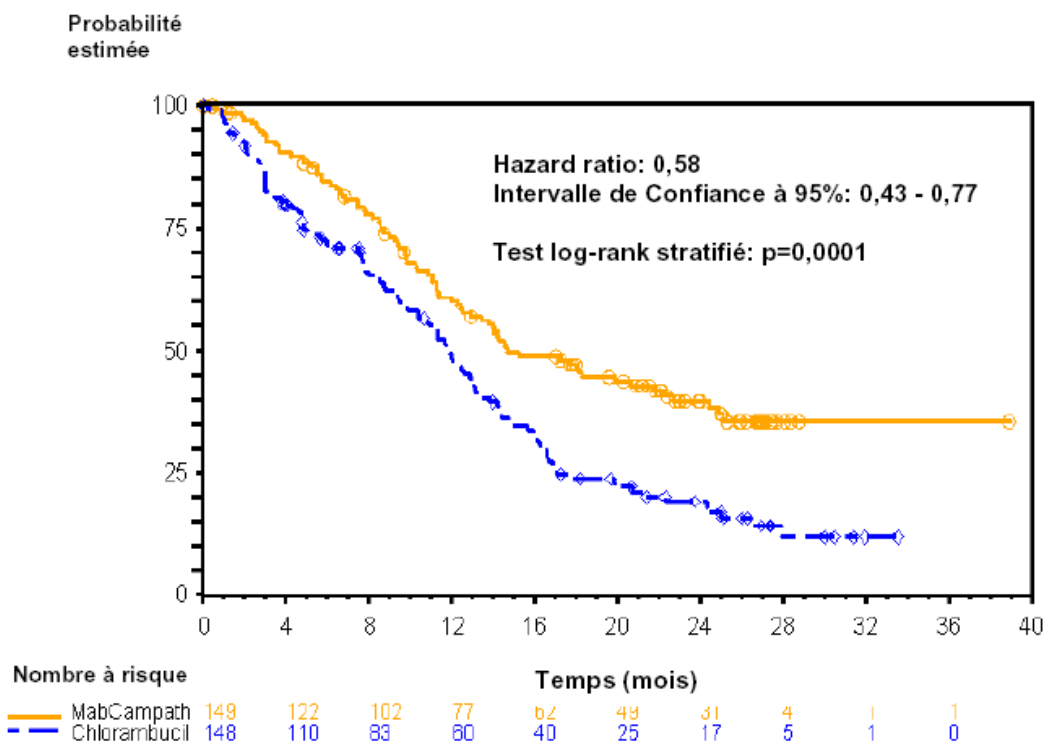
La sécurité et l'efficacité d'alemtuzumab ont été évaluées dans une étude comparative de phase III, ouverte, randomisée, chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique B au stade I-IV selon la classification de Rai, en première ligne (non préalablement traités).

Alemtuzumab s'est montré supérieur au chlorambucile sur le critère principal : la survie sans progression (*figure n°45*).

Les objectifs secondaires comprenaient les taux de réponse complète et de réponse globale, calculés selon les critères NCIWG, la durée de réponse, le temps jusqu'à un traitement alternatif ainsi que la tolérance dans les deux groupes de traitement (*tableau XXXVII*).

*Tableau XXXVII: résultats de l'étude alemtuzumab vs chlorambucile en 1ère ligne*

	Alemtuzumab (n=149)	Chlorambucile (n=148)	Valeur de p
<b>Taux de réponse globale</b>	83,2%	55,4%	< 0,0001
Taux de réponse complète	24,2%	2,0%	< 0,0001
Taux de réponse partielle	59,1%	53,4%	-
<b>Durée de la réponse (mois)</b> (IC 95%)	N=124 16,2 (11,5 – 23,0)	N=82 12,7 (10,2 – 14,3)	-
<b>Temps jusqu'au traitement alternatif (mois)</b> (IC 95%)	23,3 (20,7 – 31,0)	14,7 (12,6 – 16,8)	0,0001



*Figure n°45 : Survie sans progression d'alemtuzumab vs chlorambucile en première ligne*

Patients atteints de leucémie lymphoïde chronique B traités en première ligne par voie sous-cutanée

Une étude de phase II révèle que l'administration sous-cutanée d'alemtuzumab est très efficace comme traitement de première ligne chez les patients atteints de leucémie lymphoïde chronique B (Lundin J *et al.*, 2002).

Cette étude a été réalisée chez 41 patients présentant les symptômes de LLC-B. Alemtuzumab est administrée par voie sous-cutanée, à une fréquence de 3 fois par semaine, pendant une période de 18 semaines. L'administration sous-cutanée a montré un bon degré de tolérance. En

effet, les réactions de première dose, qui sont fréquentes après administration intraveineuse, ont été rares ou absentes dans cette étude. De plus, l'apparition de nausées, dyspnées, diarrhées, rash et hypotension a également été rare, voire absente. Une réaction cutanée au point d'injection a été observée chez 90% des patients mais fut transitoire. Chez 21% des patients, une neutropénie transitoire de grade 4 s'est développée. Les infections ont été rares. La voie sous-cutanée semblerait induire une réduction des coûts de soins en comparaison aux perfusions intraveineuses.

Le taux de réponse globale de 87% a été étayé par d'impressionnants résultats, avec un taux de rémission complète de 19% et de rémission partielle de 68%. Le taux de réponse complète dans le sang a été de 95% avec une médiane de durée de 21 jours. Pour ce qui a trait aux ganglions lymphatiques, le taux de réponse globale a été de 87% (avec un taux de rémission complète de 29%). Quant à la moelle osseuse, le principal siège de la maladie, le taux de réponse globale/rémission partielle a été de 79% et le taux de réponse complète de 45% après une durée de traitement de 18 semaines. Ces réponses spectaculaires sont dues, croit-on, au traitement prolongé offert dans le cadre de l'étude.

#### *Patients atteints de leucémie prolymphocytaires T*

Les manifestations de cette variété rare de leucémie dominant dans le sang, la rate et la moelle osseuse ; les adénopathies sont habituellement modestes ou absentes. Ce profil clinico-biologique particulier et la forte expression de l'antigène CD52 à la surface de ces cellules permettent d'augurer des résultats thérapeutiques avec alemtuzumab d'autant plus intéressants que cette variété de leucémie est habituellement peu sensible aux chimiothérapies par alkylants et aux analogues des purines. Deux courtes séries (il s'agit d'une maladie rare) montrent l'intérêt d'alemtuzumab dans cette variété de leucémie (Pawson R *et al.*, 1997 ; Cazin B *et al.*, 1999). Les réponses sont observées avec une fréquence décroissante dans le sang, la moelle, la rate et à moindre degré les ganglions. D'autres sites d'infiltration pro-lymphocytaire paraissent très sensibles à ce traitement : régression de l'atteinte de la peau. En revanche, l'atteinte des méninges, de la plèvre, du péritoine est peu sensible à l'administration d'alemtuzumab.

#### **5.2.5. Indication thérapeutique**

MabCampath® est indiqué dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique à cellules B (LLC-B) pour laquelle une polychimiothérapie comportant de la fludarabine n'est pas appropriée.

### **5.3. Cible : antigène CD33 couplé à la calichéamicine : ozogamicine de gemtuzumab – Mylotarg®**

#### **5.3.1. Description et mécanisme d'action d'ozogamicine de gemtuzumab**

Ozogamicine de gemtuzumab est un anticorps monoclonal IgG4 kappa conjugué à un antibiotique cytotoxique antitumoral, la calichéamicine, naturellement produite par une bactérie, *Micromonospora echinospora calichensis*. La principale caractéristique de cette famille d'antibiotique est la présence d'une structure cyclique très réactive, couramment appelée ogive, qui donne à ces molécules la capacité d'endommager l'ADN des cellules vivantes et donc de provoquer l'apoptose de la cellule. Ozogamicine de gemtuzumab a pour cible l'antigène CD33, situé à la surface des myéloblastes leucémiques chez plus de 80% des patients atteints de leucémie myéloïde aiguë, et des cellules normales immatures de la lignée myélomonocytaire, mais absent à la surface des cellules souches hématopoïétiques. Les séquences d'acides aminés d'ozogamicine de gemtuzumab sont à 98,3% d'origine humaine. Ozogamicine de gemtuzumab est constituée de 50% d'anticorps conjugué à la toxine et 50% d'anticorps non conjugué. Sa masse moléculaire est comprise entre 151K et 153 K.

La liaison de l'anticorps avec l'antigène CD33 provoque la formation d'un complexe qui est ensuite internalisé. Une fois l'internalisation, le dérivé calichéamicine est relargué jusqu'aux lysosomes des cellules myéloïdes. La toxine va ainsi se lier à l'ADN et entraîner la mort cellulaire.

#### **5.3.2. Etudes cliniques**

L'efficacité et la sécurité d'ozogamicine de gemtuzumab en monothérapie ont été évaluées chez 277 patients dans trois études cliniques ouvertes, simple bras, chez des patients atteints d'une leucémie myéloïde aiguë, CD33 positif, après un premier échec.

Ces études ont inclus 84, 95 et 98 patients. Dans les deux premières études, les patients étaient âgés d'au moins 18 ans avec une durée de première rémission d'au moins 6 mois. Dans la troisième étude, seules les patients âgés d'au moins 60 ans ont été inclus avec une durée de première rémission d'au moins 3 mois.

Un cycle de traitement correspondait à deux doses de 9 mg/m<sup>2</sup> séparés par 14 jours et un suivi de 28 jours après l'administration de la dernière dose.

L'objectif primaire de ces trois études était de déterminer le taux de rémission complète. Une rémission complète était définie comme une absence de blastes leucémiques dans le sang périphérique, la présence de 5% ou moins de blastes dans la moelle osseuse, une hémoglobine supérieure ou égale à 9 g/dL, des plaquettes supérieures ou égales à 100 10<sup>9</sup>/L,

des neutrophiles supérieurs ou égales à  $1,5 \cdot 10^9/L$ , et aucune transfusion de globules rouges dans les deux semaines et aucune de transfusion de plaquettes dans la première semaine. En plus de la détermination d'une rémission complète, la réponse d'une deuxième catégorie, rémission complète partielle, a été définie comme les patients répondant à la définition d'une rémission complète avec comme exception le critère des plaquettes supérieures ou égales à  $100 \cdot 10^9/L$ . Cette catégorie a été rajoutée car le traitement par ozogamicine de gemtuzumab apparaît provoquer un retard à la récupération du nombre de plaquettes chez certains patients. Le taux global de réponse de ces trois études poolées, après traitement par ozogamicine de gemtuzumab en monothérapie, était de 26% (71/277) avec 13% (35/277) de rémission complète (RC) et 13% (36/277) de rémission complète partielle (RCp). Le temps médian de rémission complète était de 60 jours pour les deux groupes (rémission complète et rémission complète partielle). Les deux principaux déterminants d'une réponse sont l'âge et la durée de la première rémission (*tableau XXXVIII*).

*Tableau XXXVIII : pourcentage de réponses selon la catégorie de rémission et le groupe pronostic*

Type de rémission	Age < 60 ans	Age >= 60 ans	1ère rémission ≥ 12 mois	1ère rémission 6 – 12 mois	1ère rémission < 6 mois
	n=120	n=157	n=116	n=128	n=37
RC (%)	13	12	18	10	5
(IC 95%)	(8,21)	(7,18)	(12,26)	(5,16)	(1,18)
RCp (%)	14	12	16	12	5
(IC 95%)	(8,22)	(7,18)	(10,24)	(7,19)	(1,18)
OR (RC+RCp) (%)	28	24	35	22	11
(IC 95%)	(20,36)	(18,32)	(26,44)	(15,30)	(3,25)

La survie globale fut calculée depuis la date d'initiation de la thérapie jusqu'à la date du décès ou la date du cut-off des données, et la survie sans progression (durée de rémission) a été définie comme la période entre la date de la réponse et la date de la rechute, décès ou date de cut-off des données (*tableau XXIX*).

