



Les facteurs de croissance de la famille de l'EGF et leurs récepteurs

Growth factors of the EGF family and their receptors

Pierre HUBERT

Laboratoire d'ingénierie des systèmes macromoléculaires (LISM), CNRS UPR 9027, Institut de biologie structurale et microbiologie, 31, chemin Joseph-Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20 <phubert@ibsm.cnrs-mrs.fr>

Résumé. Les facteurs de croissance les mieux connus et les plus étudiés appartiennent à la famille du facteur de croissance épidermique (EGF) et leurs récepteurs ont été également les premiers étudiés et les mieux compris. L'activation de ces récepteurs est permise par leur dimérisation, qui induit un changement de conformation aboutissant au dévoilement de leur activité tyrosine kinase intrinsèque, générant des tyrosines phosphates sur le récepteur lui-même comme sur des substrats protéiques cytoplasmiques. Les interactions entre les onze facteurs de croissance et leurs quatre types de récepteurs permettent une variété considérable d'effets selon le type cellulaire et le message reçu. La principale conséquence est la mise en œuvre de signaux de prolifération, qui peuvent suivre plusieurs voies de transduction, dont la voie des MAP kinases et celle de la PI3 kinase sont les mieux connues. Les altérations oncogéniques de l'interaction facteur de croissance-récepteur sont nombreuses et constituent autant de cibles potentielles pour une approche thérapeutique. ▲

Mots clés : facteur de croissance épidermique (EGF), récepteur de l'EGF, tyrosine kinase, ErbB

Abstract. *The growth factors that have been the first discovered and the best studied belong to the family of epidermal growth factors (EGF) and their receptors have also been the most studied and the best understood. The activation of these receptors occurs through their dimerisation, which induces a change of conformation leading to the unveiling of an intrinsic tyrosine kinase activity, which in turn generates tyrosine phosphate moieties on the receptor itself and on cytoplasmic protein substrates. The interactions between the eleven growth factors and their four receptors allow a considerable variety of effects according to the cell type and the message received. The main consequence is the generation of proliferation signals which may follow several transduction pathways, among which the MAP kinase and the PI3 kinase pathway are the best known. The oncogenic alterations of the growth factor-receptor interaction are multiple and constitute several potential targets for therapeutic development.* ▲

Key words: epidermal growth factor (EGF), EGF-receptor, tyrosine kinase, ErbB

Une série de premières

L'EGF (*epidermal growth factor* ou facteur de croissance épidermique) fait partie d'une famille d'une douzaine de facteurs de croissance impliqués dans le développement et le fonctionnement normal de différents organes (peau, cœur, poumons, système nerveux, glande mammaire, etc.). L'action de ces facteurs de croissance est médiée par une famille de quatre récepteurs membranaires ubiquitaires appelés ErbB (d'après leur analogie avec un oncogène d'un virus d'érythroblastose aviaire) ou HER (*human EGF receptor related*) (tableau 1). La nomenclature classique (EGFR et ErbB2 à 4) sera utilisée dans ce manuscrit. L'histoire de ces facteurs de croissance représente une suite de découvertes qui ont été autant de « premières » en oncologie moléculaire et ont largement participé au développement des nouvelles thérapeutiques anticancéreuses ciblées [1]. Ainsi, l'EGF fut l'un des tout premiers facteurs de croissance découverts, son récepteur fut

le premier récepteur à activité tyrosine kinase caractérisé puis cloné, et la forte homologie de ce récepteur avec un oncogène viral (vErbB) en fit aussi l'un des premiers « proto-oncogènes » ou oncogènes cellulaires caractérisés. Dès 1987, il fut montré que la surexpression d'ErbB2 dans le cancer du sein est un facteur de mauvais pronostic, ce qui conduisit au développement par la société Genentech du premier traitement anticancéreux ciblant un oncogène, l'anticorps humanisé trastuzumab (Herceptin®), approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) en 1998.

La masse des connaissances accumulées quant à la biologie moléculaire et cellulaire, plus récemment les structures tridimensionnelles, et aux mécanismes de signalisation de ces facteurs de croissance et de leurs récepteurs a stimulé de très nombreux travaux cherchant à inhiber l'activité anormale des récepteurs ErbB rencontrée dans de nombreux cancers, et en particulier les carcinomes. Aujourd'hui, plusieurs molécules,

Tableau 1. Les facteurs de croissance de la famille de l'EGF et leurs récepteurs (voir aussi la figure 3)

| Facteurs de croissance | Récepteurs reconnus | Année de découverte |
|---|----------------------------|---------------------|
| EGF (<i>epidermal growth factor</i> ; = urogastrone) | EGFR | 1962 |
| Amphiréguline (AR) | EGFR | 1988 |
| TGF- α (<i>transforming growth factor α</i>) | EGFR | 1982 |
| Epigène (EPG) | EGFR | 2001 |
| Bêtacelluline (BTC) | EGFR, ErbB4 | 1993 |
| HB-EGF (<i>heparin-binding EGF</i>) | EGFR, ErbB4 | 1991 |
| Epiréguline (EPR) | EGFR, ErbB4 | 1995 |
| Neurégulines (NRG, 4 gènes, nombreuses isoformes) | ErbB3, ErbB4 | 1992 |
| Récepteurs de facteurs de croissance | Ligands reconnus | Année de découverte |
| EGFR (<i>EGF receptor</i>) = ErbB1, HER1 | Tous sauf NRG | 1978, cloné en 1984 |
| ErbB2 ou HER2, neu (oncogène de rat) | Aucun | cloné en 1985 |
| ErbB3 ou HER3 | NRG1 et 2 | cloné en 1989 |
| ErbB4 ou HER4 | BTC, HB-EGF, EPR, NRG1 à 4 | cloné en 1993 |

anticorps ou inhibiteurs de tyrosine kinase de petite taille, sont disponibles dans certaines indications et de nombreuses autres sont en cours d'évaluation (tableau 2).

