

Nouvelles stratégies anti-tumorales : ciblage sélectif des formes pro-angiogéniques de VEGF

Bernard Lévy

Institut des vaisseaux et du sang, Paris, France

[<bernard.levy@inserm.fr>](mailto:bernard.levy@inserm.fr)

Mots-clés : VEGF anti-angiogénique, vaccination anti-VEGF

Guyot M, et al. Targeting the pro-angiogenic forms of VEGF or inhibiting their expression as anti-cancer strategies. *Oncotarget* 2017 ; 8 : 9174-88.

L'angiogenèse physiologique nécessite un équilibre précis et délicat entre différents acteurs et facteurs pro- ou anti-angiogéniques impliqués.

L'angiogenèse tumorale est contrôlée essentiellement par le VEGF, surtout le VEGF-A (qu'on nommera simplement VEGF dans cet article). Le VEGF a donc, logiquement, été ciblé dans différentes maladies comme les rétinopathies diabétiques et dans différents types de cancers, en association avec les chimiothérapies classiques. Le bévacizumab (BVZ) a reçu l'agrément des principales agences pour traiter les cancers du côlon, du sein, des poumons et du rein. Bien que le BVZ ait le plus souvent démontré une amélioration des durées de survie sans progression, l'amélioration de la survie globale n'est, en général, pas flagrante. Après diminution initiale de la taille de la tumeur au début du traitement, une récurrence, souvent dans une forme plus agressive est généralement constatée, surtout dans les carcinomes du rein à cellules claires [1] et les cancers du sein [2]. Ces résultats sont évidemment décevants car on s'attendait bien entendu à ce que le BVZ, en neutralisant le VEGF, diminue de manière durable à la fois la vascularisation tumorale et la taille de la tumeur elle-même.

La découverte de nouvelles isoformes de VEGF, appelées « VEGF_{xxx}b »¹ anti-angiogéniques ou, pour le moins, moins pro-angiogéniques que les VEGF [3] permet d'avancer de nouvelles hypothèses sur la raison pour laquelle les anticorps dirigés contre le VEGF ont des effets limités. Les isoformes VEGF_{xxx}b sont synthétisées

par épissage alternatif de l'exon 8a vers l'exon 8b. Cet épissage modifie les 6 derniers acides aminés de la protéine (CDKPRR pour VEGF et SLTRKD pour VEGFxxx_b). Par combinaison de plusieurs épissages, 7 isoformes pro-angiogéniques et 5 isoformes anti-angiogéniques sont synthétisées. Les épissages alternatifs dépendent eux-mêmes d'un facteur spécifique, le SRSF1 (*serine-arginine-rich splicing factor 1*) qui oriente la transcription de VEGF vers ses formes pro-angiogéniques alors que le SRSF6 conduit à l'expression des isoformes anti-angiogéniques de VEGF [4]. Dans les cellules tumorales, l'équilibre entre VEGF et VEGFxxx_b est rompu en faveur des isoformes pro-angiogéniques. Les formes anti-angiogéniques de VEGF sont néanmoins retrouvées dans de nombreuses tumeurs, en particulier dans le carcinome rénal à cellules claires [5]. Le BVZ se lie à la fois aux diverses isoformes du VEGF et a la même affinité pour VEGF et VEGFxxx_b, ce qui pourrait expliquer pourquoi certaines tumeurs, qui expriment fortement VEGFxxx_b ne bénéficient pas du traitement par BVZ [6]. Le rapport des concentrations protéiques VEGF/VEGFxxx_b détermine probablement mieux les effets pro- ou anti-angiogéniques d'un anticorps anti-VEGF que les niveaux de VEGF ou de VEGFxxx_b eux-mêmes [7]. Le BVZ diminue la densité vasculaire tumorale mais favorise le développement des vaisseaux lymphatiques [8] qui facilitent probablement la diffusion de métastases. Dans de nombreux cas, le volume de la tumeur diminue immédiatement après traitement par BVZ ; cependant, dans un deuxième temps, on observe une sélection des cellules tumorales restantes, qui ont des propriétés métastatiques augmentées [8, 9].

¹xxx désigne le nombre d'acides aminés de l'isoforme, par référence aux différentes isoformes classiques du VEGF dont la principale est le VEGF165

Il est important de mieux comprendre les effets des anti-angiogéniques sur la régulation de VEGF/VEGFxxx_b. Une des difficultés est liée à la non-spécificité des anticorps qui permettent de quantifier le VEGF tumoral : alors qu'il existe des anticorps spécifiques pour VEGFxxx_b, on ne dispose pas encore d'anticorps spécifiques pour les formes pro-angiogéniques de VEGF. Cette lacune rend évidemment la valeur pronostique de l'expression de VEGF par la tumeur moins pertinente. On a montré que, si la concentration intra-tumorale de VEGFxxx_b est importante, le BVZ n'a pas d'effet sur la survie de patients atteints de cancer colorectal métastasé [10]. Il serait donc important de mesurer systématiquement le rapport VEGF/VEGFxxx_b avant l'administration du BVZ.