*Tableau XXIX : résumé de la survie sans progression pour les patients avec une réponse complète et une réponse complète partielle*

Type de rémission	n	Survie sans progression Médiane (mois)	Survie globale Médiane (mois)
RC	35	6,4	12
RCp	36	4,5	12,7
OR (RC+RCp)***	71	5,2	12,4



### 5.3.3. Indication thérapeutique

Mylotarg® est indiqué aux Etats-Unis pour le traitement des patients présentant une leucémie myéloïde aiguë, CD33 positif, après premier échec, de plus de 60 ans, qui ne sont pas considérés candidats aux chimiothérapies cytotoxiques.

En Europe, Mylotarg® a reçu la désignation de médicament orphelin le 18 octobre 2000 pour la leucémie aiguë myéloïde. Cependant, le 20 septembre 2007, l'EMA a opté pour un avis négatif à l'autorisation de mise sur le marché de Mylotarg® dans la leucémie aiguë myéloïde, pour manque de données telles que la comparaison de l'efficacité de Mylotarg® à celle d'autres traitements utilisés dans cette maladie. De plus, des effets indésirables sont associés à Mylotarg tels qu'une suppression grave et durable de la moelle osseuse entraînant de faibles numérations de globules blancs et de plaquettes, et des troubles du foie (<http://www.emea.europa.eu>)

## 5.4. Cible : antigène CD22

### 5.4.1. Anti-CD22 « nu » : epratuzumab

Epratuzumab est un anticorps monoclonal humanisé qui se fixe sur l'antigène CD-22, qui, une fois fixé à l'anticorps, subit une endocytose. L'antigène CD-22 est largement présent sur les lymphocytes B normaux et malins. Sa distribution est comparable à celle du CD20 bien que son expression soit plus variable.

Concernant le développement clinique, plusieurs études ont montré une activité d'epratuzumab en monothérapie dans le lymphome non hodgkinien en rechute, et semble potentialiser rituximab. 16 patients atteints d'un lymphome non hodgkinien indolent et 7 patients atteints d'un lymphome non hodgkinien à grandes cellules B ont été traités par 360 mg/m<sup>2</sup> d'epratuzumab suivi de 375 mg/m<sup>2</sup> de rituximab pendant 4 cures hebdomadaires. Tous les patients étaient en rechute et n'avaient jamais été traités par rituximab. L'évaluation a été faite 4 semaines après la fin des injections. La tolérance de l'association était similaire à celle de rituximab en monothérapie. Sur les 16 patients atteints d'un lymphome non hodgkinien indolent évaluable, 10 ont répondu à l'association (63%) dont 9 (56%) ont présenté une rémission complète. Sur les 6 patients atteints d'un lymphome non hodgkinien à grandes cellules B évaluable, 4 ont répondu (67%) dont 3 (50%) ont présenté une rémission complète. Le temps médian jusqu'à progression était de 17,8 mois chez les patients atteints d'un lymphome non hodgkinien indolent (John P *et al.*, 2005).

Les résultats d'une étude multicentrique, de phase II, chez des patients atteints d'un lymphome non hodgkinien diffus à grandes cellules B traités par l'association epratuzumab plus rituximab plus chimiothérapie standard ont été présentés lors du congrès international de l'ASCO 2009. 80 patients non traités pour leur maladie ont reçu epratuzumab à la dose de 360 mg/m<sup>2</sup> suivi d'un administration de rituximab à la dose de 375 mg/m<sup>2</sup> associé à une chimiothérapie standard CHOP toutes les 3 semaines pendant 6 cycles. 94% des patients ont répondu à cette association avec 71% de rémission complète et 23% de rémission partielle. Le taux de survie sans événement à 12 mois et 24 mois était de 79% et 59% respectivement.

L'association dans le traitement du lymphome non hodgkinien de deux anticorps monoclonaux ciblant des antigènes différents semble être une bonne approche thérapeutique.

#### 5.4.2. Anticorps monoclonal radiomarqué : <sup>90</sup>Y epratuzumab

Les résultats d'une étude multicentrique, entreprise pour déterminer la sécurité d'emploi et le dosage optimal d'epratuzumab couplé au radioisotope 90 Yttrium, ont été présentés lors du congrès international de l'ASCO 2008. L'administration de cet anticorps monoclonal a été réalisée de façon fractionnée (une fois par semaine pendant 2 ou 3 semaines), l'idée étant que ce mode d'administration permettrait d'augmenter la dose délivrée tout en engendrant moins de toxicité. La dose était répétée jusqu'à l'apparition de deux toxicités limitantes. Les 64 patients inclus étaient atteints d'un lymphome non hodgkinien à cellules B, n'ayant pas répondu à au moins une chimiothérapie standard (en moyenne deux). Du point de vue de la tolérance, les résultats rapportés indiquent une toxicité hématologique attendue (aplasie médullaire transitoire) assez facilement gérable. Au total, 30 patients ont présenté au moins un effet secondaire pouvant être en rapport avec le traitement : nausées, asthénie, bronchite et myalgies. En terme de réponse au traitement, une rémission complète a été observée dans 30 cas sur 61 patients et le taux de réponse globale était de 60%. Les rémissions complètes obtenues semblent durables, 16 patients sont restés sans progression plus d'un an dont 5 pour lesquels l'absence de progression est de 2 à 4 ans. Il existe une relation dose-effet ; plus la dose cumulée est importante, plus le taux de réponses objectives et de réponses complètes augmente (*tableau XL*).

*Tableau XL : résultats selon la dose cumulée de <sup>90</sup>Y-epratuzumab*

Dose totale (mCi/m <sup>2</sup> )	Réponses objectives	Réponses complètes
≤ 15	43 % (10/23)	30% (7/23)
20-30	59% (13/22)	50% (11/22)
37,5-45	100% (16/16)	75% (12/16)

### **5.4.3. Anticorps couplé à un cytotoxique : inotuzumab ozogamicine (CMC 544)**

Le CMC-544, inotuzumab ozogamicine, est un anticorps monoclonal dirigé contre le CD22 et couplé à la calicheamycine, une molécule antibiotique cytotoxique. Un essai de phase I-II rapporte les données cliniques des 34 premiers patients inclus, porteurs d'un lymphome non hodgkinien en rechute ou réfractaire. La dose maximale tolérée est de 1,8 mg/m<sup>2</sup> toutes les 3-4 semaines. L'effet secondaire le plus fréquent est la thrombopénie (65 %, dont 38 % de grade 3-4) avec un nadir à 9 jours. 50 % des patients sont répondeurs pour des doses allant de 0,8 à 2,4 mg/m<sup>2</sup> et 4 des 6 patients inclus dans la deuxième phase du protocole utilisant la dose maximale tolérée sont répondeurs. Des essais *in vitro* et *in vivo* suggèrent une action synergique avec le rituximab.

## **5.5. Effets secondaires des traitements par anticorps monoclonaux en hématologie**

Les effets secondaires des anticorps monoclonaux sont liés à leur mécanisme d'action. Pour les comprendre, il faut donc prendre en compte à la fois l'antigène cible (déplétion lymphocytaire B ou T par exemple), mais aussi la molécule couplée à l'anticorps monoclonal qui engendre sa propre toxicité. Le développement des anticorps humains antisouris (HAMA) et des anticorps humains anti-anticorps chimériques (HACA) a une incidence faible (1 à 5%) est sans conséquence clinique.

### **5.5.1. Les effets secondaires immédiats à court terme**

#### ***Les réactions en cours de perfusion***

L'injection de l'anticorps peut s'accompagner d'une série de réactions liées à l'administration du médicament. Celles-ci surviennent essentiellement lors de la première perfusion et elles vont avoir tendance à diminuer, voire à disparaître lors des perfusions ultérieures. Ces réactions sont le plus souvent modérées (grades 1 à 2). Leur intensité est directement liée à la vitesse de perfusion. Les symptômes les plus fréquemment rapportés (environ 50% des patients) sont de la fièvre et des frissons. D'autres manifestations d'inconfort comme les céphalées, les nausées, ou une sensation d'asthénie ont été rapportées. Les symptômes d'allure allergique, à tropisme cutané (prurit, éruption, urticaire), respiratoires (bronchospasmes, toux, dyspnée), ou cardiovasculaires (hypotension) sont parfois notés. Le mécanisme le plus communément admis pour expliquer ces phénomènes est un relargage cytokinique, en particulier de TNF $\alpha$ , interféron- $\gamma$  et IL-6 (Winkler U *et al.*, 1999). Afin d'éviter cet événement, la vitesse de perfusion sera lente initialement (50 mg par heure) puis augmentée progressivement toutes les 30 à 60 minutes, en

fonction de la tolérance clinique jusqu'à une vitesse de perfusion de 300 à 400 mg/heure. Pendant cette phase d'augmentation de la vitesse de perfusion, il faut surveiller régulièrement le pouls, la tension artérielle et la température. Lorsque des réactions liées à la perfusion apparaissent, l'arrêt du traitement, jusqu'à disparition complète des symptômes, est nécessaire. L'administration peut alors être reprise à une vitesse réduite de moitié par rapport à celle à laquelle sont survenus les symptômes.

### ***Les syndromes de lyse tumorale***

Les patients avec une forte masse tumorale, qu'il s'agisse d'un taux élevé de cellules lymphomateuses circulantes, de volumineuses adénopathies superficielles ou profondes, ou d'une importante hépatosplénomégalie, peuvent présenter dans les heures ou les premiers jours qui suivent l'administration de l'anticorps un syndrome de lyse tumorale comparable à celui que l'on observe avec la chimiothérapie (Abou Mourad Y *et al.*, 2003). Elle se manifeste classiquement par des perturbations métaboliques (hyperphosphorémie, hyperuricémie), et peut se compliquer d'une insuffisance rénale aiguë.

### ***Les précautions liées à l'utilisation des anticorps radiomarqués***

Les anticorps monoclonaux radiomarqués à l'yttrium ou à l'iode posent, lors de l'utilisation, des problèmes liés à l'émission de radiations  $\beta$  (pour  $^{90}\text{Y}$  et  $^{131}\text{I}$ ) ou  $\gamma$  (pour  $^{131}\text{I}$ ). L'émission de radiations  $\beta$  expose le patient, son environnement ou le personnel soignant à des risques faibles, ce qui permet d'envisager un traitement en ambulatoire. Pour ce qui concerne les patients traités avec un anticorps monoclonal conjugué à  $^{131}\text{I}$ , l'hospitalisation dans des conditions strictes de radioprotection est par contre nécessaire. Les patients ne peuvent être autorisés à retourner à domicile que lorsque la radioactivité émise est inférieure à 500 mRem. Pendant la semaine qui suit l'administration du traitement, tout contact étroit et prolongé avec d'autres personnes doit être évité (Cheson BD, 2003).

## **5.5.2. Les effets secondaires à moyen et long terme**

### ***Les problèmes infectieux***

Selon le type d'anticorps monoclonal utilisé, les complications infectieuses observées seront, liées soit à la déplétion des populations lymphoïdes correspondant à l'antigène cible (lymphocyte B ou lymphocyte T), soit à la toxicité propre de la molécule couplée à l'anticorps monoclonal, qu'il s'agisse d'un isotope radioactif ( $^{90}\text{Y}$  ou  $^{131}\text{I}$ ), ou d'un cytostatique comme la calichéamicine.