Cet article résume l'état actuel des connaissances acquises au niveau de la recherche fondamentale et souligne l'importance

que ces données ont eue et vont encore avoir dans le développement de thérapeutiques ciblées.

Biologie moléculaire, cellulaire et structurale

Structure primaire et organisation

L'EGF et son récepteur sont les prototypes de familles de protéines qui ont fait l'objet de duplications et de diversification au cours de l'évolution animale. Ainsi *C. elegans* ne possède qu'un homologue de l'EGF et de son récepteur (Lin3 et Let23 respectivement). La drosophile possède un seul récepteur (DER) et cinq homologues de l'EGF appelés Vein, Spitz, Kerren, Gurken et Argos, ce dernier étant un antagoniste sans équivalent chez les mammifères. Chez l'homme, on trouve quatre récepteurs homologues et onze ligands (tableau 1).

Les ligands de la famille de l'EGF peuvent être classés en fonction de leur sélectivité pour les récepteurs. L'EGF, le TGF α , l'amphiréguline et l'épigène se lient préférentiellement à l'EGFR ; la bêtacelluline, l'*heparin-binding GF* et l'épireguline se lient au REGF et à ErbB4 ; les neurégulines (1-4) ne se fixent qu'à ErbB3 et/ou ErbB4 [2]. Tous ces ligands sont des petites protéines solubles (d'environ 55 acides aminés) qui dérivent par protéolyse de précurseurs membranaires. Leur structure tridimensionnelle est caractérisée par la conservation de l'existence de trois ponts disulfures. Le clivage des précurseurs membranaires de ces facteurs de croissance est dû à l'activation de métalloprotéases appartenant aux familles ADAM et matricielles, en réponse à divers stimuli, en particulier à l'activation de récepteurs couplés aux protéines G. Ce phénomène d'activation indirecte, baptisé trans-

Tableau 2. Exemples de molécules ciblant les récepteurs ErbB

| Molécule | Cible | Cancer | Laboratoire | Statut |
|--|----------------------|---------------|-------------------------|--------------|
| Anticorps | | | | |
| Trastuzumab (Herceptin [®]) | ErbB2 | Sein | Genentech/Roche | Approuvé |
| Pertuzumab (Omnitarg) | ErbB2 | Ovaire, sein | Genentech | Phase II |
| Cetuximab (Erbix [®]) | EGFR | Côlon | ImClone Systems / Merck | Approuvé |
| Matuzumab (EMD72000) | EGFR | Rein | Merck | Phase II-III |
| Panitumumab (ABX-EGF) | EGFR | Côlon, rein | Abgenix | Phase II |
| Inhibiteurs de TK | | | | |
| Gefitinib (Iressa [®]) | EGFR | Poumon | Astra Zeneca | Approuvé |
| Erlotinib (OSI 774, Tarceva [®]) | EGFR | Poumon | Roche/Genentech/OSI | Approuvé |
| EKB569 (irréversible) | EGFR + ErbB2 | Côlon, poumon | Wyeth-Ayerst | Phase II-III |
| Lapatinib (GW2016) | EGFR + ErbB2 | Sein | GlaxoSmithKline | Phase III |
| Canertinib (CI1033) (irréversible) | Pan-ErbB | Sein, poumon | Pfizer | Phase I/II |
| AEE788 | EGFR + ErbB2, VEGF-R | | Novartis | Phase I |

activation, semble jouer un rôle important dans le pouvoir oncogénique de ces récepteurs.

Les quatre récepteurs ErbB sont des récepteurs membranaires et font partie de la famille des récepteurs à tyrosine kinase, qui comporte une soixantaine de membres chez l'homme. De façon générale, ils jouent un rôle très important dans la croissance, la différenciation et le contrôle du métabolisme cellulaire. Beaucoup de ces récepteurs sont des proto-oncogènes impliqués dans l'oncogenèse et suscitent un grand intérêt en tant que cibles pour les nouvelles thérapies anticancéreuses [3-5]. Les récepteurs ErbB partagent une forte homologie de structure primaire (40-45 %) qui se traduit par une organisation structurale commune caractéristique (*figure 1*) : la région extracellulaire ou ectodomaine est composée de quatre sous-domaines (I à IV) répétés deux à deux et se succédant en alternance. Les domaines I et III (L1 et L2) sont très semblables et analogues à un domaine du récepteur de l'IGF1 (*insulin-like growth factor 1*), un autre récepteur à activité tyrosine kinase. Les domaines II et IV sont, eux, caractérisés par leur abondance en résidus cystéines, d'où leur appellation CR1 et 2 (CR : *cysteine-rich*). La région extracellulaire est suivie du domaine transmembranaire, courte séquence de 23-24 acides aminés, principalement caractérisée par la très grande hydrophobie des acides aminés la composant. Cette séquence d'ancrage membranaire est suivie du côté cytoplasmique par un domaine juxtamembranaire dont le rôle n'est pas entièrement élucidé, un domaine à activité tyrosine kinase, très conservé aussi bien pour la famille des récepteurs à tyrosine kinase que pour les tyrosine kinases solubles et les protéines, et lipides-kinases en général. Enfin, on décrit un domaine C-terminal, riche en sites de phosphorylation, très important pour la transduction du signal « EGF » [2, 6].

