

LE CIBLAGE THÉRAPEUTIQUE : vers une guerre propre et efficace contre le cancer

V. CASTRONOVO (1), D. WALTREGNY (1-2), O. DETRY (3), C. COIMBRA MARQUES (3), A. DE ROOVER (3), P. HONORÉ (3), E. DE PAUW (1-4), A. TURTOI (1)

RESUME : Une des approches prometteuses pour le développement de thérapies anticancéreuses plus sélectives et plus efficaces consiste en la livraison ciblée de molécules bioactives anticancéreuse spécifiquement au niveau de l'environnement tumoral via l'utilisation d'outils moléculaires (anticorps, ligands chimiques) spécifiques pour des biomarqueurs associés à la tumeur. Pour que de tels biomarqueurs soient éligibles comme cibles thérapeutiques, ils doivent idéalement répondre à trois critères: (i) accessibilité à partir du compartiment sanguin, (ii) expression à un niveau suffisant, (iii) pas ou peu d'expression dans les tissus normaux. La plupart des stratégies couramment utilisées pour la découverte de ces biomarqueurs (par exemple à partir de liquides biologiques) ne permettent pas de déterminer s'ils sont accessibles et candidat pour le développement en pathologie humaine de ligands à haute affinité tels que des anticorps monoclonaux administrés de manière systémique. Des technologies protéomiques innovatrices sont capables d'identifier efficacement des biomarqueurs accessibles et représente une étape clé pour le développement clinique de ces thérapies ciblées.

MOTS-CLÉS : *Thérapies ciblées - Cancer - Protéomique - Biomarqueurs*

Chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, et hormonothérapie sont les traitements anticancéreux les plus usités. La plupart des agents de chimiothérapie ont pour but d'empêcher la division cellulaire. Celle-ci n'étant pas l'apanage des cellules cancéreuses, la toxicité du traitement pour les tissus normaux impose de limiter les doses délivrées et la fréquence de leur administration. De plus, une proportion significative des drogues pourrait ne pas s'accumuler préférentiellement dans les tissus tumoraux, mais bien dans les tissus normaux.

Pour contourner cet écueil, une approche intéressante consiste à se dégager d'une administration systémique (c.à.d. atteignant tous les tissus de l'organisme) des agents thérapeutiques et de les livrer spécifiquement aux lésions malignes. Cette idée est loin d'être nouvelle, et dès la fin des années 70, elle a pu être testée sur des modèles expérimentaux grâce à l'avènement de la technologie autorisant la production d'anticorps monoclonaux (1).

(1) Laboratoire de Recherche sur les Métastases (GIGA-Cancer), Université de Liège.

(2) Service d'Urologie, CHU de Liège.

(3) Service de Chirurgie Abdominale, CHU de Liège.

(4) Laboratoire de Spectrométrie de Masse, Université de Liège.

TARGETED THERAPY: TOWARD A CLEAN AND EFFECTIVE WAR AGAINST CANCER

SUMMARY : One promising avenue towards the development of more selective, better anticancer drugs consists in the targeted delivery of bioactive compounds to the tumor environment by means of binding molecules specific for tumor-associated biomarkers. Eligibility of such markers for therapeutic use implies ideally three criteria : (i) accessibility from the bloodstream, (ii) expression at sufficient level and (iii) no (or much lower) expression in normal tissues. Most current discovery strategies (such as biomarker searching into body fluids) provide no clue as to whether proteins of interest are accessible, in human tissues, to suitable high-affinity ligands, such as systemically delivered monoclonal antibodies. Innovative proteomic technologies are able to identify such accessible biomarkers and represent a key step in the clinical development of such target therapies.

KEYWORDS : *Target therapies - Cancer - Proteomic - Biomarkers*

En effet, depuis une trentaine d'années, de nombreux anticorps monoclonaux dirigés contre des biomarqueurs moléculaires associés aux tumeurs ont été employés pour cibler des lésions malignes chez l'animal, puis chez l'homme. Les premières études cliniques se sont heurtées au problème de l'immunogénicité des anticorps murins. Produits à partir de lymphocytes de rongeurs, les anticorps conservaient en effet les caractéristiques de leur espèce d'origine et, une fois injectés chez l'homme, étaient rejetés par son système immunitaire. Depuis le milieu des années 80, l'apparition successive d'anticorps «chimériques», humains à 70%, d'anticorps «humanisés», humains à 90%, et, récemment, d'anticorps humains à cent pour cent a permis d'obvier à cette difficulté (1).

Le ciblage des cellules cancéreuses par des anticorps peut se réaliser selon deux stratégies.

