

Les anticorps anti-PIGF

Un nouvel outil thérapeutique anti-angiogénique ?

Ariane Galaup, Stéphane Germain

> Un effet thérapeutique des molécules anti-angiogéniques, qui ciblent principalement le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et se présentent sous la forme d'anticorps bloquants (bevacizumab/Avastin[®], Genentech/Roche) ou d'inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase des récepteurs (VEGF-R1), a été démontré récemment. En effet, associés à une chimiothérapie, ils améliorent la survie globale des patients atteints de formes métastatiques de cancers colorectaux et de cancers du poumon. Cependant, leur efficacité est encore insuffisante, les effets secondaires sont multiples et ces traitements ne sont pas efficaces sur tous les types de cancers [1, 2]. Par conséquent bloquer plus efficacement et plus spécifiquement l'angiogenèse tumorale, la croissance tumorale et le processus métastatique, répond à un besoin médical évident.

Dans ce contexte, l'équipe de Peter Carmeliet (Université de Louvain, Belgique) vient de publier des résultats prometteurs [3] en bloquant le *placental growth factor* (PIGF) qui régule spécifiquement l'angiogenèse pathologique sans affecter l'angiogenèse physiologique [4]. En effet, le PIGF n'est pas exprimé dans les tissus normaux, et les souris dont le gène codant le PIGF est invalidé sont viables et fertiles [5] ; il ne joue donc aucun rôle, ou son rôle est redondant avec celui d'autres facteurs de croissance, dans l'homéostasie et le développement du système vasculaire.

En revanche, le PIGF est exprimé spécifiquement dans les tumeurs, il participe à l'induction de l'angiogenèse pathologique et son taux plasmatique est corrélé

au stade clinique, à la récurrence de la maladie, à la présence de métastases et à la survie globale. De plus, les niveaux de PIGF augmentent après traitement par les VEGF-R1 et radio-immunothérapie [6, 7]. Le PIGF se lie d'une part au récepteur de type I du VEGF (VEGF-R1) exprimé par les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules tumorales et les progéniteurs de la moelle osseuse, d'autre part à la neuropiline 1 (NRP1) [8]. De plus, il potentialise la signalisation du VEGF-A par *trans*-phosphorylation du VEGF-R2 par le récepteur VEGF-R1 (Figure 1).

Intérêt du *placental growth factor*

PIGF, angiogenèse et tumorigenèse

L'équipe de Peter Carmeliet a donc développé un anticorps bloquant le PIGF (α -PIGF) avec une forte affinité (Kd 0,7 pM). Celui-ci inhibe la liaison du PIGF au VEGF-R1 (IC50 27 pM) et à la NRP1 sans affecter la liaison du VEGF-A à ses récepteurs. L'efficacité de cet anticorps α -PIGF a été testée dans des modèles de greffes hétérotopiques ou orthotopiques de mélanomes, carcinomes pulmonaires et pancréatiques, ainsi que de lymphomes. Utilisé seul, il inhibe l'angiogenèse tumorale, la croissance tumorale et le processus métastatique. Il augmente aussi l'efficacité de la chimiothérapie (cyclophosphamide et gemcitabine). Son effet anti-angiogénique passe par une induction de l'apoptose des cellules endothéliales et un élagage vasculaire des vaisseaux pré-existants. De plus, il rend les anticorps anti-VEGF-A actifs dans des modèles de tumeurs originellement résistants à ces molécules.

A. Galaup : IFOM-IEO, Laboratoire « New strategies to inhibit tumor angiogenesis », IFOM-IEO Campus, Via Adamello, 16 20139 Milan, Italie.
S. Germain : Collège de France, Chaire de Médecine Expérimentale, Paris, France.
Inserm U833, Paris, France.
Service d'Hématologie Biologique A, AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France.
ariane.galaup@college-de-france.fr

Quels sont les mécanismes conférant à cet anticorps α -PIGF un avantage sur l'inhibition de la voie VEGF ? Un des inconvénients majeurs des thérapies anti-angiogéniques est l'activation d'un programme angiogénique compensatoire. Tous les mécanismes d'induction n'en sont pas connus, mais on a démontré le rôle de l'hypoxie intratumorale, et l'expression de nombreux gènes codant des protéines dont les propriétés pro-angiogéniques sont fortes est induite dans les tumeurs traitées par des inhibiteurs du VEGF (SDF1/CCL12, FGF1, FGF2, VEGF-A, PIGF, MMP9 et CXCL1). Or, Fischer *et al.* montrent que les anticorps α -PIGF minimisent ces conséquences délétères : l'hypoxie tumorale et la réaction pro-angiogénique qu'ils induisent sont moindres que lors de traitements anti-VEGFR, réduisant ainsi le développement de résistances.