Les comparaisons de séquences entre ces récepteurs et les études de liaison de ligands et d'activation de la kinase ont très tôt fait réaliser deux « anomalies » présentées par les récepteurs ErbB2 et ErbB3. Malgré des travaux assidus, aucun ligand n'a jamais été découvert pour ErbB2 et l'exploration du génome humain a confirmé cette particularité, qui a trouvé une explication structurale (voir *infra*). Quant à ErbB3, il ne possède aucune (ou qu'une très faible) activité kinase. Ces caractéristiques étonnantes pour des récepteurs les ont fait surnommer « sourd » (ErbB2) et « muet » (ErbB3).

Mécanismes d'activation (*figures 2 et 3*)

En l'absence de ligand, ces récepteurs existent majoritairement sous forme de monomères inactifs. La fixation d'un ligand va entraîner l'association de deux monomères, formant ainsi un dimère actif. Ces dimères actifs peuvent être des homodimères, composés de deux monomères identiques, ou des hétérodimères associant deux monomères de nature différente. On a ainsi une très grande variabilité pour la génération de signaux intracellulaires différents avec une « combinatoire » entre onze ligands et dix possibles dimères. Ainsi, les dimères les plus actifs sont ceux qui comprennent ErbB2 qui, bien que ne possédant pas de ligand, va être activé lors de son association à un autre membre de la famille ErbB. ErbB2 est le partenaire privilégié pour la formation d'hétérodimères, bien que sa surexpression, notamment dans certains cancers, puisse aussi entraîner la formation d'homodimères [7].

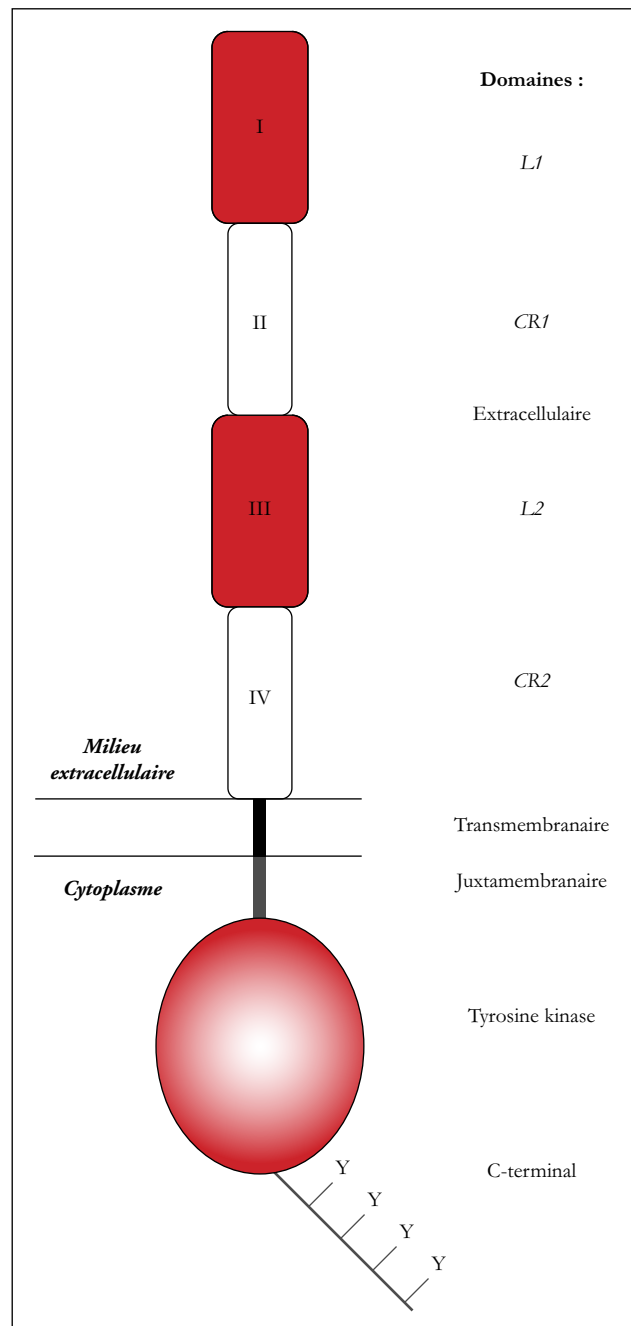


Figure 1. Structure schématique des récepteurs de la famille ErbB. La partie extracellulaire (~ 620 acides aminés) est composée de 4 domaines, homologues 2 à 2, appelés L1 et L2 (domaines I et III) et CR1 et CR2 (pour *cysteine rich*, domaines II et IV). S'ensuivent le domaine transmembranaire (~ 23 aa), le domaine juxtamembranaire (~ 40-45 aa), le domaine tyrosine kinase (~ 260 aa), et un domaine C-terminal (~ 230 à 380 aa) qui porte les sites majeurs de phosphorylation sur tyrosine.