En fonction de ce qui précède, les auteurs ont fait l'hypothèse selon laquelle le ciblage spécifique des formes pro-angiogénique de VEGF sans affecter les

isoformes anti-angiogéniques VEGFxxx_b, devrait avoir des effets bénéfiques plus importants.

Le but de ce travail était triple :

- 1 - démontrer que VEGFxxx_b a un effet antitumoral dans des modèles de cancer du rein et de carcinome du côlon ;
- 2 - évaluer le rôle préventif d'une immunisation prophylactique contre les formes pro-angiogéniques de VEGF dans le développement de tumeurs très angiogéniques ;
- 3 - évaluer la pertinence du ciblage le facteur d'épissage SRSF1 ou de ses sites de liaison pour favoriser l'expression de VEGFxxx_b et pour ralentir la croissance tumorale.

Résultats

1- L'expression de VEGF165_b réduit le développement d'un cancer colorectal chez la souris et révèle une activité du BVZ (*figure 1*).

2- L'immunisation active contre les formes pro-angiogéniques du VEGF limite le nombre et la croissance des tumeurs

Les auteurs ont procédé à une immunisation prophylactique contre les formes pro-angiogéniques de VEGF. Cette vaccination n'a pas affecté les formes anti-angiogéniques de VEGF : le plasma de la plupart des souris immunisées contenait des anticorps reconnaissant VEGF165 mais pas VEGF165_b. Les souris vaccinées contre les formes pro-angiogéniques de VEGF ont reçu des cellules tumorales syngéniques très agressives : cellules de carcinome rénal (RENCA) et de mélanome (B16) qui sécrètent des quantités équivalentes de VEGF. La croissance des tumeurs était bien inférieure chez les souris vaccinées (*figure 2A, 2B*). Le temps médian de survie était significativement augmenté chez les souris immunisées dans les deux modèles d'injection de cellules tumorales : 59,1 versus 51 jours ($p = 0,04$) pour les souris ayant reçu des cellules RENCA et 31,8 versus 27,5 jours ($p = 0,01$) pour celles ayant reçu des cellules B16 (*figure 2C, 2D*). Ces résultats sont en faveur d'un effet bénéfique d'une immunisation prophylactique contre les formes pro-angiogéniques de VEGF.

3- Les IgG purifiées provenant de souris immunisées contre les formes pro-angiogéniques de VEGF réduisent la croissance de cellules tumorales humaines RCC (cellules de carcinome rénal) implantées chez la souris nude

(figure 3)

4- SRSF1 est un marqueur de mauvais pronostic pour le carcinome rénal

Le SRSF1 favorise l'épissage des RNA messagers vers les formes pro-angiogéniques de VEGF. Les auteurs ont quantifié l'expression du SRSF1 dans des lignées de carcinome rénal en fonction du statut de leur production de protéine codée par le gène *VHL* (pVHL) et de leur capacité à induire des tumeurs chez la souris. Les tests « témoins » ont été effectués avec des cellules de biopsie de rein normal. La capacité de donner naissance rapidement à des tumeurs de volume supérieur à 1 cm³ chez la souris nude est corrélée avec les niveaux les plus élevés d'expression de SRSF1 (figure 4A). De plus, le SRSF1 était plus exprimé dans le tissu tumoral que dans le tissu sain (figure 4B).

5- La down-régulation de SRSF1 ralentit le développement tumoral

L'ARN messager de VEGF_{xxx}b et la protéine elle-même sont indétectables dans les cellules tumorales 786-O. Les auteurs ont diminué l'expression de SRSF1, par siARN, pour augmenter le rapport VEGF_{xxx}b/VEGF et donc inhiber la vascularisation tumorale. Alors que les quantités de l'ARNm de VEGF n'étaient pas modifiées par le siARN, l'inhibition de SRSF1 était associée à une augmentation modeste mais reproductible et durable de l'ARNm de VEGF_{xxx}b (augmentation de 20 % ; $p = 0,0015$) et du rapport VEGF_{xxx}b/VEGF. Les cellules dont l'expression de SRSF1 avait été inhibée ont été injectées à des souris nude. La croissance de la tumeur est limitée dans ce groupe pendant 2 mois mais tend à rejoindre celle observée après injection de cellules non down-régulées après 60 jours (Figure 5A). On n'a pas observé de différence d'expression du VEGF par les cellules transfectées avec le siARN ; cependant, la concentration de VEGF_{xxx}b était augmentée dans les tumeurs développées à partir de cellules transfectées avec le siARN de SRSF1 (figure 5B).