STRATÉGIE D'INHIBITION CIBLÉE

La première, qualifiée de stratégie d'inhibition, consiste à annihiler une cible moléculaire (enzymes, récepteurs, etc.) afin d'enrayer la «machinerie» de la cellule et d'en provoquer la mort. Les anticorps, qui sont censés reconnaître spécifiquement la cible, sont délivrés par voie sanguine. Plusieurs anticorps de ce type sont aujourd'hui utilisés en clinique avec des taux de succès variables.

Cette approche est néanmoins limitée par un certain nombre de contraintes liées aux propriétés de la majorité des cancers : l'inaccessibilité relative des cellules cancéreuses aux anticorps (en raison par ex. d'une vascularisation aberrante); la faible pénétration des anticorps au niveau des tumeurs (en raison par ex. d'une pression interstitielle élevée dans les tumeurs); et surtout, l'hétérogénéité des cellules cancéreuses (toutes les cellules pourraient ne pas requérir, pour leur survie, la machinerie qui est ciblée) et leurs capacités étonnantes d'adaptation pour résister à l'inhibition ciblée.

Ainsi, une alternative à cette approche d'inhibition s'est progressivement orientée vers le ciblage spécifique, non plus des cellules tumorales, mais des néovaisseaux tumoraux. Le ciblage de l'angiogenèse tumorale comporte plusieurs avantages. Les biomarqueurs des néovaisseaux tumoraux sont directement accessibles aux anticorps injectés par voie intraveineuse. De plus, ils sont produits par des cellules endothéliales (recouvrant la paroi des vaisseaux) et/ou des cellules de la matrice extracellulaire (la charpente du tissu), génétiquement plus stables que les cellules malignes. En outre, de nombreuses études ont indiqué que les dommages sélectifs apportés aux néovaisseaux tumoraux peuvent conduire à une mort massive des cellules cancéreuses. Enfin, les traitements dirigés contre les néovaisseaux tumoraux semblent se jouer des problèmes de résistance. Toutefois, quelle que soit leur forme, les stratégies d'inhibition butent sur la difficulté de prédire la toxicité et l'efficacité des traitements proposés, ainsi que sur celle d'identifier des cibles moléculaires importantes et non redondantes, c'est-à-dire dont la fonction ne peut être reprise par des molécules «apparentées» (par ex. deux familles de molécules proangiogéniques ayant sensiblement les mêmes fonctions).

STRATÉGIE DE LIVRAISON CIBLÉE D'AGENTS THÉRAPEUTIQUES

La seconde approche, la livraison ciblée d'agents thérapeutiques sur le site tumoral - de «bombes à tête chercheuse» - apparaît comme une piste prometteuse. Dans cette approche, la qualité des biomarqueurs cibles n'a rien d'aléatoire. La mise en œuvre d'une telle stratégie ciblée suppose, dans une première étape, l'identification de biomarqueurs associés aux néovaisseaux tumoraux et/ou le tissu conjonctif situé autour des cellules tumorales. Pour pouvoir être considérés comme des cibles potentielles, les biomarqueurs doivent être exprimés spécifi-

quement au niveau de la lésion cancéreuse et y être présents en grande quantité, mais aussi être d'un accès aisé via la circulation sanguine. Si ces critères sont rencontrés, on peut espérer que la livraison sélective par ciblage conduira à des accumulations très importantes des agents anticancéreux au niveau du site tumoral rapidement après injection intraveineuse, avec des concentrations de l'agent ciblant largement supérieures dans la tumeur par rapport aux tissus normaux (2, 3).

Divers programmes de recherche ont permis l'identification de nombreux biomarqueurs à partir de modèles expérimentaux *in vitro* et animaux. Mais un facteur limitant est que ceux-ci, bien que relativement spécifiques du cancer et en abondance appropriée, ne sont généralement pas accessibles à partir du torrent circulatoire (par ex. protéine nucléaire «protégée» des anticorps à l'intérieur des cellules), témoignant des difficultés du passage de l'expérimentation animale à l'application à l'homme.

D'où l'importance de l'accessibilité des biomarqueurs aux agents thérapeutiques et en particulier aux anticorps. Pour répondre à cet important aspect du ciblage thérapeutique, une voie nouvelle a été récemment mise en œuvre et a consisté à perfuser des souris par le cœur au moyen d'une solution de biotine, molécule capable de se lier aux protéines porteuses de groupes amines primaires. Cette technique permet «l'étiquetage» de ces dernières (4). Encore fallait-il pouvoir les purifier, les isoler du magma des milliers d'autres protéines. Cette opération fut menée à bien en raison de la très forte affinité existant entre la biotine et la streptavidine. Les protéines biotinyllées sont purifiées par chromatographie sur une colonne de streptavidine couplée à des billes de résine.