L'activation de l'activité tyrosine kinase induite par dimérisation va se traduire par la phosphorylation de résidus tyrosine présents sur les récepteurs eux-mêmes (autophosphorylation), puis par le recrutement de protéines possédant des motifs de reconnaissance pour ces phosphotyrosines : domaines SH2 (*Src homology domain 2*) et PTB (*phosphotyrosine binding*). Ces événements vont entraîner l'activation de diver-

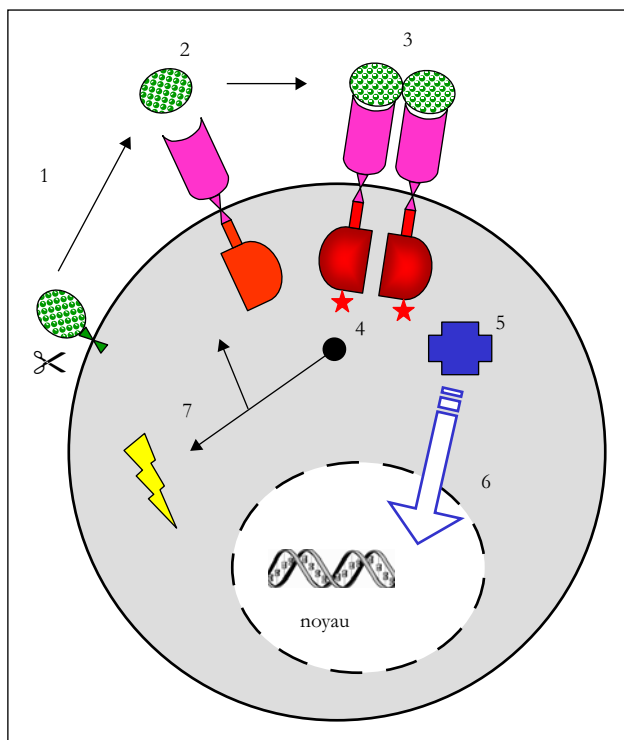


Figure 2. Mécanismes d'activation et de signalisation des récepteurs ErbB. L'activation des récepteurs débute avec la libération des ligands par protéolyse à partir de précurseurs membranaires (étape 1). Les ligands vont ensuite se fixer à un récepteur monomérique, entraînant sa dimérisation avec un partenaire identique ou différent (étapes 2 et 3). Cette dimérisation entraîne l'activation de la tyrosine kinase et la phosphorylation de résidus tyrosine du domaine C-terminal (étape 4). Ces tyrosines phosphorylées vont recruter diverses protéines adaptatrices et/ou des substrats de la kinase (étape 5), ce qui aboutit à l'activation des différentes voies de signalisation intracellulaires (étape 6). Les récepteurs activés sont ensuite internalisés par endocytose, puis dégradés ou recyclés à la surface cellulaire (étape 7).

ses cascades de signalisation, voies des MAP kinases, de la PI3 kinase, phospholipase C, etc. Les récepteurs ErbB possèdent des sites de phosphorylation sur tyrosine différents, ce qui explique la diversification des voies de signalisation activées en fonction des ligands et des partenaires associés dans les dimères [2, 6]. Cette diversification, ou « redistribution de l'information », est illustrée de façon simplifiée dans la figure 3. Les voies principales seront décrites en détail dans les articles de Gilles Favre (MAP kinases) et d'Éric Raymond (PI3 kinase).

La durée d'activation est aussi un facteur important déterminant quelles voies de signalisation vont être engagées et quels effets cellulaires vont être obtenus. Pour l'EGFR, l'internalisation dans des vésicules recouvertes de clathrine et l'adressage vers les endosomes semblent être les principaux moyens d'interrompre le signal [8]. L'internalisation et la dégradation consécutive dans les lysosomes sont contrôlées par le recrutement au récepteur activé d'une ubiquitine ligase, la protéine Cbl. Le récepteur est ainsi ubiquitinylé puis dégradé. Certains mutants oncogéniques de l'EGFR ne possèdent plus le site de recrutement pour les protéines Cbl. La formation d'hétérodimères avec ErbB2 entraîne une ubiquitinylation réduite et ces hétérodimères sont internalisés et dégradés plus lentement, potentialisant ainsi les effets prolifératifs. L'inter-

vention de phosphatases encore peu ou non caractérisées à ce jour doit certainement participer aussi à la régulation négative des récepteurs ErbB.

Rôles physiologiques

Au niveau cellulaire, les voies de signalisation activées par les récepteurs ErbB participent à la prolifération, à la migration et à la différenciation de beaucoup de types de cellules. Elles ont aussi un effet anti-apoptotique. La répartition tissulaire des récepteurs ErbB et de leurs ligands, ainsi que des expériences d'inactivation ciblant ces gènes chez la souris (tableau 3), indiquent un rôle très important dans le développement du système cardiovasculaire (ErbB2 en particulier), du système nerveux (ErbB3, ErbB4 et les neurégulines), des glandes mammaires, ainsi que des épithéliums en général [6, 9]. Chez l'adulte, ces récepteurs restent aussi impliqués dans le fonctionnement normal de ces organes et tissus. Ce dernier point est illustré par les effets indésirables des thérapeutiques ciblant ces récepteurs. Le trastuzumab (Herceptin®), anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire d'ErbB2, a une toxicité cardiaque. Les inhibiteurs de l'activité kinase de l'EGFR provoquent souvent des rashes cutanés caractéristiques.

Structure tridimensionnelle

La détermination de la structure des protéines membranaires en général est particulièrement difficile. Si elles représentent environ le tiers des gènes dans les génomes publiés à ce jour, moins de 1 % des structures déposées dans la banque Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) sont des protéines membranaires. Dans le cas des protéines membranaires appelées bitopiques, dont font partie les récepteurs à tyrosine kinase, ce problème est surmonté grâce à l'organisation en domaines indépendants de ce type de protéines, ce qui permet d'établir des structures partielles. Ainsi, pour les récepteurs de la famille ErbB plusieurs structures cristallographiques ont été établies au début des années 1990 : le domaine kinase intracellulaire de l'EGFR complexé ou non avec un inhibiteur, ainsi que les domaines extracellulaires de l'EGFR en présence et en absence de ligand, d'ErbB2 et d'ErbB3 en l'absence de ligand [10].