PIGF et inflammation

Le PIGF lie le VEGF-R1. Or celui-ci est impliqué dans la régulation de plusieurs processus : (1) l'infiltration leucocytaire, (2) la croissance tumorale, (3) la migration des cellules stromales et (4) la revascularisation des tissus ischémiques [4, 8]. En se liant au VEGF-R1 présent à la surface des macrophages (qui n'expriment pas ou peu le VEGF-R2), le PIGF module l'infiltration macrophagique intra-tumorale. Ces macrophages ayant de fortes propriétés pro-angiogéniques (macrophages dits angiocompétents), ils constituent une cible cellulaire de premier intérêt. L'anticorps anti-PIGF inhibe cette infiltration macrophagique (diminution de 74 % par rapport à l'infiltration macrophagique des tumeurs



témoins). Cette étude montre clairement que la résistance de certaines tumeurs au traitement anti-VEGF-R2 (dans les tumeurs murines colorectale CT26 et pancréatique panc02) est due au fait que l'inhibition du VEGF-R2 seul ne prévient pas l'infiltrat inflammatoire pro-angiogénique.

PIGF et lymphangiogenèse

Enfin, comme cela a déjà été observé en inhibant le VEGF, l'anticorps α -PIGF inhibe les métastases lymphatiques et la lymphangiogenèse en induisant une baisse du taux de VEGF-C intra-tumoral (le VEGF-C est un puissant inducteur de la lymphangiogenèse) [9]. Cependant, ce mécanisme est probablement indirect parce que les cellules endothéliales lymphatiques n'expriment pas le VEGF-R1. On peut donc faire l'hypothèse que cet anticorps module la lymphangiogenèse via l'inhibition de l'infiltration des macrophages responsables de l'induction de la lymphangiogenèse (macrophages lymphangiocompétents).

L'activité anti-tumorale importante observée dans l'étude de P. Carmeliet chez la souris ne s'accompagne pas d'effets secondaires (parmi ceux qui ont été recherchés, gestation, vascularisation trachéale et risque de thrombose). Ces données sont donc très prometteuses, mais trois questions devront être explorées : (1) le blocage du PIGF a-t-il la même efficacité sur des tumeurs dont le développement n'est pas uniquement (ou pas essentiellement) dépendant de la signalisation VEGF-R1 ? ; (2) cet anticorps agit-il également de façon directe sur les cellules tumorales ? Enfin, (3) quel est le mécanisme par lequel l'anticorps α -PIGF inhibe le développement des métastases, car celui-ci reste encore inconnu.

Les autres molécules anti-angiogéniques en développement

La compréhension des mécanismes régulant la néo-angiogenèse tumorale a conduit à l'identification de nouvelles cibles et au développement de nombreuses molécules dans le traitement des cancers. Ces nouvelles molécules peuvent être classées selon leur mécanisme d'action de la manière suivante (Figure 2) : (1) action inhibitrice directe sur les cellules endothéliales (classe principalement constituée de facteurs endogènes anti-angiogéniques) ; (2) action sur les facteurs de croissance impliqués dans l'an-

giogenèse et leurs récepteurs ; (3) action ciblant les protéines responsables de l'invasion des tissus par les vaisseaux néoformés ; (4) action mixte sur les cellules tumorales et endothéliales.

Les peptides dérivés des protéines naturelles anti-angiogéniques

Ils ont suscité l'intérêt depuis 1994, mais seule l'endostatine a été évaluée dans des essais cliniques de phase II. Les résultats obtenus chez des patients présentant des tumeurs neuroendocrines avancées restent néanmoins modestes [10].

La classe des molécules ciblant les facteurs de croissance pro-angiogéniques et leurs récepteurs (inhibiteurs multi-kinases)

Ce groupe est très vaste et les molécules qui le constituent les plus avancées en terme de développement et d'utilisation clinique.

Parmi les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de ces récepteurs, le sorafenib (NEXAVAR®, Bayer pharma) évalué dans des essais de phase II, a montré des bénéfices cliniques chez des patients atteints d'une tumeur rénale avancée [11]. Le sunitinib (SUTENT®, Pfizer) est indiqué dans le traitement des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) malignes non résecables et/ou métastatiques, après échec d'un traitement par le mésylate d'imatinib¹ dû à une résistance ou à une intolérance, et dans le traitement des cancers du rein avancés et/ou métastatiques après échec d'un traitement à base d'interféron alpha ou d'IL-2. Les résultats obtenus dans d'autres types de tumeurs (neuroendocrine, sein et poumon non à petites cellules) sont très

¹ La mésylate d'imatinib, ou Glivec®, se fixe dans la poche ATP de la protéine de fusion bcr-abl des leucémies myéloïdes chroniques, et inhibe aussi la transmission du signal des récepteurs c-kit ou PDGF-R mutés dans les GIST.