Discussion

Le même groupe avait déjà montré que le niveau de VEGF₁₆₅b est en général réduit dans les tumeurs par rapport aux tissus normaux et que, dans 20 % des carcinomes rénaux testés, le niveau de VEGF₁₆₅b est plus élevé que celui mesuré dans les tissus normaux [11]. La présence de VEGF₁₆₅b dans la tumeur expliquerait, au moins en partie, pourquoi certains patients ne répondent pas au BVZ ou développent une résistance au cours du traitement : le BVZ se lie avec la même affinité aux formes pro- et anti-angiogéniques de VEGF, limitant probablement son

efficacité [6]. Le niveau d'expression des formes anti-angiogéniques de VEGF chez les patients pourrait prédire l'inefficacité des traitements anti-VEGF. En général, un niveau d'expression tumoral de VEGF élevé est corrélé avec un mauvais pronostic [11] sauf dans le carcinome rénal pour lequel l'expression de VEGF n'a pas de valeur prédictive quant à l'efficacité d'un traitement anti-VEGF [12]. La présence des formes anti-angiogéniques pourrait expliquer ce paradoxe. Les outils actuels de dosage et de détection ne permettent pas de différencier les formes pro- et anti-angiogéniques de VEGF. Il serait certainement intéressant de développer des anticorps spécifiques reconnaissant VEGF et VEGFxxx_b.

En résumé et conclusions

Les auteurs suggèrent donc que l'efficacité du bévacizumab est limitée par l'inhibition non spécifique des formes anti-angiogéniques de VEGF. G. Pagès et son équipe présentent plusieurs stratégies qui ciblent distinctement les formes pro-angiogéniques de VEGF et pensent, ainsi, améliorer les possibilités thérapeutiques des traitements anti-angiogéniques.

La première stratégie, prophylactique, consiste à vacciner les souris avec un peptide spécifique des formes pro-angiogéniques de VEGF. Les anticorps anti-VEGF développés par les souris limitent le nombre et la croissance des cellules tumorales injectées après immunisation. L'anticorps spécifique des formes pro-angiogéniques de VEGF a des effets anti-angiogéniques et anti-tumoraux plus puissants que ceux du BVZ. Après humanisation de l'anticorps, la technique d'immunisation originale pourrait être plus facilement applicable au patient. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de SRPK1 pourrait également représenter un développement prometteur des stratégies anti-angiogéniques.

La seconde stratégie, thérapeutique, consiste à traiter les souris avec des anticorps spécifiques des formes pro-angiogéniques de VEGF. Cette stratégie a permis de valider le bénéfice obtenu avec ces anticorps par rapport à celui obtenu avec le BVZ qui inhibe avec la même affinité toutes les isoformes de VEGF.

Liens d'intérêts : L'auteur déclare ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

- 1 Escudier B, Bellmunt J, Negrier S, *et al.* Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival. *J Clin Oncol* 2010 ; 28 : 2144-50.
- 2 Pivot X, Schneeweiss A, Verma S, *et al.* Efficacy and safety of bevacizumab in combination with docetaxel for the first-line treatment of elderly patients with locally recurrent or metastatic breast cancer: results from AVADO. *Eur J Cancer* 2011 ; 47 : 2387-95.
- 3 Catena R, Larzabal L, Larrayoz M, *et al.* VEGF121b and VEGF165b are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. *Mol Cancer* 2010 ; 9 : 320.
- 4 Nowak DG, Woolard J, Amin EM, *et al.* Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J Cell Sci* 2008 ; 121 : 3487-95.
- 5 Grepin R, Guyot M, Jacquin M, *et al.* Acceleration of clear cell renal cell carcinoma growth in mice following bevacizumab/Avastin treatment: the role of CXCL cytokines. *Oncogene* 2012 ; 31 : 1683-94.
- 6 Varey AH, Rennel ES, Qiu Y, *et al.* VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br J Cancer* 2008 ; 98 : 1366-79.
- 7 Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to antiangiogenic therapeutics?. *Nat Rev Cancer* 2008 ; 8 : 880-7.
- 8 Paez-ibes M, Allen E, Hudock J, *et al.* Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 2009 ; 15 : 220-31.
- 9 Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, *et al.* Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2009 ; 15 : 232-9.
- 10 Bates DO, Catalano PJ, Symonds KE, *et al.* Association between VEGF splice isoforms and progression-free survival in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab. *Clin Cancer Res* 2012 ; 18 : 6384-91.
- 11 Bukowski RM, Kabbinavar FF, Figlin RA, *et al.* Randomized phase II study of erlotinib combined with bevacizumab compared with bevacizumab alone in metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol* 2007 ; 25 : 4536-41.
- 12 Jubb AM, Harris AL. Biomarkers to predict the clinical efficacy of bevacizumab in cancer. *Lancet Oncol* 2010 ; 11 : 1172-83.