Les structures cristallographiques de l'ectodomaine de l'EGFR lié à l'EGF ou au TGF α ont confirmé l'implication des domaines I (L1) et III (L2) dans la fixation de ligands. Elles ont surtout révélé l'existence d'interactions directes entre les domaines II (CR1) de chaque monomère, au niveau de ce qui a été baptisé « bras d'interaction ». Contrairement à plusieurs autres récepteurs à activité tyrosine kinase où la nature dimérique du ligand (PDGF par exemple) est responsable de la dimérisation, il n'y a pas d'interactions entre ligands pour l'EGFR. En l'absence de ligand, les structures cristallographiques des ectodomains de l'EGFR et d'ErbB3 ont montré que ce bras de dimérisation est bloqué par l'existence d'interactions entre les domaines II et IV ; on dit que le récepteur adopte alors une configuration « contrainte » ou « fermée » (*tethered*, littéralement « attachée »). C'est la liaison du ligand aux domaines I et III qui libérerait le bras de dimérisation à la suite d'un réarrangement de structure [11].

La structure de l'ectodomaine d'ErbB2 est quant à elle très différente des précédentes. La structure cristallographique révèle l'existence de monomères dont la configuration ressemble à celle de l'état activé de l'EGFR. Il n'y a pas d'interactions entre les domaines II et IV, et le bras de dimérisation