### ***Les infections liées à la déplétion lymphocytaire B***

Dans la plupart des grandes séries qui ont été publiées, une déplétion lymphocytaire B assez nette est notée, mais le taux d'infection reste relativement modéré et le plus souvent peu sévère (seulement 9% d'infections de grade 3, et aucune infection de grade 4) (McLaughlin P *et al.*, 1998).

### ***Les déplétions lymphocytaires T***

A l'inverse de ce qui vient d'être dit précédemment, les déplétions lymphocytaires T massives et prolongées s'accompagnent de complications infectieuses significatives. Il résulte de l'administration de ce type d'anticorps, un véritable syndrome d'immunodéficience acquise, induit par le médicament (Tang SC *et al.*, 1996).

### ***Les neutropénies***

Des neutropénies de grade 3 ou 4 peuvent être observées après utilisation des anticorps monoclonaux radiomarqués. Celles-ci surviennent en général plus tard qu'avec la chimiothérapie, soit approximativement cinq à sept semaines après le traitement. Elles sont également plus prolongées qu'avec les chimiothérapies à doses standard et durent en général deux à quatre semaines. La toxicité des dérivés liés à <sup>90</sup>Y, serait plus importante que celle des dérivés liés à <sup>131</sup>I (Cheson BD, 2003).

L'utilisation d'ozogamicine de gemtuzumab est également associée, dans environ 40% des cas, à des neutropénies de grade 3 ou 4 compliquées d'infection bactérienne. Ces neutropénies sont souvent longues, puisqu'il est habituel d'observer des aplasies d'au moins 45 jours lorsqu'on utilise le schéma thérapeutique classique.

De façon plus surprenante et sans qu'aucun mécanisme physiopathologique satisfaisant ne soit retrouvé dans la littérature, on observe régulièrement des cytopénies de grade 3 ou 4 après traitement par l'alemtuzumab (Tang SC *et al.*, 1996).

### ***Hépatotoxicité du gemtuzumab ozogamicin***

Dans la plupart des études qui ont été publiées, environ 25% des malades traités par ozogamicine de gemtuzumab présentent des perturbations du bilan hépatique. Dans certains cas, le tableau est typiquement celui d'une maladie veino-occlusive du foie avec ascite, prise de poids et élévation de la bilirubine (Bastie JN *et al.*, 2002). Les biopsies hépatiques, lorsqu'elles ont été réalisées, montrent des altérations des cellules endothéliales hépatiques avec présence de dépôts de collagène. Le mécanisme physiopathologique de cette hépatotoxicité pourrait être lié à une fixation d'ozogamicine de gemtuzumab sur les cellules de Kupffer hépatiques qui expriment l'antigène CD33 (Sievers EL and Linenberger M, 2001).

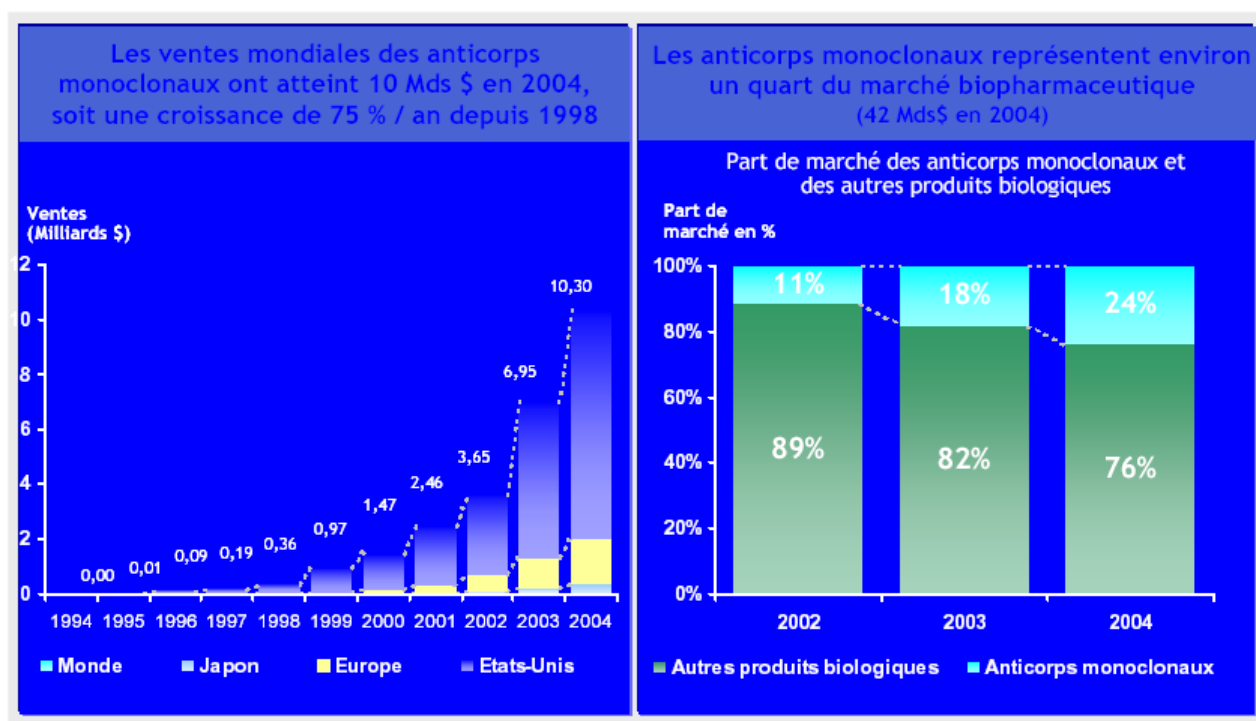
### ***Les cytopénies auto-immunes***

Plusieurs observations ont été rapportées de neutropénie survenant de façon retardée (deux à six mois), après traitement par rituximab. Les causes classiques de neutropénie retardée (rechute de l'hémopathie sous-jacente, toxicité tardive de la chimiothérapie) ont pu être exclues dans la plupart des cas. Le mécanisme exact de ces neutropénies reste incertain, mais plusieurs hypothèses ont été formulées. Pour certains auteurs qui ont constaté l'expansion de clones lymphocytaires T de type LGL, il pourrait y avoir une apoptose des polynucléaires neutrophiles ou de leur précurseur, induite par la voie d'activation Fas (Papadaki T *et al.*, 2002). D'autres équipes n'ont pas constaté d'expansion lymphoïde T et formulent l'hypothèse d'une récupération immunologique aberrante, avec apparition de clones lymphocytaires B auto-immuns après la période de lymphopénie induite par le rituximab (Voog E *et al.*, 2003).

Une équipe a rapporté la survenue d'une anémie hémolytique auto-immune dans les suites immédiates d'un traitement par rituximab ayant entraîné une déplétion lymphocytaire majeure. L'hypothèse de l'émergence d'un clone plasmocytaire autoréactif, favorisé par la déplétion lymphocytaire B, avait été évoquée (Jourdan E *et al.*, 2003). On constate donc, à travers ces différentes observations, qu'il est vraisemblable que les déséquilibres immédiats ou secondaires des différentes sous-populations lymphocytaires induits par rituximab puissent conduire à l'émergence de nouveaux clones pathologiques auto-immuns.

## 6. Economie des anticorps monoclonaux

En 2008, le cancer est le premier marché du médicament dans le monde. Selon IMS Health, société d'études spécialisées dans la pharmacie, la cancérologie, considérée comme une niche voilà quelques années, représente 41 milliards de dollars de chiffre d'affaires (34 milliards d'euros) contre 24 milliards en 2004 (+ 16% par rapport à 2003) (*figure n°46*). Les anticorps monoclonaux sont le segment de l'industrie pharmaceutique dont la croissance est la plus rapide. Selon une étude récente, ces produits devraient atteindre un taux de croissance annuel moyen de 14% entre 2008 et 2012.



*Figure n°46 : les anticorps monoclonaux, un marché en forte croissance (www.leem.org)*

Le Plan cancer 2003 a chiffré à 15 milliards d'euros le coût de la maladie seule sur le territoire national. Un traitement du cancer du sang par Mabthera® coûte entre 7 000 et 14 500 euros par an en France. L'Herceptin®, pour le cancer du sein, peut justifier des coûts de 10 000 à 20 000 euros par an. Mais un médicament comme l'Avastin peut générer des coûts qui vont de 3 000 à 7 000 euros par mois, selon la gravité de la maladie.

## 6.1. Exemple de trastuzumab

La chimiothérapie du cancer du sein se caractérise par la diversité des protocoles employés et l'utilisation de nouvelles molécules coûteuses posant le double problème du bénéfice pour les patientes et des conséquences financières pour les établissements de santé.

En mai 2006, l'Agence européenne du médicament (EMA) a octroyé à l'Herceptin® une autorisation de mise sur le marché dans l'indication « traitement adjuvant du cancer du sein avec surexpression tumorale de HER2, après chirurgie, chimiothérapie (néoadjuvante ou adjuvante) et radiothérapie (si indiquée) ». La décision de l'EMA est fondée notamment sur les résultats de l'étude internationale Hera, qui a montré que le trastuzumab administré après chimiothérapie standard réduit de 46 % le risque de rechute de la maladie par comparaison à la chimiothérapie seule. La présente évaluation a pour objectifs de projeter les bénéfices cliniques et d'estimer l'impact économique du trastuzumab dans cette indication.

Le traitement étudié est le trastuzumab administré à une dose de charge de 8 mg/kg, suivie d'une dose de 6 mg/kg toutes les 3 semaines. La durée du traitement est de 52 semaines, en l'absence d'une contre-indication à la poursuite du traitement ou d'une rechute du cancer du sein. Le comparateur est l'absence de traitement adjuvant (bras observation).

La valorisation des coûts a été limitée aux coûts directs hospitaliers. Les frais de transport des patientes, ainsi que les coûts des soins non hospitaliers n'ont pas pu être estimés. Les coûts ont été estimés en valeur 2006 et ont été actualisés au taux de 3 %. Les bénéfices sur la mortalité ont été actualisés au même taux.

Un modèle de projection (dit « de Markov ») a été développé et adapté au contexte français. Il simule l'histoire de la maladie sous la forme d'une évolution entre différents états de santé ou stades de la maladie au cours du temps. Il considère deux cohortes fictives d'âge moyen 55 ans. Chaque cycle a une durée d'un an. L'horizon temporel a été fixé à 45 ans, ce qui correspond à l'extinction quasi-totale des cohortes. Lors de chaque cycle, les patientes peuvent évoluer d'un état à l'autre selon des probabilités de transition estimées sur la base des données de l'essai pivot international HERA. Cinq états de santé ont été pris en compte :

- l'absence d'événement (ni rechute, ni événement indésirable, ni décès) ;
- la survenue d'une récurrence (locorégionale ou contralatérale) ;
- la survenue d'une métastase ;
- la survenue d'un événement indésirable cardiaque (pour les patientes traitées par trastuzumab) ;
- le décès (toutes causes).

Le point de départ du modèle se situe en aval du traitement initial du cancer (chirurgie, chimiothérapie ± radiothérapie), considéré comme identique dans les deux bras et en amont de la décision de la poursuite d'une thérapie adjuvante.



### **Estimation des coûts unitaire par « état de santé »**

Les coûts associés au traitement des métastases ont été estimés successivement pour la première année après le diagnostic et en moyenne par année suivante.

Dans un premier temps, considérant l'ensemble des lignes de chimiothérapie mises en œuvre au cours de la première année, le coût moyen par patiente des chimiothérapies est de 7 102 € (n = 254). Il est à noter que 44 % de ces coûts sont imputables au trastuzumab (3 129 €). Le coût moyen des hospitalisations complètes et des séances s'élève (année 1) à 16 771 € ( $\pm$  8 923 €) par patiente (n = 38). Au total, la première année, les coûts de prise en charge d'une métastase ont été estimés à 23 873 € (séjours et coûts de chimiothérapie inclus).