Illustrations

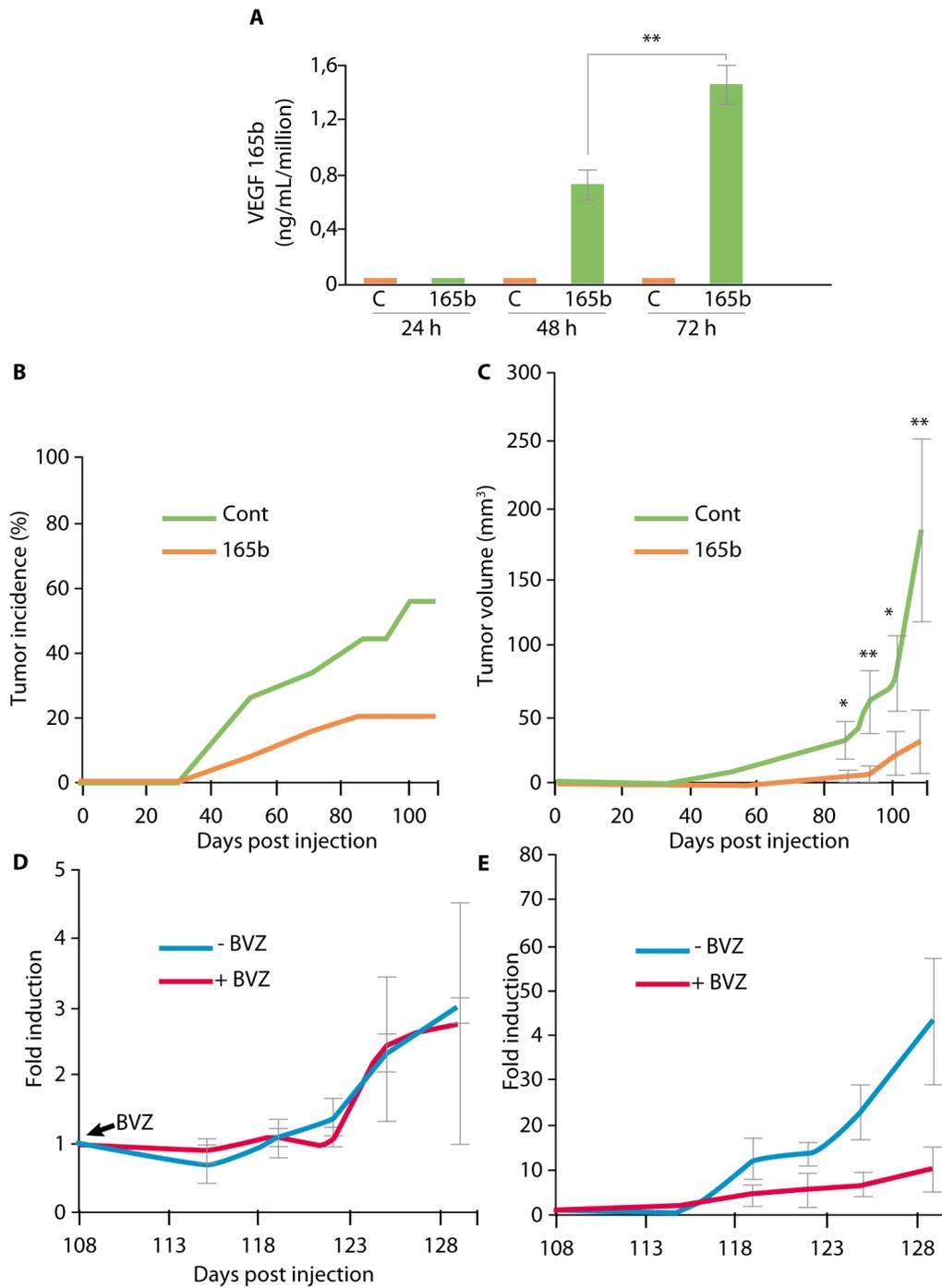


Figure 1. L'expression de VEGF165b inhibe la croissance de tumeurs rénales expérimentales. **A** : Culture de cellules (786-O) témoin ou exprimant VEGF165b quantifié dans le surnageant : les cellules libèrent effectivement VEGF165b, la quantité exprimée dépend du temps de culture. **B, C** : 3×10^6 cellules témoins ou

exprimant VEGF165b ont été injectées sous la peau des souris immunodéprimées « nude » ($n = 25$ par groupe). **B** : Nombre de souris (en %) développant une tumeur ; **C** : Volume de la tumeur en fonction du temps après injection des cellules. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$. **D, E** : Les souris développant une tumeur reçoivent du BVZ (150 mg deux fois par semaine) ou une IgG placebo. **D** : Souris ayant reçu une injection sous-cutanée de cellules témoins : aucun effet du BVZ ; **E** : Souris ayant reçu une injection sous-cutanée de cellules exprimant VEGF165b. Le BVZ inhibe le développement de la tumeur.