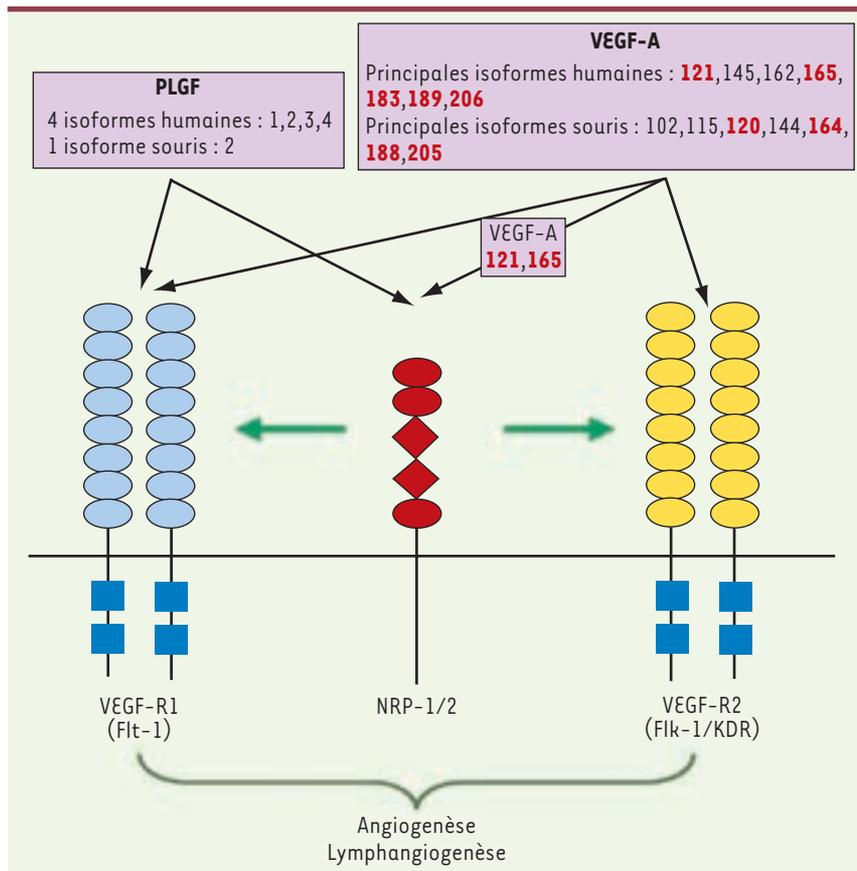


Figure 1. Voie de signalisation du PIGF et du VEGF-A. Les isoformes du VEGF-A indiqués en rouge sont issus d'un épissage alternatif, les autres sont obtenues après clivage protéasique.



prometteurs [12]. La stratégie consistant à capturer le VEGF circulant ou tissulaire et à l'inactiver (VEGF trap, Regeneron Pharmaceuticals/Sanofi-Aventis) est actuellement évaluée en monothérapie dans un essai de phase II chez des patientes présentant un cancer avancé de l'ovaire et serait efficace (résultats préliminaires). Enfin, plusieurs essais cliniques sont en cours afin d'élargir les indications d'utilisation du bevacizumab au traitement d'autres types de tumeurs (formes métastatiques de tumeurs rénale, ovarienne, prostatique et glioblastome). Cependant, il a récemment été rapporté qu'il n'augmente pas la survie des patients atteints d'un cancer avancé du pancréas (2007 *Gastrointestinal cancers symposium*) et la FDA a choisi de ne pas le valider dans le traitement des cancers mammaires avancés (décembre 2007). Enfin, cet anticorps a également montré son efficacité, sans toxicité associée, dans le traitement des maladies oculaires prolifératives (principalement la dégénérescence maculaire liée à l'âge [13]). Genentech a, de plus, développé une molécule bloquant le VEGF des-

tinée spécifiquement à des applications en ophtalmologie, le ranibizumab (Lucentis®) (le coût est de > \$1 500 par injection contre < \$100 pour l'Avastin®). Un essai clinique de phase III comparant l'efficacité de ces deux molécules dans la dégénérescence maculaire est en cours et ses conclusions seront publiées début 2009

(www.esccs.org/PUBLICATIONS/EUROTIMES/07jan/USTofund.pdf).