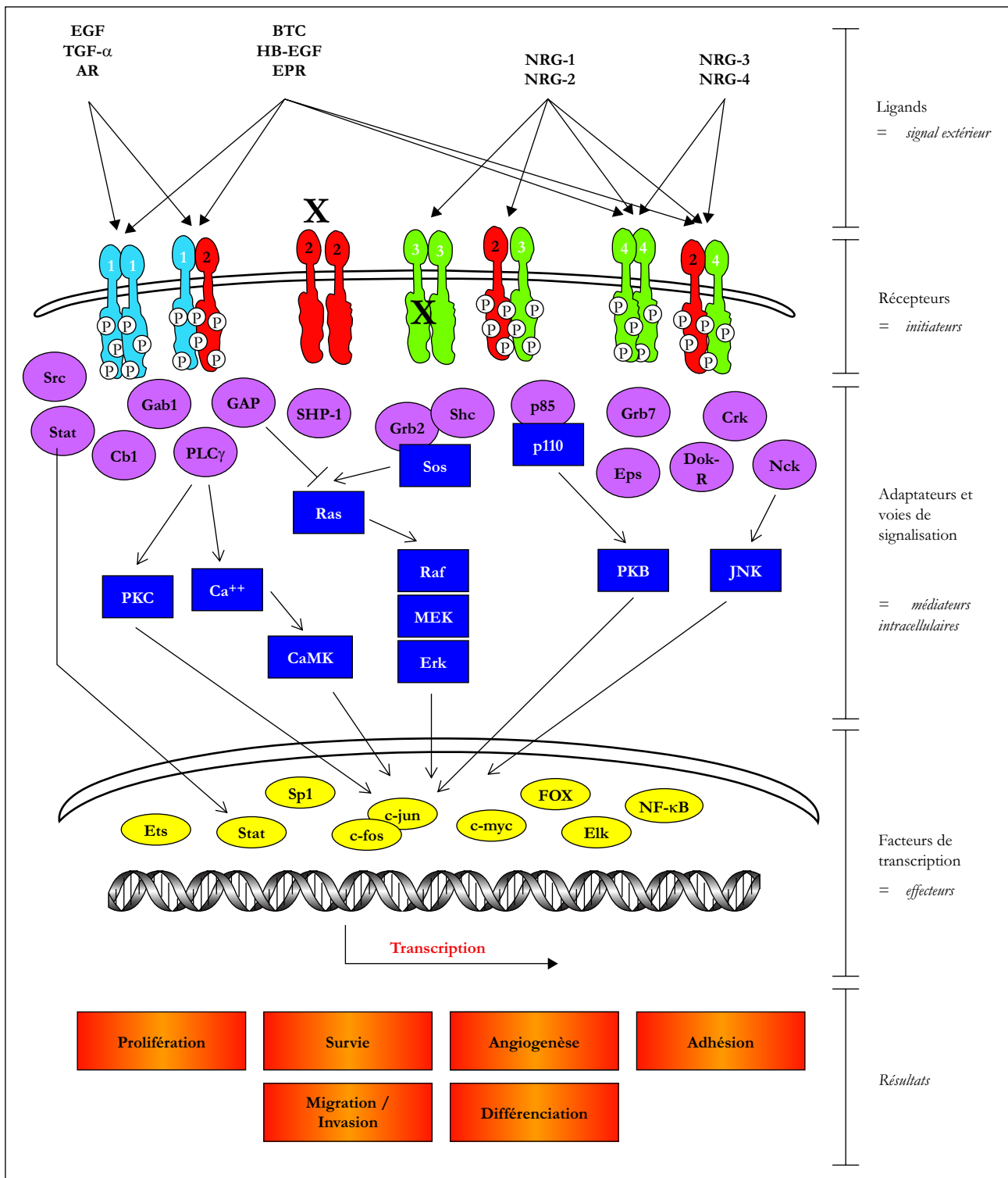


Figure 3. Représentation schématique de la redistribution de l'information au sein du réseau de signalisation des ligands « EGF » et de leurs récepteurs. Les ligands de la famille « EGF » se lient avec plus ou moins de sélectivité aux récepteurs (numérotés de 1 à 4 ; en vert, orange et bleu clair), entraînant la formation de différents dimères. ErbB2 ne possède pas de ligand, et ErbB3 est dépourvu d'activité kinase. Une fois les récepteurs activés et phosphorylés, diverses molécules adaptatrices (Shc, Grb2, p85...) ou dotées d'activité enzymatique (Src, Plc-gamma) sont recrutées (en violet). Elles vont ensuite activer diverses voies de signalisation (entre autres la voie MAP kinase représentée ici par la cascade Ras-Raf-MEK-Erk, où la voie de la PI3-kinase avec la p110 et PKB ; en bleu foncé), ce qui aboutit à l'activation de différents facteurs de transcription (en jaune). Le type et le degré d'activation des voies enclenchées, et donc le résultat final, dépendent à la fois des ligands et des dimères de récepteurs impliqués. Figure reproduite et traduite d'après Holbro et Hynes [6], avec l'aimable autorisation des auteurs et de l'éditeur.

Tableau 3. Modèles de souris transgéniques : quelques exemples

| Inactivation du gène (<i>knock out</i>) | |
|---|---|
| EGF | phénotype normal. |
| TGF α | développement normal, mais anomalies peau et fourrure. |
| Neuréguline | † < E11. Anomalies développement système nerveux et cœur. |
| EGFR | embryons petits à E10-17, retard de développement des épithéliums (yeux, poumons,...), † < 8 jours. |
| ErbB2 | † < E11. Anomalies développement système nerveux et cœur. |
| ErbB3 | † < E13. Anomalies développement système nerveux. |
| ErbB4 | † < E11. Anomalies développement du cœur. |
| Transgénèse | |
| Il existe de nombreux modèles de cancer, en particulier du sein, par surexpression d'Erb-B2. Des <i>knock out</i> conditionnels ont aussi confirmé l'importance des récepteurs ErbB dans le développement du cœur, du muscle et du système nerveux. | |

† : décès

du domaine II est exposé. Cette structure expliquerait pourquoi ErbB2 est le partenaire privilégié des interactions d'hétérodimérisation, puisque sa structure est en quelque sorte « prête » pour interagir avec un autre récepteur en configuration ouverte. De plus, cette structure est effectivement incompatible avec la liaison d'un ligand du fait de l'éloignement des domaines I et III.

La structure du domaine tyrosine kinase de l'EGFR a été déterminée en présence ou non d'un inhibiteur de petite taille, l'erlotinib (Tarceva®). Ce domaine kinase a une structure globale tout à fait comparable à celle de toutes les autres kinases cristallisées (environ une cinquantaine de structures uniques). Il est constitué de deux lobes, l'un, petit, du côté N-terminal qui comprend des feuillettes bêta et une hélice alpha, et l'autre, plus grand, du côté C-terminal qui comprend surtout des hélices alpha. Les deux lobes sont séparés par un sillon où se fixe l'ATP ou ses analogues. Le lobe C-terminal comprend la boucle activatrice qui, pour la plupart des récepteurs à tyrosine kinase, recouvre le sillon ATP en l'absence de ligand, et change de conformation après phosphorylation d'une ou plusieurs tyrosines [12]. Dans le cas de l'EGFR, cette boucle activatrice ne contient qu'une seule tyrosine qui ne semble pas participer au mécanisme d'activation, puisque sa mutation est sans effet. Dans la structure cristalline, cette boucle adopte en fait une conformation similaire à celle de la boucle activatrice phosphorylée du récepteur de l'insuline. La régulation de l'activité kinase semble donc dépendre d'autres mécanismes que l'habituelle phosphorylation de la boucle d'activation, probablement de changements conformationnels consécutifs à la dimérisation [13].

Oncogènes cellulaires

Le récepteur de l'EGF a été le premier récepteur membranaire clairement impliqué dans la cancérogenèse, avec la découverte de son homologie avec l'oncogène vErbB qui code pour une version tronquée et constitutivement active de ce récepteur. On a découvert depuis que les récepteurs ErbB sont

impliqués par différents mécanismes dans beaucoup de cancers humains, en particulier des tumeurs solides. Les altérations observées sont des mutations, des surexpressions (avec ou sans amplification du gène) ou une stimulation anormale par leurs ligands [1, 2].

La mutation la plus fréquemment retrouvée est une délétion du domaine extracellulaire de l'EGFR, appelée type III (vIII, commune dans les glioblastomes), qui provoque une activation de l'activité kinase en l'absence de ligand. La surexpression de l'EGFR, particulièrement lorsqu'elle est associée à une coexpression d'un de ses ligands, est un facteur de mauvais pronostic pour différents cancers. Elle est fréquemment décrite dans les cancers de la tête et du cou, du poumon, du côlon, du pancréas, du rein, etc.

Une mutation activatrice d'ErbB2 a aussi été découverte dans des neuroblastomes chimiquement induits chez le rat. Elle est située dans le domaine transmembranaire et provoque, elle aussi, une activation constitutive de l'activité kinase. Elle n'a jamais été retrouvée dans des cancers humains. L'implication d'ErbB2 dans la cancérogenèse est le fait de sa surexpression, souvent due à une amplification génique. Des surexpressions d'ErbB2 sont décrites dans les cancers du sein et de l'ovaire, des glandes salivaires, de l'estomac, etc.