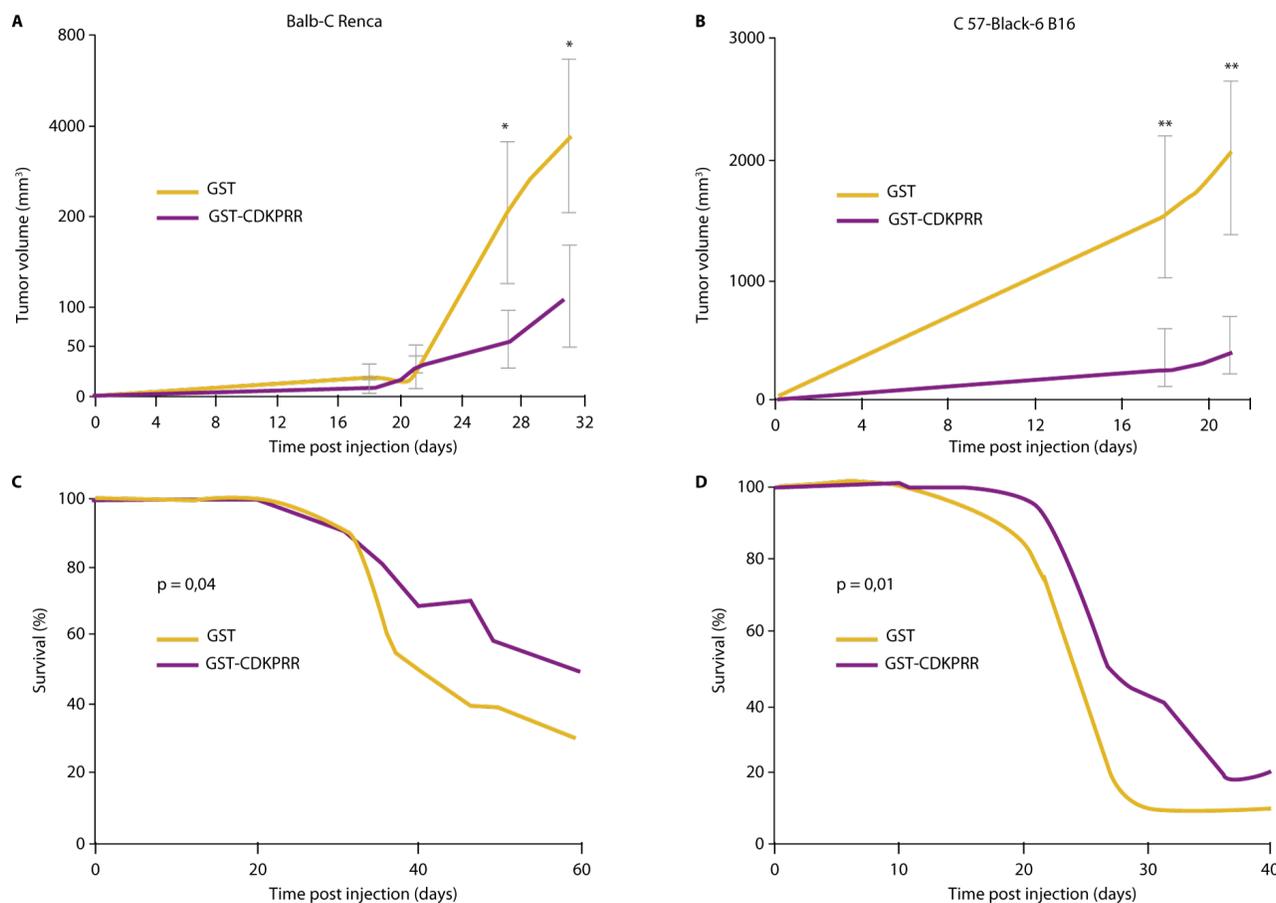


Figure 2. L'immunisation contre les formes pro-angiogéniques de VEGF inhibe le développement des tumeurs. **A, C** : Des souris Balb-C ($n = 20$ par groupe) ont reçu des injections immunisantes (GST CDKPRR) ou témoin (GST) une fois par semaine pendant 2 mois. Une semaine après la dernière injection, des cellules de carcinome rénal (RENCA) ont été implantées par voie sous-cutanée. La taille de la tumeur (A) était réduite et la durée de survie (C) était augmentée chez les souris immunisées $*p < 0,05$; $**p < 0,01$. **B, D** : Même protocole appliqué à des souris Black 6 ($n = 20$ par groupe) recevant des cellules de mélanome B16.