Ensuite, de façon similaire, le coût moyen de la chimiothérapie pour les femmes ayant fait l'objet d'un traitement à partir de la deuxième année après le diagnostic de métastase a été calculé. Le coût moyen annuel des chimiothérapies de ces patientes a été estimé à 5 828 € (n = 33). Au total, le coût moyen annuel de prise en charge d'une métastase les années suivantes a été estimé à 17 087 € (séjours et coûts de chimiothérapie inclus).

Le coût moyen de la chimiothérapie (tous traitements confondus) pour les patientes traitées au cours de la période d'observation pour une récurrence locorégionale a été de 5 907 € ( $\pm$  6 572) par patiente (n = 39). Ce montant était associé à un coût moyen pour les séjours en hospitalisation complète et en séances de 5 607 € par patiente. La durée moyenne de la prise en charge d'une récurrence de ce type a été de 85 jours. Les auteurs ont estimé que les coûts des chimiothérapies pour récurrence sont engagés seulement au cours de la première année suivant leur diagnostic. Les années ultérieures, seul le coût de suivi est pris en compte. Pour la première année, les coûts de prise en charge d'une récurrence locorégionale ont donc été estimés à 11 514 €. Les auteurs estiment que le coût moyen des récurrences contralatérales est équivalent à celui d'une récurrence locorégionale.

Les coûts en absence d'événement concernent les coûts de suivi des patientes en l'absence de rechute. L'hypothèse de 3 consultations de suivi par un oncologue et d'une mammographie par patiente et par an a été retenue. Le montant total estimé est de 135 €.

Le coût d'un événement cardiaque sévère a été estimé d'après les données de l'étude Epical qui décrit une cohorte représentative de 358 patients hospitalisés pour la première fois pour insuffisance cardiaque sévère (Nyha III et IV) et suivis pendant 1 an. Le coût annuel moyen retenu est de 11 000 €. Les coûts des événements indésirables non sévères ont été calculés sur la base des posologies standard de bêtabloquants et des inhibiteurs de l'enzyme de conversion correspondant à la prise en charge annuelle d'une insuffisance cardiaque de stade Nyha II. Le montant associé est estimé à 455 €.

Les coûts du trastuzumab en situation adjuvante sont décomposés en trois postes :

- Coût du test HER2 : 70 €. Dans une optique conservatrice, les coûts de dépistage de HER2, que le résultat du test soit positif ou négatif, ont été entièrement affectés à la

cohorte recevant du trastuzumab sur la première année. En considérant que 20 % des patientes dépistées pouvaient bénéficier du traitement par trastuzumab, le coût du test par patiente surexprimant HER2 est alors de 350 €.

- Coûts d'acquisition et d'administration du médicament : le schéma posologique de trastuzumab en situation adjuvante est de 8 mg/kg en dose de charge puis 6 mg/kg toutes les 3 semaines pendant 1 an. Le coût du traitement a été calculé sur la base d'un tarif de responsabilité de 619,40 € HT par flacon de 150 mg. En considérant un poids moyen de 66,2 kg, le coût de traitement obtenu s'élève ainsi à 30 070 € TTC par patiente. Par ailleurs, les coûts d'administration du produit ont été ajoutés au coût du traitement en considérant 18 séances de chimiothérapie à 420 € par séance, soit 7 560 € par patiente et par an.
- Coût du monitoring cardiaque (hors effets indésirables sévères) : le bilan initial comporte un électrocardiogramme (ECG), un échocardiogramme ou scintigraphie initial, suivi d'un échocardiogramme ou scintigraphie (surveillance de la FEGV) à 3, 6, 9 et 12 mois. Le coût total du monitoring cardiaque classique sur un an a été évalué à 1 019 €.

Le tableau XLI synthétise les coûts unitaires estimés pour les états de santé et procédures médicales considérés.

*Tableau XLI : coûts unitaires des états de santé et des principales procédures médicales*

État ou procédure	Coûts unitaires en Euro
Traitement par trastuzumab en adjuvant (1 <sup>re</sup> année)	37 630 (y compris coût d'administration)
Test HER2 (1 <sup>re</sup> année)	70 (par procédure) ou 350 par patiente
Monitoring cardiaque de trastuzumab (1 <sup>re</sup> année)	1 019
Récidive locorégionale ou controlatérale (1 <sup>re</sup> année)	11 514
Métastase (1 <sup>re</sup> année)	23 873
Métastase (années suivantes)	17 087
Suivi en l'absence d'événement (1 an)	135
Événement indésirable cardiaque non sévère (1 an)	455
Événement indésirable cardiaque sévère (1 an)	11 000

Pour l'expression des résultats, deux cohortes de 1 000 patientes chacune ont été considérées (une cohorte de patientes ayant reçu trastuzumab pendant un an et l'autre n'en ayant pas reçu). Le nombre cumulé d'événements évités grâce à l'administration pendant un an de trastuzumab en adjuvant correspond aux différentiels de ces effectifs entre les deux bras à l'année N. Les résultats sont présentés dans le tableau XLII.

La survie globale moyenne d'une patiente traitée par trastuzumab est de 20,08 versus 16,23 ans dans le bras observation, soit un gain de 3,85 années-vie en faveur de trastuzumab. Ce gain de survie globale résulte pour l'essentiel du fait que les patientes bénéficiant du

traitement par trastuzumab demeurent plus longtemps dans un état en l'absence d'événements (récidive, métastase ou effets indésirables sévères), en moyenne 14,27 ans pour le groupe trastuzumab versus 10,15 ans pour le groupe observation. L'efficacité sur la survie globale est essentiellement liée au nombre de métastases évitées sur les 10 à 15 premières années. En effet, une fois parvenues au stade métastatique, les patientes ont des médianes de survie qui se situent entre 18 à 24 mois, quel que soit le traitement adjuvant reçu antérieurement.

*Tableau XLII : nombre cumulé d'événements évités au cours du suivi d'une cohorte de 1 000 patientes initialement traitées en adjuvant par trastuzumab*

<b>Années de suivi et patientes survivantes (nb) [bras observation-bras trastuzumab]</b>	<b>Récidives (tous types) évitées</b>	<b>Métastases évitées</b>	<b>Décès évités</b>
1 [997-997]	14,4	37,7	0,0
2 [974-983]	26,1	70,7	8,9
3 [939-963]	35,5	99,7	23,4
4 [896-938]	43,0	125,1	41,2
5 [848- 909]	48,8	147,3	60,6
10 [622-755]	49,7	179,5	133,4
15 [457- 612]	42,2	174,3	154,9
20 [337- 482]	36,0	165,2	145,8
25 [236-358]	31,0	154,6	121,9
30 [147-234]	27,4	144,7	87,3
35 [72-120]	25,2	137,6	47,6
40 [24-40]	24,3	134,0	16,6

Le coût total hospitalier moyen par patiente sur la durée totale de suivi des cohortes s'élève à 99 024 € dans le bras trastuzumab versus 71 310 dans le bras observation. Dans le bras trastuzumab, près de 50 % des coûts sont des coûts de traitement et sont supportés sur la première année. Dans le bras observation, le coût de la prise en charge au stade métastatique constitue la part la plus importante du coût total (93 % des dépenses) (tableau XLIII). Le différentiel de coût entre les deux stratégies thérapeutiques s'élève ainsi à + 27 714 € à l'extinction complète des cohortes (45 ans). Le surcoût de trastuzumab observé la première année est partiellement compensé par les économies liées au nombre de métastases évitées. Le bénéfice économique associé aux récurrences évitées est, quant à lui, faible (2 907 versus 3 153 €). En effet, les gains liés aux cas incidents évités sont presque annulés par l'augmentation des coûts de suivi dans le bras trastuzumab résultant de l'allongement de la période de survie sans métastase. L'augmentation de la survie initiale en l'absence d'événement dans le bras

trastuzumab explique également le fait que les coûts de suivi des patientes sans événement soient plus élevés chez les patientes bénéficiant de trastuzumab (1 926 versus 1 371 €).

*Tableau XLIII : coûts moyens par patiente (Euro) sur la période totale de suivi (45 ans)*

États	Trastuzumab	Observation	Différentiel
Traitement initial (médicament et administration), dépistage HER2 et monitoring cardiaque	38 999 <sup>a</sup>	-	+ 38 999
Suivi en absence d'événements	1 926	1 371	+555
Récidives	2 907	3 153	-246
Métastases	55 163	66 786	-11 624
Événements cardiaques	29	-	+29
<b>Total</b>	<b>99 024</b>	<b>71 310</b>	<b>+27 714</b>

<sup>a</sup>37 630 € + 350 € + 1 019 €

La méthodologie des études pharmacoéconomiques s'appuie sur le calcul de ratios coût/efficacité. Il s'agit du rapport de la différence des coûts sur la différence d'efficacité des deux stratégies avec ou sans trastuzumab. Ces ratios s'expriment en coûts par année de vie gagnée et sont présentés dans le tableau XLIV.

Les rapports entre les différentiels de coûts et d'efficacité en survie pondérée par la qualité de vie (Quality Adjusted Life Years ou Qaly) sont aussi présentés dans le tableau XLV.

En prenant en compte un taux d'actualisation des coûts et des bénéfices de 3 %, les valeurs des ratios coût/efficacité/utilité s'élèvent respectivement à 12 148 € par année de vie gagnée et à 14 854 € par Qaly gagné.

Ces résultats actualisés, comparés à ceux obtenus en l'absence d'actualisation, apparaissent moins favorables pour le trastuzumab du fait que l'ensemble des coûts de traitement sont concentrés sur la première année, alors que les bénéfices en termes d'années de vie gagnées (ou de Qaly) se répartissent sur une longue période de suivi.

*Tableau XLIV : ratios coût/efficacité (CE) en années de vie gagnées*

	Trastuzumab		Observation		Différentiel		
	Coûts (€)	Survie (année)	Coûts (€)	Survie (année)	Coûts (€)	Années de vies gagnées	Ratio C/E
Non actualisé	99 024	20,08	71 310	16,23	27 714	3,85	<b>7 204</b>
Coûts et bénéfices actualisés à 3 %	79 657	14,29	52 062	12,02	27 594	2,27	<b>12 148</b>

*Tableau XLV : ratios coût/utilité (Qaly)*

	Trastuzumab		Observation		Différentiel		
	Coûts (€)	Qaly	Coûts (€)	Qaly	Coûts (€)	Qaly	Ratio C/E
Non actualisé	99 024	14,19	71 310	11,14	27 714	3,05	9 092
Coûts et bénéfices actualisés à 3 %	79 657	10,13	52 062	8,27	27 594	1,86	14 854

De façon générale, la mise sur le marché de trastuzumab a donné lieu à des débats au niveau international sur l'augmentation des coûts des chimiothérapies du cancer et les problèmes de financement associés. La seule approche permettant d'apprécier l'acceptabilité « économique » d'un traitement innovant et coûteux consiste à estimer son efficacité en rapportant les surcoûts entraînés aux bénéfices supplémentaires obtenus.

L'analyse coût/efficacité du trastuzumab en thérapie adjuvante du cancer du sein précoce surexprimant HER2 montre des résultats favorables dès lors que la perspective envisagée s'inscrit dans le long terme (environ 10 à 15 ans). Cette approche à long terme permet d'intégrer de façon significative les bénéfices cliniques du traitement correspondant aux récurrences locorégionales, aux métastases et aux décès évités. Conformément aux approches habituelles de l'évaluation pharmacoéconomique, les ratios coût/efficacité et coût/utilité ont été calculés et indiquent que le trastuzumab en traitement adjuvant du cancer du sein précoce surexprimant HER2 utilisé sur 52 semaines, à la dose de 6 mg/kg toutes les 3 semaines, peut être considéré comme une thérapie coût/efficace dans le contexte du système de santé français. Les ratios obtenus pour le trastuzumab sont du même ordre de grandeur que ceux calculés pour le dépistage du cancer du sein par mammographie en France et ils se situent toujours dans des limites économiquement acceptables si l'on se réfère au seuil de 45 000 €.