La méthode de «marquage» confère un certain avantage : la détection des protéines s'opère à partir d'une solution véhiculée par le torrent sanguin, comme le seront aussi, lors de leur administration, les molécules thérapeutiques couplées aux anticorps «têtes chercheuses». La comparaison des profils des protéines biotinyllées, trouvées respectivement au niveau de la tumeur et au niveau du tissu normal, permet de repérer les molécules accessibles par le torrent sanguin et sélectivement exprimées par les néovaisseaux tumoraux, la matrice extracellulaire péritumorale et, éventuellement, les cellules cancéreuses.

Pour des raisons éthiques évidentes, l'homme ne peut être perfusé comme les rongeurs par une injection intra-cardiaque d'une solution

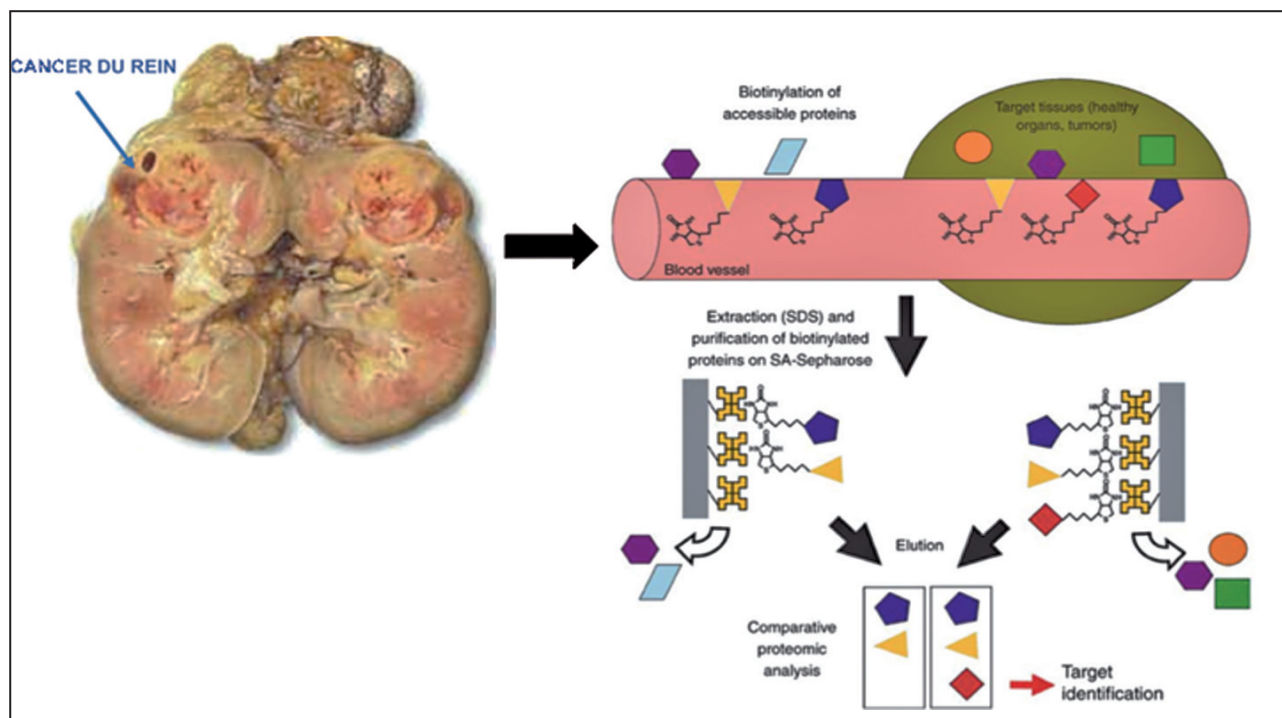


Figure 1. Identification de marqueurs accessibles au niveau du cancer du rein pour la thérapie ciblée via une technique de perfusion *ex vivo* par une solution de biotine suivie de la purification et l'identification des protéines biotinylées.

potentiellement toxique. Aussi chez l'homme, la méthodologie a été adaptée en réalisant la perfusion d'organes porteurs de cancers prélevés directement après leur résection chirurgicale. La méthode de biotinylation s'opère *ex vivo* (6). Elle a été réalisée au niveau d'organes perfusables tels que le rein (Fig. 1) ou le côlon. En effet, dans ces organes, l'anatomie vasculaire permet une perfusion *ex vivo* relativement facile. Comme dans l'expérimentation animale, après biotinylation par perfusion, des échantillons de tissus cancéreux et normaux adjacents ont été prélevés puis soumis à digestion pour récolter les protéines. Parmi celles-ci, celles qui ont été biotinylées sont récupérées sur les colonnes de streptavidine puis soumises à identification par technique de chromatographie suivie de spectrométrie de masse.