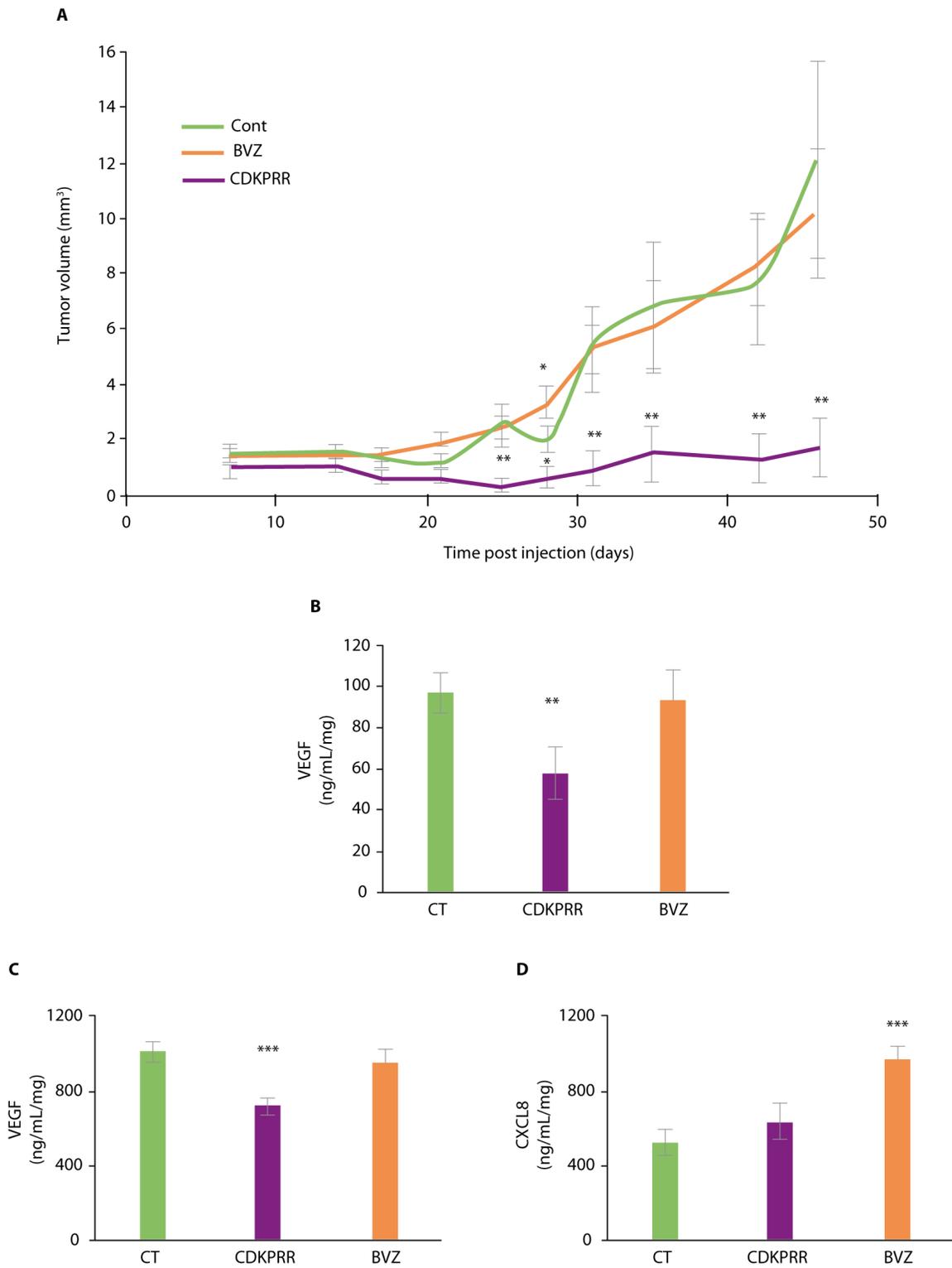


Figure 3. Les IgG de souris immunisées contre les formes pro-angiogéniques de VEGF inhibent la croissance de cellules de carcinome rénal humaines (RCC) implantées chez la souris nude. **A** : Les souris reçoivent des cellules 786-O

exprimant le gène de la luciférase. Quinze jours plus tard on leur injecte 7,5 mg/kg d'immunoglobuline IgG purifiée provenant de souris immunisées contre les formes pro-angiogéniques de VEGF ou du BVZ. Les souris immunisées ne développent pas de tumeur contrairement aux souris témoins et à celles recevant le BVZ $*p < 0,05$; $**p < 0,01$. **B** : Contenu en VEGF dans les tumeurs (ELISA). Les tumeurs provenant de souris immunisées contiennent moins de VEGF que celles prélevées sur des souris témoins et sur celles traitées par BVZ. $**p < 0,01$. **C** : Contenu en VEGF dans le surnageant de cultures de tumeurs (ELISA) $***p < 0,001$. **D** : Contenu en CXCL8 (interleukine 8) dans le surnageant de cultures de tumeurs. $***p < 0,001$.