## 6.2. Exemple de rituximab

Rituximab, anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène CD20, a montré son efficacité chez les patients atteints d'un lymphome non Hodgkinien de type B en rechute ou réfractaire à la chimiothérapie conventionnelle. L'hôpital La Pitié Salpêtrière a évalué l'impact économique de l'utilisation de rituximab pour traiter les lymphomes non Hodgkinien en comparaison aux protocoles conventionnels de chimiothérapie (CHOP : cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisolone).

Dans cette étude rétrospective réalisée entre 1998 et 2000, les coûts directs des patients traités par rituximab (n=20) ou CHOP (n=17) ont été comparés. Les résultats, comprenant les coûts liés à l'administration de la thérapie, aux examens effectués et à la survenue d'événements indésirables entraînant de hospitalisations, ont prouvé que le coût moyen par patient était comparable pour les deux types de traitement (9700 euros pour rituximab, contre 8487 euros pour la chimiothérapie conventionnelle). Dans le groupe rituximab, le coût était principalement lié à l'achat de la molécule. Dans le groupe chimiothérapie conventionnelle, les dépenses ont été liées à la toxicité induite par le traitement et aux séjours prolongés à l'hôpital (Malliti M *et al.*, 2003).

## **7. Voies de recherche**

Plusieurs voies de recherche sont déjà explorées pour mieux utiliser les anticorps monoclonaux en thérapeutique anticancéreuse. En premier lieu, il est peu probable qu'un anticorps puisse être efficace à lui seul chez un patient avec une tumeur métastatique. Les anticorps monoclonaux devraient plutôt être utilisés en traitement adjuvant lors d'une phase précoce de la maladie. Les traitements habituellement utilisés (chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie) auraient pour rôle d'éliminer les masses tumorales alors que l'immunothérapie par anticorps monoclonaux utilisée en adjuvant éliminerait les cellules tumorales résiduelles. Ce concept n'est pas nouveau, mais il n'a été implémenté que récemment, par exemple pour le traitement adjuvant des cancers du sein avec trastuzumab.

Une autre voie consiste à pallier l'expression hétérogène d'un antigène tumoral et/ou à éviter la sélection clonale de cellules tumorales n'exprimant plus l'antigène cible en utilisant un mélange d'anticorps dirigés contre plusieurs antigènes associés aux tumeurs. Par exemple, une combinaison de trois anticorps a été utilisée pour éliminer avant une transplantation les cellules de lymphomes résiduelles présentes dans la moelle osseuse, conduisant à diminuer par mille à un million de fois le nombre de cellules tumorales.

D'autres anticorps pourraient être actifs indirectement sur les cellules tumorales en stimulant des récepteurs clefs présents sur les cellules du système immunitaire. Parmi les anticorps les plus étudiés, on trouve les anticorps anti-CTLA-4, anti-CD40, anti-CD137 et anti-BAT. Le but de ces anticorps est de stimuler les cellules présentatrices d'antigènes ou les lymphocytes (anti-CD40 ou anti-CD137) ou de bloquer les signaux inhibiteurs délivrés à ces cellules inflammatoires et de les rendre capables d'éradiquer les cellules cancéreuses.

Les anticorps monoclonaux déjà sur le marché sont tous de classe IgG. Le panel d'anticorps actuellement disponibles reste cependant étroit et le développement de nouveaux anticorps permettrait des stratégies de multithérapie ou de substitution d'un anticorps par un autre en cas de baisse d'efficacité ou d'intolérance. Dans ce sens, les IgA monoclonales pourraient s'avérer particulièrement intéressantes du fait de leur capacité à recruter des cellules cytotoxiques exprimant CD89 (polynucléaires notamment). Les IgA peuvent ainsi s'avérer particulièrement utiles car leur fonction diffère de celle des IgG et elles peuvent donc s'en avérer synergiques. De plus, le transport muqueux actif des IgA leur permet d'atteindre une concentration élevée en des zones que ne peuvent atteindre efficacement des anticorps circulants de classe IgG, avec notamment la perspective d'un accès aux localisations muqueuses des lymphomes.

Dans le but de produire de telles IgA, des animaux triplement transgéniques portant les trois modifications génétiques suivantes ont été produits :

- le locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines a été modifié de telle sorte que l'expression des IgM endogènes ne soit plus possible, et soit remplacée par celle de chaînes lourdes humaines de classe alpha1 ; les régions variables ont été respectées de façon à permettre aux animaux de réaliser normalement les recombinaisons VDJ et de constituer ainsi un répertoire diversifié de chaînes lourdes ;
- un transgène codant une chaîne légère humaine kappa a été introduit dans le génome, flanqué d'éléments qui lui permettent de bénéficier du processus normal d'hypermutation somatique et donc de générer ainsi un répertoire semi-diversifié de régions variables de chaînes légères ;
- un knock-out de la chaîne légère murine K endogène. Dans le modèle animal, les IgA humanisées constituent l'anticorps sérique prédominant et des hybridomes producteurs d'IgA humanisées peuvent être dérivés après immunisation des animaux. Des tests pour obtenir des IgA monoclonales spécifiques du BCR de cellules lymphomateuses et tester leur cytotoxicité dans des modèles *in vitro* et *in vivo* sont également en cours.

Les IgA humanisées pourraient trouver des applications en complément ou en substitution à la chimiothérapie ou à l'immunothérapie conventionnelle vis-à-vis des lymphomes et de nombreux autres cancers à localisation muqueuse.



## Conclusion

L'histoire de l'utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux est encore relativement récente. Après une phase initiale d'intérêt, il y eut environ deux décennies de doutes et de déceptions. Au bout de ces deux décennies et grâce à l'obstination des scientifiques et des médecins, il s'avère que les thérapies innovantes fondées sur la manipulation du système immunitaire viennent modifier le pronostic de certaines pathologies tumorales. En effet, la mise au point de la technique d'obtention d'anticorps monoclonaux par Georges Kohler et Cesar Milstein en 1975 a représenté un grand pas en avant pour la biologie et la biologie clinique. Jusqu'à l'arrivée de la technique des anticorps monoclonaux, il était très difficile de produire, d'isoler et de purifier des anticorps tous réellement identiques. En thérapie, des mélanges d'anticorps, tels que les sérums antitétaniques, sont utilisés depuis longtemps. Le problème majeur de ces sérums est la difficulté à garantir une composition et donc une efficacité constante. De plus, ces substances provoquent parfois des réactions allergiques très graves.

Les anticorps monoclonaux ont mis un temps considérable à trouver leur place dans la thérapie. Ils ont rencontré de nombreux obstacles et n'ont suscité que peu d'intérêt lorsqu'ils ont commencé à être étudiés dans les années 70. De nombreux travaux d'ingénierie cellulaire ont été mis en place afin d'obtenir des anticorps de haute affinité dirigés contre des cibles spécifiques pertinentes. Les premiers anticorps monoclonaux étaient entièrement murins, difficilement utilisables en thérapie humaine. Des progrès significatifs ont été accomplis avec la mise au point d'anticorps chimériques, puis humanisés, et enfin totalement humains, d'action plus ciblée et aux effets indésirables beaucoup moins importants. Ce n'est qu'en 1986 que le premier anticorps monoclonal, l'orthoclone OKT3, obtient son autorisation de mise sur le marché dans le domaine thérapeutique de la transplantation. Désormais, la recherche a permis la mise sur le marché d'anticorps monoclonaux utilisés dans des domaines thérapeutiques aussi divers que les maladies inflammatoires avec le Remicade® et l'Humira®, la transplantation avec le Zenapax® et le Simulect®, l'onco-hématologie avec le Mabthéra®, le Mabcampath®, l'Herceptin® et l'Avastin®, la pneumologie avec le Synagis® et le Xolaire® et la cardiologie avec le Réopro®. Les anticorps monoclonaux apparaissent donc une nouvelle arme thérapeutique appelée à se développer dans le futur, associé à d'autres traitements. Cependant, chez certains patients, un échec thérapeutique peut être observé, en raison de l'apparition de phénomène de résistance à ces nouvelles thérapies. En raison du coût élevé de ces thérapies, il devient primordial d'étudier les marqueurs de réponse et/ou de résistance, afin de proposer aux patients le traitement optimal pour leur maladie.

## Bibliographie

ABOU MOURAD Y, TAHER A, SHAMSEDDINE A. Acute tumor lysis syndrome in large B-cell non-Hodgkin lymphoma induced by steroids and anti-CD20. *Hematol J* 2003; 4: 222-4

ADAMS CW, ALLISON DE, FLAGELLA K, PRESTA L *et al.* Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab. *Cancer Immunol Immunother* 2006 Jun; 55(6): 717-27

ASHKENAZI A and HERBST RS. To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *J Clin Inv*, 2008; 118 (6): 1979-90

BARANOVSKI AG, ERSHOVA NA, BRUNOVA VN *et al.* Catalytic heterogeneity of polyclonal DNA-hydrolyzing antibodies from the sera of patients with multiple sclerosis. *Immunol Lett* 2001; 76: 163-7

BARGMANN CI, HUNG MC, WEINBERG RA. The *neu* oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 1986; 319: 226-30

BASELGA J. The EGFR as a target for anticancer therapy – focus on cetuximab. *Eur J Cancer* 2001; 31: S16-S22

BASELGA J, TRIPATHY D, MENDELSON J, BAUGHMAN S, BENZ CC, *et al.* Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/*neu*-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 37-44

BASTIE JN, SUZAN F, GARCIA I, *et al.* Veno-occlusive disease after an anti-CD33 therapy (gemtuzumab ozogamicin). *Br J Haematol* 2002; 116: 924

BELLET D and DANGLES-MARIE V. Anticorps humanisés en thérapeutique. *Médecine Sciences* 2005; 21: 1054-62

BELLET D, DEBRAY C, BIDART JM. Utilisation des anticorps monoclonaux pour le traitement des cancers. *Immunologie des cancers* 2003 : 203-216

BELLET D, PECKING A, DANGLAS-MARIE V. Xenomouse : un tour de force pour l'obtention d'anticorps humain chez la souris. *Medecine Science* 2008; 24: 903-905

- BELLET D, CD-ROM : Les anticorps monoclonaux : nouvelles approches thérapeutiques, 2002
- BERGERS G, BENJAMIN LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 401-410
- BERINSTEIN NL, GRILLO-LOPEZ AJ, WHITE CA, BENCE-BRUCKLER I *et al*. Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 1998 Sep; 9(9): 995-1001
- BOKEMEYER C, BONDARENKO I, MALKHSON A, HARTMANN JT *et al*. Fluorpuracil, leucovorin and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27 (5): 663-71
- BONNER JA, HARARI PM, GIRALT J, *et al*. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2006 Feb 9; 354 (6): 567-78
- BOWEN AL, ZOMAS A, EMMETT E, MATUTES E, DYER MJS, CATOVSKY D, Subcutaneous Campath-1H in fludarabine-resistant/relapsed chronic lymphocytic and B-prolymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1997; 96: 617-9
- BUIST MR, KENEMANS P, DEN HOLLANDER W, *et al*., Kinetics and tissue distribution of the radiolabeled chimeric monoclonal antibody MOV18 IgG and F(ab')<sup>2</sup> fragments in ovarian carcinoma patients. *Cancer Res* 1993; 53: 5413-8
- BYRD JC, SHINN CA, JANSURE J, Campath-1H induces apoptosis in human chronic lymphocytic leukaemia cells (CLL) *in vitro* independent of complement mediated lysis or Fcγ receptor ligation. *Blood* 1999; 94 (suppl. 1): 126A
- CARTRON G, BLASCO H, PAINTAUD G, WATLER H, LE GUELLEC C. Pharmacokinetics of rituximab and its clinical use thought for the best use? *Crit Rev Oncol Hematol* 2007 Apr; 62 (1): 43-52
- CAZIN B, WETTERWALD M, OJEDA M, MAHE B, BAUTERS F. Campath-1H in the treatment of T-prolymphocytic leukemia (T-PLL). *Blood* 1999; 94(suppl.1): 125A
- CHAPMAN AP. PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. *Adv Drug Deliver Rev* 2002; 54: 531-45