La surexpression d'ErbB3 a été observée dans des cancers du sein, du côlon, de l'estomac et dans d'autres carcinomes. Son expression avec ErbB2 est, entre autres, un facteur de mauvais pronostic pour les cancers du sein.

Cibles en thérapie anticancéreuse

La fréquence des anomalies des récepteurs ErbB dans de nombreux types de cancer en a fait très tôt l'objet de travaux visant à valider leur ciblage comme nouvelle approche thérapeutique (tableau 2). Le premier succès a été obtenu avec un anticorps monoclonal humanisé, dirigé contre le domaine extracellulaire d'ErbB2, le trastuzumab. Cet anticorps est aujourd'hui utilisé dans le traitement de cancers du sein et fait l'objet d'essais cliniques dans d'autres indications. D'autres anticorps ont été développés depuis (tableau 2a).

Une seconde classe de molécules a aussi connu un très important développement, les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI pour *tyrosine kinase inhibitors*) qui sont des molécules de petite taille et dont le prototype a été le STI571 ou imatinib (Glivec®). Bien que celui-ci ne soit pas un inhibiteur des récepteurs ErbB, il a aujourd'hui pris une valeur paradigmatique. Deux molécules de ce type, inhibitrices de l'EGFR (Iressa® et Tarceva®), sont aujourd'hui approuvées pour le traitement de cancers du poumon.

L'objectif ici n'est pas de recenser les nombreuses molécules déjà disponibles ou en cours d'essais cliniques ou précliniques, mais, plutôt d'essayer de montrer en quoi les connaissances biologiques résumées ci-dessus ont été importantes dans le développement rapide de ces nouveaux agents anticancéreux.

Anticorps

Le trastuzumab a été approuvé en 1998 pour le traitement de cancers du sein métastasés et ErbB2-positifs. Son mécanisme d'action n'est en fait pas entièrement élucidé. Il a certainement des effets cytotoxiques directs, mais il semble aussi être capable de provoquer l'internalisation du récepteur. Néanmoins, toutes les patientes ErbB2-positives ne répondent pas

à ce traitement. Cette résistance pourrait être due à la formation préférentielle d'hétérodimères. Or, les données de structure cristallographique montrent que le trastuzumab se lie au domaine IV de l'ectodomaine d'ErbB2, loin du bras de dimérisation porté par le domaine II. Un autre anticorps, le pertuzumab, qui semble agir dans des modèles cellulaires même en l'absence de surexpression massive d'ErbB2, se lie lui au domaine II, ce qui lui permet d'empêcher l'association d'ErbB2 avec un autre récepteur, bloquant ainsi la signalisation [14]. Ce nouvel anticorps pourrait être aussi utile, voire plus utile en clinique que le trastuzumab, et éventuellement aussi intéressant pour d'autres cancers impliquant l'activation d'ErbB2 sans surexpression franche.

Inhibiteurs de tyrosine kinase

Les enzymes ont toujours été considérés comme des cibles pharmacologiques intéressantes, en particulier pour le développement d'inhibiteurs de petite taille. Néanmoins, la recherche d'inhibiteurs de protéine kinases est un domaine relativement récent, pour un certain nombre de raisons.

Premièrement, on sait depuis longtemps qu'une cellule de mammifère utilise un grand nombre de kinases, qui participent à différentes cascades de signalisation. Les estimations initiales (1 001 kinases) ont été réduites avec la publication du génome humain, qui contient néanmoins plus de 500 kinases. Les alignements des premières séquences disponibles ont révélé une très grande conservation, qui a été confirmée par les premières structures tridimensionnelles. Concevoir des petites molécules présentant des caractéristiques de sélectivité satisfaisantes paraissait alors comme un insurmontable défi. Ce défi a néanmoins été relevé par le groupe d'Alex Levitzki, qui a pu le premier caractériser des petites molécules, appelées tyrphostines, dont certaines montraient une sélectivité d'un facteur 1 000 entre les kinases de l'EGFR et le récepteur de l'insuline [15].

Deuxièmement, la concentration intracellulaire en ATP est élevée (2-10 mM), donc des inhibiteurs purement ATP-compétitifs devraient avoir peu de chance d'être efficaces. En fait, beaucoup des inhibiteurs étudiés sont compétitifs vis-à-vis de l'ATP et possèdent néanmoins des profils d'affinité et de sélectivité intéressants [16]. Des explications structurales ont été trouvées à ce paradoxe : les structures connues de domaines kinases ont révélé que l'ATP n'occupe pas entièrement le sillon entre les deux lobes de ce domaine. Il existe dans cette région des poches hydrophobes, variables entre différentes kinases, et leur occupation par des inhibiteurs sélectifs a été effectivement observée [16].

Contrairement aux prédictions, le développement d'inhibiteurs de protéine kinases est devenu ces dix dernières années une priorité pour beaucoup de laboratoires. Beaucoup de molécules de ce type, ciblant la famille ErbB, en sont à différents stades d'essais cliniques ou approuvés (tableau 2). De plus le cancer n'est pas le seul champ thérapeutique de ces inhibiteurs. La rapamycine est un immunosuppresseur approuvé en 1999 qui inhibe mTOR, une kinase cytoplasmique qui ont participé à la voie de la PI3 kinase et qui est aussi une cible potentielle dans le cancer. D'autres inhibiteurs de kinase sont étudiés ou utilisés dans le vasospasme cérébral, la rétinopathie, l'arthrite rhumatoïde, etc. Ces développements récents ont été décrits dans une revue de Philip Cohen qui propose que les protéine kinases pourraient devenir les cibles majeures des médicaments pour le XXI^e siècle [17].