Inhibiteurs de métalloprotéases matricielles (MMP)

Les essais de phase III utilisant ces molécules n'ont pas montré de bénéfice thérapeutique, en raison probablement d'un phénomène compensatoire faisant intervenir d'autres MMP [14-16].

Agents cytotoxiques conventionnels

Enfin, l'utilisation métronomique des chimiothérapies, c'est-à-dire à faible dose et de manière prolongée, a montré son efficacité clinique, notamment sur le traitement de formes métastatiques du cancer du sein [17].

Conclusion

En conclusion, après plusieurs désillusions, les molécules anti-angiogéniques suscitent à nouveau un intérêt, notamment depuis le développement du bevacizumab ou des inhibiteurs multi-kinases (Figure 2). Le développement clinique de nouveaux agents anti-angiogéniques efficaces et induisant moins de résistances et d'effets secondaires, associé à la mise en place d'outils et de critères d'évaluation spécifiques, constituent les prochains défis pour améliorer les traitements du cancer et des pathologies oculaires. À ce titre, l'annonce récente (18 janvier 2008) d'un essai de phase I, au Danemark, destiné à évaluer la tolérance et la sécurité de l'injection intra-veineuse d'un anticorps humanisé α -PIGF (TB-403, ThromboGenics NV) entretient l'espoir de réelles perspectives [18]. ♦

Blocking PIGF, a future in anti-angiogenic therapy?

RÉFÉRENCES

1. Verheul HM, Pinedo HM. Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition. *Nat Rev Cancer* 2007 ; 7 : 475-85.
2. Azizi M, Chedid A, Oudard S. Home blood-pressure monitoring in patients receiving sunitinib. *N Engl J Med* 2008 ; 358 : 95-7.
3. Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, et al. Anti-PIGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* 2007 ; 131 : 463-75.
4. Luttun, A, Tjwa M, Moons L, et al. 2002. Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002 ; 8 : 831-40.
5. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001 ; 7 : 575-83.
6. Willett CG, Boucher Y, Duda DG, et al. Surrogate markers for antiangiogenic therapy and dose-limiting toxicities for bevacizumab with radiation and chemotherapy: continued experience of a phase I trial in rectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 8136-9.
7. Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006 ; 24 : 16-24.
8. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, et al. Role of PIGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003 ; 9 : 936-43.
9. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005 ; 65 : 550-63.
10. Kulke MH. Neuroendocrine tumours: clinical presentation and management of localized disease. *Cancer Treat Rev* 2003 ; 29 : 363-70.
11. Ratain MJ. Phase II oncology trials: let's be positive. *Clin Cancer Res* 2005 ; 11 : 5661-2.
12. Faivre S, Demetri G, Sargent W, Raymond E. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat Rev Drug Discov* 2007 ; 6 : 734-45.

Utilisation des inhibiteurs naturels de l'angiogénèse

- **Fragments protéolytiques du plasminogène** : angiostatine, K1-5
- **Fragment protéolytique du collagène XVIII** : endostatine [10]
- **Fragment protéolytique du collagène IV** : canstatine
- **Thrombospondine-1**

Blocage des facteurs activant l'angiogénèse

- **Facteurs potentiellement ciblés**
VEGF, FGF, PDGF, angiopoïétine-1, angiopoïétine-2, éphrines, EGF...
- **Utilisation d'anticorps monoclonaux**
- anti-VEGF = bevacizumab, ranibizumab [1]
- anti-VEGFR2 = DC101
- **Utilisation d'inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase des récepteurs**
Sunitinib [12], sorafenib [11], vatalanib, ZD6474, Angiozyme, AMG706
- **Stratégie de capture des facteurs angiogéniques circulants**
VEGF-trap

Utilisation de molécules bloquant l'invasion des tissus

- **Inhibiteurs des métalloprotéase matricielles**
Marimastat, prinomastat, Bay 12-9566 [12, 15]
- **Anticorps ciblant les intégrines**
Vitaxine, EMD 121974

Figure 2. Mécanismes d'action des molécules ciblant la néo-angiogénèse tumorale.

13. Behar-Cohen F, Sennlaub F, Berdugo M. Espoirs thérapeutiques dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 127-9.
14. Bramhall SR, Schulz J, Nemunaitis J, et al. A double-blind placebo-controlled, randomised study comparing gemcitabine and marimastat with gemcitabine and placebo as first line therapy in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2002 ; 87 : 161-7.
15. Leigh NB, Paz-Ares L, Douillard JJ, et al. Randomized phase III study of matrix metalloproteinase inhibitor

BMS-275291 in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer : National Cancer Institute of Canada-Clinical Trials Group Study BR.18. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 2831-9.