Cette méthode a permis d'identifier plusieurs centaines de protéines directement accessibles à partir des vaisseaux sanguins. Couplée à la technique de RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction), une analyse immunohistochimique a permis de valider l'identification d'une quinzaine de protéines exprimées spécifiquement dans le cancer rénal. Les marqueurs les plus souvent exprimés dans la tumeur et qui y présentent la distribution la plus large devraient représenter des cibles raisonnables pour le développement de thérapeutiques anticancéreuses

ciblées. L'étape suivante a pour but l'élaboration des «têtes chercheuses» destinées à véhiculer les anticancéreux vers les cibles choisies.

Malheureusement, la technique de perfusion a ses limites, aucune artère n'étant disponible pour la mettre en œuvre quand des organes tels que le sein ou la prostate font l'objet d'une résection chirurgicale; leur vascularisation est beaucoup trop complexe et fine pour envisager une perfusion efficace. Une alternative pour les organes non perfusables ou des tissus non perfusables comme les métastases consiste alors à immerger des échantillons de l'organe non perfusable dans une solution de biotine qui pénètre par simple diffusion. Les protéines porteuses de groupements amines primaires sont biotinylées (6). Il reste alors à poursuivre la procédure : les purifier, les identifier et distinguer celles qui sont spécifiques de la tumeur de celles que l'on retrouve dans les tissus sains. Cette alternative s'est avérée efficace dans des échantillons de tissus mammaires humains cancéreux et normaux. L'intérêt potentiel d'une telle technique se porte essentiellement sur les métastases car ce sont les lésions les plus difficiles à éradiquer. Alors que la chirurgie ou la radiothérapie restent, pour les tumeurs solides primaires localisées à l'organe, le traitement de choix, pour les cancers métastatiques, il y a peu de traitement efficace. Pouvoir cibler ces lésions sans dommage collatéral

représenterait un pas en avant énorme dans la lutte contre le cancer.

Ces résultats laissent augurer l'établissement d'un répertoire des biomarqueurs (antigènes) accessibles dans chaque type de tumeurs. Autant de cibles vers lesquelles pourront être dirigés des anticorps (*a priori* des anticorps monoclonaux humanisés) porteurs d'une «bombe», la drogue thérapeutique. Arrivée au stade clinique, la méthode pourrait offrir la possibilité d'effectuer «un tir à blanc», avec un agent radioactif associé à la «tête chercheuse». Dès lors, en réalisant une scintigraphie, on pourra s'assurer que celle-ci s'est bien fixée sur l'antigène. Si tel est le cas, un deuxième tir sera effectué, à «balles réelles» cette fois.

De surcroît, la technique de «marquage» ouvre la perspective de thérapies personnalisées, car, pour chaque patient et pour chaque tumeur, il pourrait être possible de déterminer la proportion relative des différents antigènes associés aux néovaisseaux tumoraux et/ou au stroma péritumoral. L'attaque portera alors de préférence sur la catégorie de cibles la mieux représentée et la plus largement distribuée.

BIBLIOGRAPHIE

1. Adams GP, Weiner LM.— Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**, 1147-1157.
2. Kischel P, Waltregny D, Castronovo V.— Identification of accessible human cancer biomarkers using ex-vivo chemical proteomic strategies. *Expert Review of Proteomics*, 2007, **4**, 727-739.
3. Lambert JM.— Drug-conjugated monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Curr Opin Pharmacol*, 2005, **5**, 543-549.
4. Rybak JN, Ettore A, Kaissling B, et al.— In vivo protein biotinylation for identification of organ-specific antigens accessible from the vasculature. *Nat Methods*, 2005, **2**, 291-298.
5. Castronovo V, Waltregny D, Kischel P, et al.— A chemical proteomics approach for the identification of accessible antigens expressed in human kidney cancer. *Mol Cell Proteomics*, 2006, **5**, 2083-2091.
6. Castronovo V, Kischel P, Guillonnet F, et al.— Identification of specific reachable molecular targets in human breast cancer using a versatile ex vivo proteomic method. *Proteomics*, 2007, **7**, 1188-1196.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Pr. V. Castronovo, Laboratoire de Recherche sur les Métastases (GIGA-Cancer), CHU de Liège, 4000 Liège, Belgique.