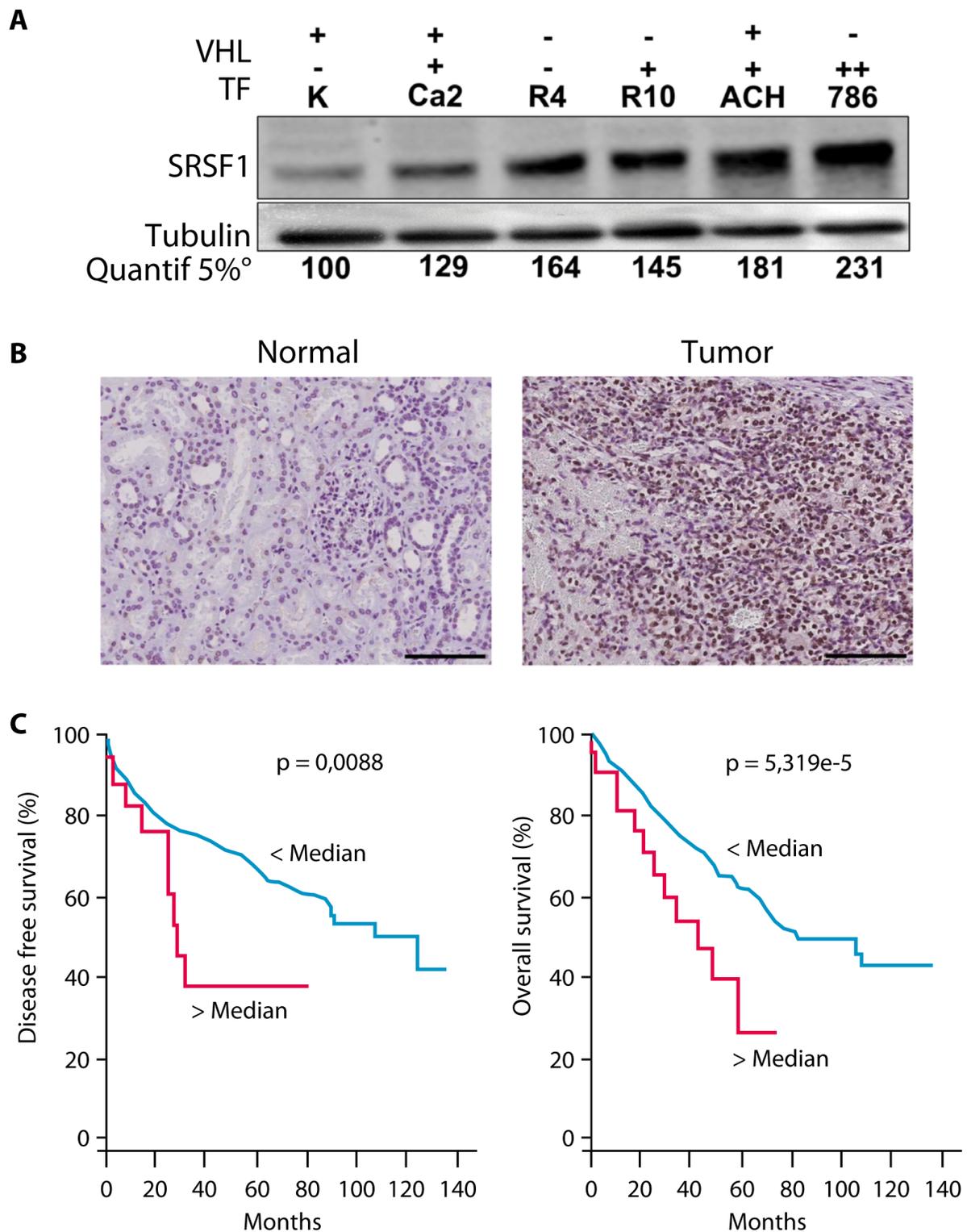


Figure 4. Le SRSF1 est surexprimé dans les cellules de carcinome rénal (RCC) et associé à un mauvais pronostic. **A** : Expression de la protéine SRSF1 par différentes

lignées de RCC [Caki-2, (Ca2), (RCC4 (R4), RCC10 (R10), ACHN (ACH) et 786-O (786)] et par des cellules rénales saines (K). Statut de pVHL : (wild-type : + ; muté : -) et capacité à développer une tumeur (TF) chez la souris nude. « - » = pas de tumeur ; « + » = tumeurs < 1 cm³ soixante jours après injection des cellules ; « ++ » = tumeurs < 1 cm³ soixante jours après injection des cellules. **B** : Exemple d'expression de SRSF1 dans une tumeur et dans un tissu sain. Échelle : 20 µm. **C** : Courbes de Kaplan-Meier pour la survie globale dans une population de 534 patients atteints de carcinome rénal en fonction du niveau d'expression de SRSF1. (<http://www.cbioportal.org>)