16. Shepherd FA, Giaccone G, Seymour L, et al. Prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of marimastat after response to first-line chemotherapy in patients with small-cell lung cancer : a trial of the National Cancer Institute of Canada-Clinical Trials Group and the European

Organization for Research and Treatment of Cancer. *J Clin Oncol* 2002 ; 20 : 4434-9.

17. Orlando L, Cardillo A, Rocca A, et al. Prolonged clinical benefit with metronomic chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. *Anticancer Drugs* 2006 ; 17 : 961-7.
18. Blay JJ. Le futur des thérapeutiques ciblées en oncologie, trouver les cibles, traiter tôt et au long cours. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 23 : 1073-4.

NOUVELLE

Le signal *eat-me* des exosomes de réticulocytes

Lionel Blanc, Michel Vidal

UMR 5235, Université Montpellier II cc 107, place E. Bataillon, 34095 Montpellier, France.
mvidal@univ-montp2.fr
lblanc@univ-montp2.fr

Sécrétion exosomale lors de la maturation du réticulocyte en globule rouge

Les exosomes sont de petites vésicules membranaires (environ 50 nm) libérées par des cellules lors de la fusion d'endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique [1]. On pourrait oser faire un parallèle, du point de vue fonctionnel, entre apoptose et sécrétion exosomale dans le réticulocyte. L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée qui permet la maintenance de l'homéostasie tissulaire chez l'organisme adulte ; elle permet également de façonner les organes et d'éliminer des structures vestigiales lors de l'embryogenèse [2]. Dans le réticulocyte, la libération d'exosomes contribue également à façonner, non pas un organe, mais le globule rouge dans sa phase de différenciation terminale. La perte de membrane entre le stade réticulocyte et le globule rouge mature représente 10 à 15 % de la surface cellulaire [3]. Cette perte de membrane se produit principalement par la sécrétion d'exosomes. De plus, l'aspect quantitatif de ce processus est doublé d'une caractéristique qualitative. La libération d'exosomes permet, en effet, l'élimination de certaines protéines obsolètes de la surface du globule rouge, par leur tri

spécifique dans les vésicules internes des endosomes multivésiculaires, puis leur expulsion dans le milieu extracellulaire. Le récepteur de la transferrine (RTf), dont environ 100 000 copies sont présentes dans un réticulocyte, disparaît totalement de la surface érythrocytaire via la voie exosomale [1]. L'intégrine $\alpha 4 \beta 1$, impliquée dans la rétention de la cellule érythroïde dans l'îlot érythroblastique¹, est également évacuée de la surface des globules rouges matures par son tri exosomal, évitant ainsi une interaction des érythrocytes avec les cellules endothéliales et la formation de bouchons vasculaires [4].

Similitude de signaux *eat me* exprimés par les corps apoptotiques et les exosomes

Des travaux publiés récemment montrent un autre point de similitude entre apoptose et sécrétion d'exosomes à partir de réticulocytes [5]. Les corps apoptotiques résultant de la mort programmée des cellules sont rapidement éliminés par phagocytose sans occasionner de lésion inflammatoire. En effet, contrairement

au phénomène de nécrose, l'intégrité de la membrane cellulaire est conservée lors de l'apoptose, permettant d'éviter la libération de molécules (par exemple *heat shock proteins*, ADN...) capables de provoquer une immuno-stimulation. La présence de signaux de mort (ou signaux « *eat-me* ») à la surface de la cellule apoptotique entraîne sa reconnaissance par des phagocytes professionnels ou occasionnels. Le premier signal de mort décrit a été la phosphatidylsérine (PS). Normalement présent exclusivement dans le feuillet interne de la membrane, ce phospholipide est exposé à la surface des cellules apoptotiques [6]. Plus récemment, l'exposition d'un autre phospholipide, la lysophosphatidylcholine (LPC), a été décrite comme un autre signal de mort. La LPC est produite dans les cellules apoptotiques par l'activation d'une iPLA2 (phospholipase A2 indépendante du calcium) par la caspase-3 [7]. L'exposition de ces deux phospholipides (PS et LPC) à la surface des cellules apoptotiques permet le recrutement d'opsonines spécifiques qui peuvent interagir avec des récepteurs membranaires de phagocytes et entraîner leur ingestion [7]. Or, MFG-E8 (*milk fat globule-EGF factor 8 protein*), une opsonine spécifiquement recrutée par la présence

¹ On appelle îlot érythroblastique dans la moelle osseuse la structure que forment les érythroblastes en voie de différenciation groupés autour d'un macrophage important notamment pour les échanges de fer.