CHESON BD. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2003; 101: 391-8

CHUSTECKA Z, ASCO 2009: Herceptin in Gastric Cancer – Practice Changing Data, June 3, 2009. Disponible sur le site:

<http://www.medscape.com/viewarticle/703845>

CLARK AS, WEST K, STREICHER S, DENNIS PA. Constitutive and inducible Akt activity promoters to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 707-17

COBLEIGH MA *et al.* Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2639-48

CONTI P, WHITE C, PIESTER P, MENENDEZ G *et al.*, Incidence of altered biodistribution detected by Indium 111 (111In) imaging prior to Yttrium 90 (90Y) ibritumomab tiuxetan (Zevalin®) radioimmunotherapy: results from a Zevalin imaging registry. *Blood* 2004; 104; abstract 4570

COUSSENS L, YANG-FENG TL, LIAO YC, CHEN E, GRAY A, McGRATH J, *et al.* Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with *neu* oncogene. *Science* 1985; 230: 1132-9

CUNNINGHAM D *et al.* Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337-345

DE JONG JS, VAN DIEST PJ, VAN DER VALK P, *et al.* Expression of growth factors, growth-inhibiting factors and their receptors in invasive breast cancer. II : correlations with proliferation and angiogenesis. *J Pathol.* 1998 Jan; 184(1): 53-7

DIERAS V, VINCENT-SALOMON A, DeGORGES A, BEUZEBOC P *et al.* Trastuzumab (Herceptin®) et cancer du sein: mécanismes de résistance. *Bull Cancer* 2007; 94 (3): 259-66

DIVGI CR, WELT S, KRIS M, *et al.* Phase I and imaging trial of indium 111-labelled anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 in patients with squamous cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 97-104

DOUILLARD JY, CHATAL JF, L'utilisation des anticorps ou de leurs fragments pour le traitement des tumeurs. *Bulletin du cancer*, Volume 85, Numéro 11, 951-9, Novembre 1998, Synthèses

DOWELL JA, KORTH-BRADLEY J, LIU H *et al.* Pharmacokinetics of gemtuzumab ozogamicin, an antibody targeted chemotherapy agent for the treatment of patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Pharmacol* 2001 Nov; 41 (11): 1206-14

DOWLATI A, GRAY R, JOHNSON DH, SCHILLER JH, BRAHMER A, SANDLER AB. Prospective correlative assesment of biomarkers in E4599 randomized phase II/III trial of carboplatin and paclitaxel +/- bevacizumab in advanced non-small cell lung cancer (NSLCC). *J Clin Oncol*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S, 2006: 7027

EHRILCH P. Collected studies on immunology, vol II. New York, John Wiley, 1906: 442-447

EMERY N, GERIN P. Comment cultiver les cellules animales, *Biofutur*, 1998; 184: 26-30

FOLKMAN J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6

FAGNANI F, COLIN X, ARVEUX P, COUDERT B, MISSET JL. Évaluation économique du trastuzumab en traitement adjuvant du cancer du sein précoce surexprimant HER2. *Bulletin du Cancer* Juillet-Août 2007 Volume 94, Numéro 7 : 711-20

GATZEMEIER U, ROSELL R, RAMLAU R, *et al.* Cetuximab (C225) in combination with cisplatin/vinorelbine vs cisplatin/vinorelbine alone in the first-line treatment of patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) positive advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; 22

GHETIE MA, BRIGHT H, VITETTA ES. Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin. *Blood* 2001; 97: 1392-8

GHETIE V, WARD ES. Multiple roles for the major histocompatibility complex class I- related receptor FcRn. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18:739-66

GIANTONIO BJ, CATALANO PJ, MEROPOL NJ, *et al.* Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol.* 2007 Apr 20; 25(12): 1539-44

GIUSTI RM, SHASTRI KA, COHEN MH, KEEGAN P, PAZDUR R. FDA drug approval summary: panitumumab (Vectibix). *Oncologist* 2007 May; 12(5): 577-83

GORDON MS, MATEI D, AGHAJANIAN C, MATULONIS UA *et al.* Clinical activity of pertuzumab (rhuMAb 2C4), a HER dimerization inhibitor, in advanced ovarian cancer: potential predictive relationship with tumor HER2 activation status. *J Clin Oncol* 2006 Sep 10; 24(26): 4324-32

GRILLO-LOPEZ AJ, WHITE CA, VARNIS C, *et al.* Overview of the clinical development of rituximab: first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. *Semin Oncol* 1999; 5 (suppl 14): 66-73

HALE G, XIA MQ, THIGE HP. The Campath antigen (CD52), *Tissue Antigens* 1990; 35: 1-10

HALE G, DYER MJS, CLARK M, PHILLIPS JM *et al.* Remission induction in non-Hodgkin lymphoma with reshaped human monoclonal antibody Campath-1H, *Lancet* 1988; 2: 1394-9

HANAHAN D, WEINBERG RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70

HERBST RS, DAVIES AM, NATALE RB, DANG TP, SCHILLER JH *et al.* Efficacy and safety of single-agent pertuzumab, a human epidermal receptor dimerization inhibitor, in patients with non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Oct 15; 13(20): 6175-81

HERBST RS *et al.* Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors : a new paradigm for cancer therapy. *Cancer.* 2002 Mar 1 ; 94(5) : 1593-611

HINGRAY J, Le Technoscope : la phage display, *Biofutur*, 1998 ; 183 : 2-10

HIRSCH FR, FRANKLIN WA, VEVE R, VARELLA-GARCIA M, BRUNN PA. HER-2/*neu* expression in lung tumors. *Semin Oncol* 2002; 29 (suppl. 4): 51-8

HORING SJ, YOUNES A, JAIN V, *et al.* Efficacy and Safety of Tositumomab (Bexxar) in B-cell lymphoma, progressive after rituximab. *J Clin Oncol* 2005; 23: 712-719

HURWITZ H, FEHRENBACHER L, NOVOTNY W, *et al.* Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2335-42

IGARASHI T, KOBAYASHI Y, OGURA M, *et al.* Factors affecting toxicity, response and progression-free survival in relapsed patients with indolent B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma treated with rituximab: a Japanese phase II study. *Ann Oncol* 2002; 13: 928-43

ISRAEL EJ, TAYLOR S, WU Z, *et al.* Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal cells. *Immunology* 1997; 92: 69-74

JAIN RK. Normalizing tumor vasculature with antiangiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* 2001; 7: 987-989

JARVINEN TAH, LIU ET. Effects of HER-2/*neu* on chemosensitivity of tumor cells. *Drug Resist Update* 2000; 3: 310-324

JOHN P, LEONARD JP, COLEMAN M, KETAS J *et al.* Combination therapy with epratizumab and rituximab in relapsed or refractory non Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5044-51

JOHNSON BE, JÄNNE PA. Rationale for a phase II trial of pertuzumab, a HER-2 dimerization inhibitor, in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006 Jul 15; 12 (14 Pt 2): 4436s-4440s

JONES PT, DEAR PH, FOOTE J *et al.* Replacing the complementarity determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 1986; 321: 522-5

JOST M, CLASS R, KARI C, *et al.* A central Role of Bcl-XL in the regulation of Keratinocyte Survival by Autocrine EGFR ligands. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 443-449

KAMINSKI MS, ZELENETZ AD, PRESS OW, SALEH M, LEONARD J, FEHRENBACHER L, *et al.* Pivotal study of iodine I131 tositumomab for chemotherapy-refractory low-grade or transformed low-grade B-cell non Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3918-28

KEATING M, FLINN I, JAIN V, BINET JL, HILLMEN, BYRD J *et al.* Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood* 2002; 99 (10): 3554-61

KELLY K, HANNA N, ROSENBERG A, BUNN PA, NEEDLE MN. A multi-centered phase I/II study of cetuximab in combination with paclitaxel and carboplatin in untreated patients with stage IV non-small cell lung cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; 22

KENNEY JS, GRAY F, ANCEL MH, DUNNE JF. Production of monoclonal antibodies using a secretion capture report web. *Biotechnology* (NY) 1995; 13(8): 787-90

KERBEL R, FOLKMANN J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 727-739

KIM ES, MAUER AM, TRAN HT, *et al.* A phase II study of cetuximab, an epidermal growth factor receptor (EGFR) blocking antibody, in combination with docetaxel in chemotherapy refractory/resistant patients with advanced non-small cell lung cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003, 22

KLAPPER LN, KIRSCHBAUM MH, SELA M, YARDEN Y. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res* 2000; 77: 25-79

KOBAYASHI N, SUZUKI Y, TSUGE T, OKUMURA K, RA C, TOMINO Y. FcRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282: F358-65

KOHLER G, MILSTEIN C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-197

KRAEBER-BODERE F, FAIVRE-CHAUVET A, FERRER L *et al.* Pharmacokinetics and dosimetry studies for optimization of anti-carcinoembryonic antigen x anti-hapten bispecific antibody-mediated pretargeting of iodine-131-labeled hapten in a phase I radioimmunotherapy trial. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3973s-81s

L'ALLEMAIN G. La famille des récepteurs HER-ErbB et ses ligands : mécanisme d'activation, signalisations et dérégulations dans le cancer. *Bull Cancer* 2003; 90 Spec No: S179-85

LANKELMA J, DEKKER H, FERNANDEZ LUQUE R, *et al.*, Doxorubicin gradients in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1703-7

LEVEQUE D, MONTEIRO MC, DETOUR J, BLONDET C, MALOISEL F, BERETZ L. La radio-immunothérapie des cancers. *J Pharm Clin* 2005; 24 (3): 139-44

LEWIS GD *et al.* Differential responses of human tumor cells lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunother* 1993; 37: 255-63



LIERSCH T, MELLER J, BITTRICH M, KULLE B *et al.* Update of carcinoembryonic antigen radioimmunotherapy with (131)I-lapetuzumab after salvage resection of colorectal liver metastases: comparison of outcome to a contemporaneous control group. *Ann Surg Oncol* 2007; 14 (9): 2577-90.