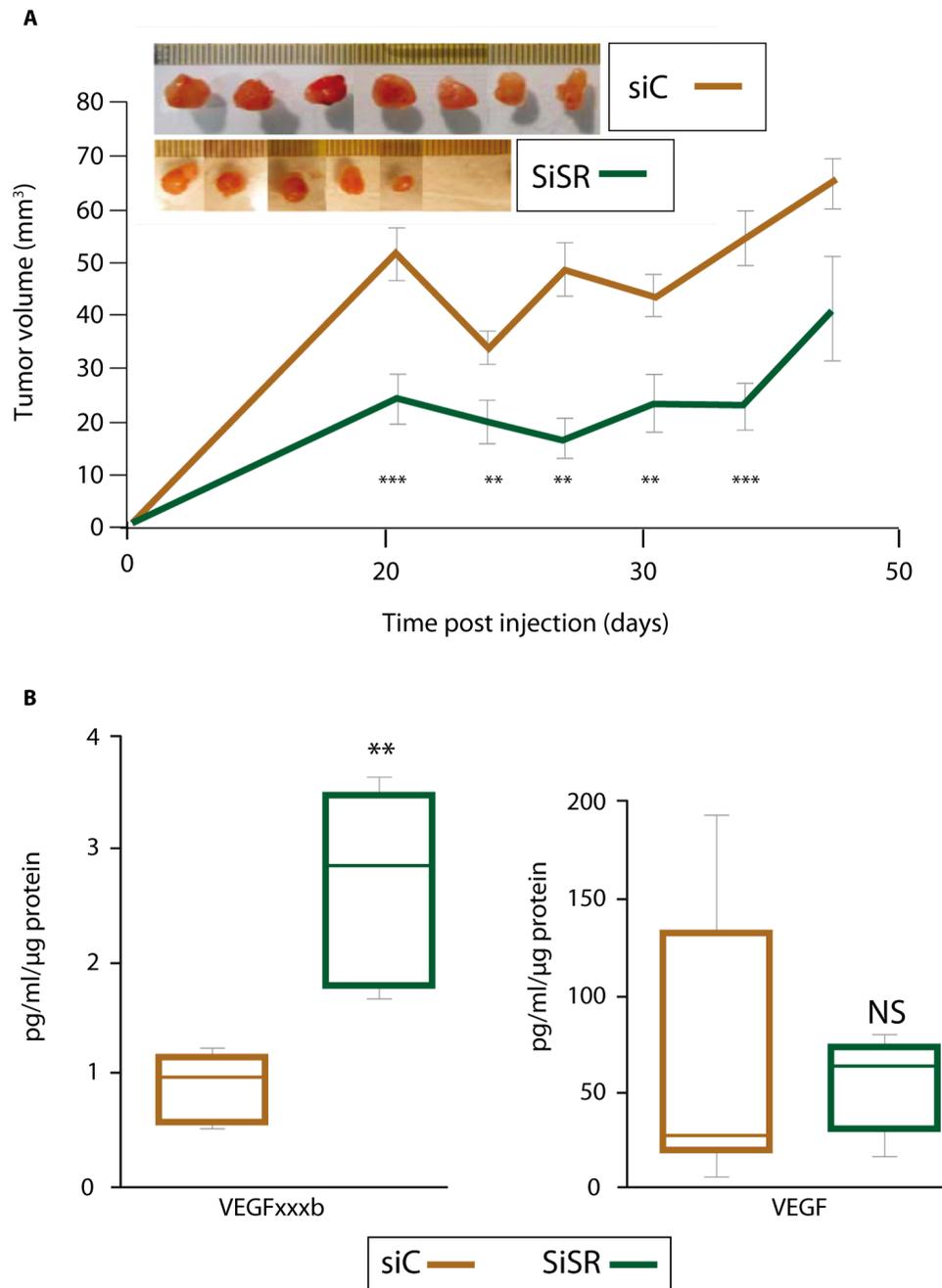


Figure 5. L'inhibition de l'expression de SRSF1 par siARN dans des cellules 786-0 diminue la taille de la tumeur provoquée par l'injection de ces cellules à des souris nude (**A**), augmente l'expression de VEGFxxx sans modifier celle de VEGF (**B**).