LIM SH, DAVEY G, MARCUS R. Differential response in a patient treated with Campath-1H monoclonal antibody for refractory non-Hodgkin lymphoma, *Lancet* 1993; 341: 432-3

LU Y, ZI X, ZHAO Y, MASCARENHAS D, POLLAK M. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1852-7

LUNDIN J, KIMBY E, BJORKHOLM M, BROLIDEN PA *et al.* Phase II trial of subcutaneous anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath-1H) as first-line treatment for patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CCL), *Blood* 2002; 100(3): 768-73

MA W and ADJEI A. Novel agents on the horizon for cancer therapy. *Cancer J Clin*, 2009; 59: 111-137

MALLITI M, JUNOT H, FIEVET MH, GABARRE J, TARIGHT N, VERNANT JP, THUILLIER A. Treatment of malignant non-Hodgkin's lymphoma. Economic impact of rituximab (Mabthera) versus conventional chemotherapy. *Ann Med Interne (Paris)* 2003 May; 154(3): 139-47

MARIEB EN, Anatomie et Physiologie Humaines, 1999, Ed DeBoeck University

MATSUMOTO T *et al.* Blockade of EGF-R signaling with anti-EGF-R monoclonal antibody (MAB) C225 inhibits matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression and invasion of human transitional cell carcinoma (TCC) in vitro and in vivo. *Pro Am Assoc Cancer Res* 1998; 39: 83 - Abstract 565

McKEAGE K, PERRY CM. Trastuzumab. *Drugs* 2002; 62: 209-43

MCLAUGHLIN P, GRILLO-LOPEZ AJ, LINK BK, *et al.* Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma : half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2825-33

McMAHON G. VEGF receptor signalling in tumor angiogenesis. *The Oncologist* 2000; 5 (suppl1): 3-10

MILANO G, MAGNE N. Conséquences pharmacologiques du ciblage du récepteur du facteur de croissance épidermique. *Bull Cancer* 2003; 90 Spec No: S197-201

MILLER RA, MALONEY DG, WARNKE R, LEVY R. Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N Engl J Med* 1982; 306: 517-522

MILLER RA, LEVY R. Response of cutaneous T cell lymphoma to therapy with hydroma monoclonal antibody. *Lancet* 1981; 2: 226-230

MONNIER L, MILANO G, PENAULT-LLORCA F, MERLIN JL. Ciblage des récepteurs tyrosine kinase membranaires : y a-t-il de la résistance dans l'HER2? *Bull Cancer* 2004; 91(9): 685-94

MORISSON SL, JOHNSON MJ, HERZENBERG LA, OI VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 6851-5

MOUQUET H, Immunologie fondamentale, INSERM U519

[www.assim.refer.org](http://www.assim.refer.org)

MOULD DR, SWEENEY KR. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies--mechanistic modeling applied to drug development. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2007 Jan; 10(1): 84-96

MUTHUKKARUPPAN V, AUERBACH R. Angiogenesis in mouse cornea. *Science* 1979; 205: 1416-8

NADLER LM, RITZ J, HARDY R, *et al.* A unique cell surface antigen identifying lymphoid malignancies of B cell origin. *J Clin Invest* 1981; 67: 134-140

NADLER LM, STASHENKO P, HARDY R *et al.* Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen. *Cancer Res* 1980, 40: 3147-3154

NAGATA Y, LAN KH, ZHOU X, TAN M, ESTEVA FJ, SAHIN AA *et al.* PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 2004; 6: 117-27

O-CHAROENRAT P, RHYS-EVANS P, COURT WJ, *et al.* Differential modulation of proliferation, matrix metalloproteinase expression and invasion of human head neck squamous carcinoma cells by c-erbB ligands. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17: 631-639

PAPADAKI T, STAMATOPOULOS K, STAVROYIANNI N, *et al.* Evidence for T-large granular lymphocyte-mediated neutropenia in rituximab-treated lymphoma patients: Report of two cases. *Leuk Res* 2002; 26: 597-600

PAUL S, VOLLE DJ, BEACH CM, JOHNSON DR, POWELL MJ, MASSEY RJ, Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody, *Science* 1989; 244: 1158

PAULETTI G *et al.* Assessment of methods for tissue-based detection of the HER2/*neu* alteration in human breast cancer : a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3651-64

PAWSON R, DYER MJS, BARGE R, THORNTON PD, EMMELT E, KLUIN-NELEMANS JC, Treatment of T-cell prolymphocytic leukaemia with human CD52 antibody, *J. Clin. Oncol* 1997; 15: 2667-72

PELEGRIN A, XAVIER F, BARBET J *et al.* Immunociblage des tumeurs : situation et perspectives en 2000. *Bulletin du cancer* 2000; vol 8, N°11 : 777-91

PENAULT-LLORCA F. Valeur pronostique du récepteur de croissance épidermique. *Bull Cancer* 2003; 90 Spec No: S192-7

PENAULT-LLORCA F. Récepteur du facteur de croissance épidermique : méthodes d'évaluation du statut et expression tumorale. *Bull Cancer* 2003; 90 Spec No: S186-91

PESTALOZZI BC, BRIGNOLI S. Trastuzumab in CSF. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2350-1

PICART-GEBHART MJ, PROCTER M, LEYLAND-JONES B *et al.* Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2 positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 1659-72

POLLACK SJ, JACOBS JW, SCHULTZ PG, Selective chemical catalysis by an antibody, *Science* 1986; 234: 1570

PRICE JT *et al.* Epidermal growth factor (EGF) increases the *in vitro* invasion, motility and adhesion interactions of the primary renal carcinoma cell line, A 704. *Eur J Cancer* 1996 Oct; 32A(11): 1977-82

RAVINDRANATH N, WION D, BRACHET P, *et al.* Epidermal Growth Factor Modulates the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in the Human Prostate. *J Androl* 2001; 22: 432-443

READING CL, Theory and methods for immunization in culture and monoclonal antibody production, *J. Immunol. Methods* 1982; 53: 261-291

REBELLO P, HALE G, Pharmacokinetics of CAMPATH-1H: assay development and validation, *J. Immunol Methods* 2002; 260: 285-302

RECKATY L, Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en pharmacie, U.E.R des Sciences Médicales et Pharmaceutiques d'Angers : anticorps monoclonaux en biologie : actualité et avenir, 1991; 111p

RIECHMANN L, CLARK M, WALDMANN H, WINTER G. Reshaping human antibodies for therapy, *Nature* 1988; 332: 323-7

ROBERT F, BLUMENSCHEN G, DICKE K, *et al.* Phase Ib/IIa study of anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody, cetuximab, in combination with gemcitabine/carboplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Proc Am Soc Oncol* 2003: 22

ROCHA-LIMA CM, SOARES HP, RAEZ LE, SINGAL R. EGFR targeting of solid tumors. *Cancer Control* 2007 Jul; 14(3): 295-304

SABBAGH I, Les hybridomes et les anticorps monoclonaux de rat, 1996. Disponible sur le site: <http://www.gazettelabo.fr/archives/recherche.php?kw=anticorps+monoclonaux+rat>

SAEZ-LLORENS X, CASTANO E, NULL D, *et al.* Safety and pharmacokinetics of a intramuscular humanized monoclonal antibody to respiratory syncytial virus in premature infants and infants with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17: 787-91

SALOMON DS, BRANDT R, CIARDIELLO F, *et al.* Epidermal Growth Factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1995; 19: 183-232

SANDLER AB, GRAY R, BHRAMER J *et al.* Randomized phase II/III trial of paclitaxel (P) plus carboplatin (C) with or without bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small cell lung cancer (NSCLC): An Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Trial – E45999. ASCO 2005, Abstract LBA4

SANDS H, JONES PL, SHAH SA, PALME D, VESSELLA RL, GALLAGHER BM, Correlation of vascular permeability and blood with monoclonal antibody uptake by human Clouser and renal cell xenografts, *Cancer Res* 1988; 48: 188-93

SHABAT D, LODE HN, PERTL U, REISFELD RA, RADER C, LERNER RA, BARBAS CF, *In vivo* activity in a catalytic antibody-prodrug system: antibody catalyzed etoposide prodrug activation for selective chemotherapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 7528

SCOTTE F *et al.* Réussir l'internat, Cancérologie, 2002, Ed Ellipses

SIEVERS EL, LARSON RA, STADTMAUER EA, *et al.* Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3244-54

SHEPARD HM, LEWIS GD, SARUP JC, FENDLY BM, MANEVAL D, MORDENTI J, *et al.* Monoclonal antibody therapy of human cancer: taking the HER2 protooncogene to the clinic. *Clin Immunol* 1991; 11: 117-27

SHUSTER AM, GOLOBOV GV, KVASHUK OA, BOGOMOLOVA AE, SMIRNOV IV, GABIBOV AG, DNA hydrolyzing autoantibodies, *Science* 1992; 256: 665

SLAMON DJ, LEYLAND-JONES B, SHAK S, FUCHS H, PATON V, BAJAMONDE A, *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344: 783-92

SLAMON DJ *et al.* Studies of the HER2/*neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-12

SLAMON DJ *et al.* Human breast cancer : correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/*neu* oncogene. *Science* 1987; 235: 177-82

SLEDGE G. First-line treatment with bevacizumab and paclitaxel prolongs progression-free survival in metastatic breast cancer. *Clinical Breast Cancer* 2005; Vol. 6, No. 2 : 105-107

SLIMANE K *et al.* Panorama des inhibiteurs du récepteur du facteur de croissance épidermique (à l'exclusion du ZD 1839 et du C225). *Bull Cancer* 2003; 90 Spec No: S213-19

SPIRIDON CI, GHETIE MA, UHR J, *et al.* Targeting multiples Her-2 epitopes with monoclonal antibodies results in improved antigrowth activity of a human breast cancer cell line *in vitro* and *in vivo*. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1720-30

TANG SC, HEWITT K, REIS MD, BERINSTEIN NL. Immunosuppressive toxicity of Campath-1H monoclonal antibody in the treatment of patients with recurrent low-grade lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1996; 24: 93-101

TANNOCK IF, LEE CM, TUNGGAL JK, COWAN DSM, EGORIN MJ. Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 878-84

TEILAUD JL. Anticorps monoclonaux : la nouvelle vague, *Biofutur*, 2000; 197: 10

TEKOA H, KO K, KOPROWSKI H, HARVEY DJ *et al.* Controlled glycosylation of therapeutic antibodies in plants. *Arch Biochem Biophys* 2004; 426 (2): 266-78

TERNANT D, OHRESSER M, THOMAS C, CARTRON G, WATIER H, PAINAUD G. Dose-response relationship and pharmacogenetics of anti-RhD monoclonal antibodies. *Blood* 2005 Aug 15; 106(4): 1503-4

THRUSH GR, LARK LR, CLINCHY BC, VITETTA ES. Immunotoxins: an update. *Ann Rev Immunol* 1996; 14: 49-71

TUNGGAL JK, COWAN DSM, SHAIKH H, TANNOCK IF. Penetration of anticancer drugs through solid tissue: a factor that limits the effectiveness of chemotherapy for solid tumors. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1583-6

TRAMONTANO A, JANDA KD, LERNER RA, Catalytic antibodies. *Science* 1986; 234: 1566

TREUMANN A, LIFELY MR, SCHNEIDER P, FERGUSON MAJ. Primary structure of CD52. *J Biol Chem* 1995; 270: 6088-99

VAN CUTSEM E, KOHNE CH, HITRE E, ZALUSKI J *et al.* Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl Med* 2009; 360 (14): 1408-17

VAN CUTSEM E, PEETERS M, SIENA S, HUMBLET Y, HENDLISZ A *et al.* Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007 May 1; 25(13): 1658-64

VERHEIZEN RH, MASSUGER LF, BENIGNO BB, EOPENETOS AA, LOPES A *et al.* Phase III trial of intraperitoneal therapy with yttrium 90-labeled HMFG1 murine monoclonal antibody in patients with epithelial ovarian cancer after surgically defined complete response. *J Clin Oncol* 2006; 24 (4): 571-8

VERMORKEN JB, TRIGO J, HITT R *et al.* Open-label, uncontrolled, multicenter phase III study to evaluate the efficacy and toxicity of cetuximab as a single agent in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck who failed to respond to platinum-based therapy. *J Clin Oncol* 2007 Jun 1; 25 (16): 2171-7

VOOG E, MORSCHHAUSER F, SOLAL-CELIGNY P. Neutropenia in patients treated with rituximab. *N Engl J Med* 2003; 348: 2691-4

VUKELJA S, RUGO H, VOGEL C, BORSON R, TAN-CHIU E *et al.* A phase II study of trastuzumab-DM1, a first-in-class HER2 antibody-drug conjugate, in patients with HER2+ metastatic breast cancer. Abstract 33. San Antonio 2008

WEBER DA, ECKMAN KF, DILLMAN LT, RYMAN JC IN MIRD : Radionuclide data and decay schemes. *New York Society of nuclear Medecine Inc* 1989: 229

WEIDNER M et FURELAUD G. La transgénèse grâce à *Agrobacterium tumefaciens*. Disponible sur le site :

<http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/transgenese/agrobacterium/agro.htm>

WINKLER U, JENSEN M, MANZKE O, *et al.* Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8). *Blood* 1999; 94: 2217-24

WITZIG TE, FLINN IW, GORDON LI, EMMANOULIDES C, CZUCZMAN MS *et al.* Treatment with ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy in patients with rituximab-refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2002 Aug 1; 20(15): 3262-9

WITZIG TE, GORDON LI, CABANILLAS F, *et al.* Randomized controlled trial of Y-90 labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy *versus* rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell-non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2453-63

WOLFF EA, SCHREIBER GJ, COSAND WL, RAFF HV. Monoclonal antibody homodimers: enhanced antitumor activity in nude mice. *Cancer Res* 1993; 53: 2560-5

WOODBURN JR. The Epidermal Growth Factor Receptor and its Inhibition in Cancer Therapy. *Pharmacol Ther* 1999; 82: 241-250

WRIGHT PW, HELLSTROM KE, HELLSTROM E, BERNSTEIN ID. Serotherapy of malignant disease. *Med Clin North Am* 1976; 60: 607-622

YOKOTA T, MILENIC DE, WHITLOW M, SCHLOM J, Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res* 1992; 52: 3402-8

BEXXAR® prescribing information, GlaxoSmithKline, Octobre 2009. Disponible sur le site :  
[http://us.gsk.com/products/assets/us\\_bexxar.pdf](http://us.gsk.com/products/assets/us_bexxar.pdf)

MABCAMPATH® prescribing information, Bayer, Mars 2009. Disponible sur le site :  
[http://berlex.bayerhealthcare.com/html/products/pi/Campath\\_PI.pdf](http://berlex.bayerhealthcare.com/html/products/pi/Campath_PI.pdf)

MYLOTARG® prescribing information, Wyeth, Septembre 2008. Disponible sur le site:  
<http://www.wyeth.com/content/showlabeling.asp?id=119>

Résumé des Caractéristiques du Produit AVASTIN®, Laboratoire Roche, Date de première autorisation : 12 juin 2005



Résumé des Caractéristiques du Produit ERBITUX®, Laboratoire Merck, Date de première autorisation : 29 juin 2004

Résumé des Caractéristiques du Produit HERCEPTIN®, Laboratoire Roche, Date de première autorisation/ de renouvellement de l'autorisation : 28 août 2000/ 28 août 2005

RITUXAN® prescribing information, Genentech, Septembre 2009. Disponible sur le site :  
<http://www.gene.com/gene/products/information/pdf/rituxan-prescribing.pdf>

VECTIBIX® prescribing information, Amgen, 2007. Disponible sur le site :  
[http://www.vectibix.com/prescribing\\_information/prescribing\\_information.html](http://www.vectibix.com/prescribing_information/prescribing_information.html)

ZEVALIN® prescribing information, Spectrum Pharmaceuticals, 2009. Disponible sur le site :  
[http://www.zevalin.com/pdf/Zevalin\\_PI\\_website.pdf](http://www.zevalin.com/pdf/Zevalin_PI_website.pdf)

Sites internet :

[www.geniobio.ac-aix-marseille.fr/immuno/docs/Acmbn.ppt](http://www.geniobio.ac-aix-marseille.fr/immuno/docs/Acmbn.ppt)

[www.ccac.ca/fr/CCAC\\_Programs/Guidelines\\_Policies/GDLINES/Antibody/antibody.pdf](http://www.ccac.ca/fr/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GDLINES/Antibody/antibody.pdf)

[http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/ecb/antibody\\_molecule.html](http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/ecb/antibody_molecule.html)

<http://www.gazettelabo.fr>

<http://www.leem.org>

<http://www.emea.europa.eu>

**UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2009-2010**

**DOYEN**

Chantal FINANCE

**Vice-Doyen**

Francine PAULUS

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Pierre LABRUDE

**Responsable de la Commission de la Recherche**

Jean-Claude BLOCK

**Mobilité ERASMUS et Communication**

Francine KEDZIEREWICZ

**Responsable Hygiène Sécurité**

Laurent DIEZ

**Responsable de la filière Officine :** Francine PAULUS

**Responsables de la filière Industrie :** Isabelle LARTAUD,  
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement :** Jean-Michel SIMON  
**Pharmaceutique Hospitalier**

**DOYEN HONORAIRE**

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES**

**HONORAIRES**

Gérald CATAU

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

**ASSISTANT HONORAIRE**

Marie-Catherine BERTHE

## **ENSEIGNANTS**

### **PROFESSEURS**

Gilles AULAGNER .....	Pharmacie clinique
Alain BAGREL.....	Biochimie
Jean-Claude BLOCK .....	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON .....	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE .....	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL .....	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Christophe GANTZER .....	Microbiologie environnementale
Max HENRY .....	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU.....	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE.....	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD .....	Pharmacologie cardiovasculaire
Dominique LAURAIN-MATTAR .....	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER .....	Biochimie
Pierre LEROY .....	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT .....	Pharmacie galénique
Alain MARSURA .....	Chimie thérapeutique
Patrick MENU .....	Physiologie
Jean-Louis MERLIN .....	Biologie cellulaire oncologique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS .....	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN .....	Biochimie, Biologie moléculaire
Jean-Michel SIMON .....	Economie de la santé, législation pharmaceutique

### **MAITRES DE CONFÉRENCES**

Monique ALBERT .....	Bactériologie, Virologie
Sandrine BANAS .....	Parasitologie
Mariette BEAUD .....	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT .....	Communication et santé
Isabelle BERTRAND .....	Microbiologie environnementale
Michel BOISBRUN .....	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX .....	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER.....	Chimie Physique
Cédric BOURA .....	Physiologie
Jean-Claude CHEVIN .....	Chimie générale et minérale
Igor CLAROT .....	Chimie analytique
Jocelyne COLLOMB .....	Parasitologie, Mycologie
Joël COULON .....	Biochimie
Sébastien DADE .....	Bio-informatique
Dominique DECOLIN .....	Chimie analytique
Béatrice DEMORE .....	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU .....	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Florence DUMARCAY.....	Chimie thérapeutique
François DUPUIS.....	Pharmacologie
Raphaël DUVAL .....	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE .....	Hématologie
Adel FAIZ .....	Biophysique-accoustique
Luc FERRARI .....	Toxicologie
Stéphane GIBAUD .....	Pharmacie clinique

Thierry HUMBERT .....	Chimie organique
Frédéric JORAND .....	Santé et environnement
Olivier JOUBERT .....	Toxicologie, sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ .....	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT .....	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI .....	Hématologie biologique
Christophe MERLIN .....	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU .....	Pharmacognosie
Maxime MOURER .....	Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUS .....	Informatique
Christine PERDICAKIS .....	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO .....	Pharmacologie
Virginie PICHON .....	Biophysique
Anne SAPIN .....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER .....	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY .....	Santé publique
Gabriel TROCKLE .....	Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER.....	Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIYOU .....	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI .....	Pharmacie galénique

#### **PROFESSEUR ASSOCIE**

Anne MAHEUT-BOSSER ..... Sémiologie

#### **PROFESSEUR AGREGE**

Christophe COCHAUD ..... Anglais

#### **ASSISTANT**

Annie PAVIS ..... Bactériologie

#### **Bibliothèque Universitaire Santé - Lionnois (Pharmacie - Odontologie)**

Anne-Pascale PARRET..... Directeur

## DEMANDE D'IMPRIMATUR / 3396

Date de soutenance : 23 Octobre 2009

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR  
EN PHARMACIEprésenté par **Aline SCHINDELE**Sujet :**Les Anticorps Monoclonaux, de la Production à  
l'utilisation en Oncologie**Jury :

Président : Mme Chantal FINANCE, Professeur

Juges : M. Jean-Louis MERLIN, Professeur  
Mme Karen AFENJAR, Senior Study ManagerVu, **29 SEP. 2009**

Nancy, le

Le Président du Jury

Le Directeur de Thèse

  
**Mme Chantal FINANCE,**  
 Professeur

**Mme Chantal FINANCE,**  
 Professeur

Vu et approuvé,

Nancy, le **29 SEP. 2009**Doyen de la Faculté de Pharmacie  
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1
  
**Chantal FINANCE**  


Vu,

Nancy, le **2.10.09**

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

 Pour le Président  
 et par Délégation,  
 La Vice-Présidente du Conseil  
 des Etudes et de la Vie Universitaire,

 Jean-Pierre FINANCE  
**C. CAPDEVILLE-ATKINSON**


N° d'enregistrement :

N° d'identification :

**TITRE**

**Les Anticorps Monoclonaux, de la Production à l'utilisation en Oncologie**

Thèse soutenue le 23 Octobre 2009

Par Aline SCHINDELE

**RESUME :**

Avec la découverte de la technologie des hybridomes en 1975 par G Kohler et C Milstein, une génération d'anticorps spécifique d'un antigène donné est apparue : les anticorps monoclonaux. Cette technologie consiste à fusionner une cellule de souris productrice d'un anticorps monoclonal avec une lignée de cellules humaines « immortelles », ayant la particularité de se diviser indéfiniment. Tout d'abord chimériques, avec 30% de protéines d'origine murine, puis humanisés, avec 5 à 10% de séquences murines, ces anticorps ont progressivement réduit les risques d'immunogénicité. Le développement de l'ingénierie des anticorps a rendu possible l'obtention d'anticorps entièrement humains (par la technique du *phage display* ou des souris transgéniques). Les anticorps peuvent être utilisés à l'état « nu » ou servir de véhicule afin de transporter un agent toxique (toxine, radioisotope, drogues anti-cancéreuses) au site tumoral. Plusieurs domaines thérapeutiques ont bénéficié de l'avènement de ces anticorps, dont l'onco-hématologie, du fait de la possibilité de cibler les cellules tumorales en épargnant les cellules normales. Dans le traitement des tumeurs solides, les cibles potentielles sont des récepteurs surexprimés à la surface des cellules tumorales (récepteurs à tyrosine kinase, impliqués dans l'apoptose), des ligands (VEGF, ligand de l'angiogenèse). Dans le traitement d'hémopathies malignes, les cibles potentielles sont des molécules de surface des cellules tumorales, tels que l'antigène CD20, CD52. Le traitement par les anticorps monoclonaux présente des résultats cliniques très concluants. Cependant, certains patients sont en échec thérapeutique en raison de l'apparition de phénomène de résistance. En raison du coût élevé de ces thérapies, il devient primordial d'étudier les marqueurs de réponse et/ou de résistance, afin de proposer aux patients le traitement optimal pour leur maladie.

**MOTS CLES :** anticorps monoclonaux, oncologie, récepteur à tyrosine kinase, angiogenèse, hémopathies malignes

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Mme Prof. Chantal FINANCE	Virologie, Immunologie	<b>Bibliographique</b>

**Thèmes**

1 – Sciences fondamentales

**3 – Médicament**

5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement

4 – Alimentation – Nutrition

6 – Pratique professionnelle