Enfin, il faut noter que la nécessité pour la sélectivité de ces inhibiteurs de petite taille est un critère relatif. L'exemple de l'imatinib est particulièrement frappant, puisqu'il avait été initialement décrit comme inhibant Abl et le récepteur du PDGF. Plus tard, son pouvoir inhibiteur de Kit a été découvert et il est aujourd'hui approuvé pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique (inhibition d'Abl) et de tumeurs stromales (inhibition de Kit). De plus, on dispose déjà de molécules ciblant plusieurs kinases de la famille ErbB, comme l'EGFR et ErbB2 (cas du lapatinib, de l'EKB56 et du canertinib), ou encore les récepteurs ErbB et le récepteur du facteur de croissance vasculaire (VEGFR, cas de l'AEE788), impliqué dans la néovascularisation tumorale. De tels inhibiteurs sont actuellement en cours d'essais cliniques et devraient se montrer très efficaces, si leur toxicité reste faible (tableau 2).

Autres possibilités

Vu la complexité des mécanismes d'activation des récepteurs ErbB et de leurs voies de signalisation, il existe d'autres possibilités d'interventions pharmacologiques visant à atténuer les effets de leur surexpression ou suractivation. Celles-ci en sont à divers stades de recherche préclinique et sont résumées de façon très schématique dans la figure 4.

Perspectives et questions en suspens

Peut-on considérer que les récepteurs de la famille ErbB sont des cibles idéales et que les anticorps et inhibiteurs de kinases deviendront les traitements « magiques » des tumeurs solides ? Certainement pas. Les récepteurs ErbB ne sont pas les seuls oncogènes pouvant être ciblés ; les recherches concernant d'autres kinases membranaires ou cytoplasmiques, d'autres éléments des voies de signalisation comme la protéine G Ras, p53, la réparation de l'ADN, etc. sont aussi très actives. Néanmoins, les connaissances accumulées sur la biologie moléculaire, cellulaire et structurale de ces récepteurs, ainsi que sur leurs dérèglements dans les cancers, expliquent qu'ils soient aujourd'hui à la pointe des recherches de nouveaux traitements anticancéreux. De plus, la possibilité de combiner diverses approches ciblant différents produits d'oncogènes, et/ou de les combiner avec des chimiothérapies classiques, représente aussi une piste prometteuse.

Malgré le peu de recul, des résistances à ces traitements ciblés sont déjà apparues. Leurs mécanismes peuvent être classiques, comme l'activation des pompes de type MDR (*multidrug resistance*). Un autre mécanisme de résistance a été mis en évidence, en premier lieu pour la kinase Abl. Certains patients leucémiques traités par l'imatinib rechutent brutalement et cette rechute est liée à l'apparition de mutations du domaine kinase d'Abl. Grâce à l'analyse structurale du domaine kinase d'Abl, on a pu comprendre les effets des mutations observées et chercher des inhibiteurs de seconde génération, actifs vis-à-vis des kinases mutées [18]. Des mutations similaires ont depuis été découvertes pour l'EGFR et ErbB2. Dans le cas de l'EGFR, ces mutations expliquent que seule une fraction de cancers du poumon réponde au traitement par le gefitinib (Iressa[®]) [19]. Il faudra attendre pour savoir si de telles mutations existent aussi pour les autres récepteurs de la famille ErbB, et en quoi leur caractérisation sera utile pour la sélection des molécules adaptées à chaque

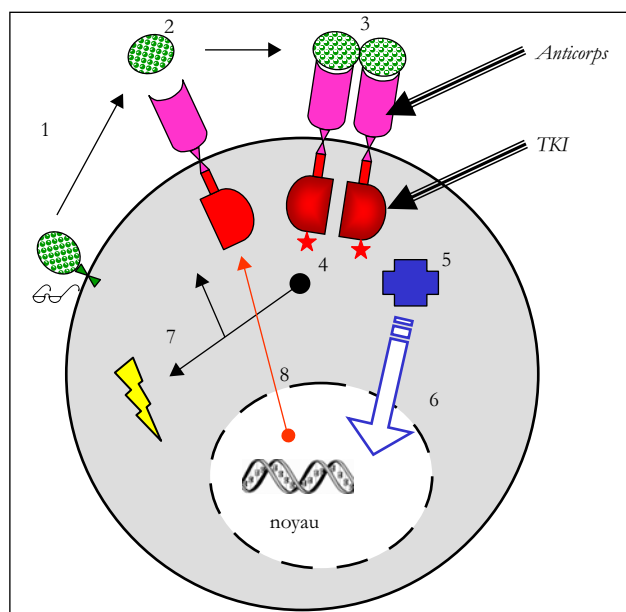


Figure 4. Les récepteurs ErbB en tant que cibles « multi-sites ». Toutes les étapes de l'activation des récepteurs ErbB pourraient être l'objet d'interventions pharmacologiques. Les deux classes de molécules les plus développées, et déjà utilisées en clinique, sont les anticorps qui, en se liant à la partie extracellulaire du récepteur, vont interférer avec sa dimérisation (étape 3) mais aussi entraîner son internalisation (étape 7), et les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) qui inhibent l'activité kinase des récepteurs (étape 4). Les autres possibilités en sont à divers stades de recherche fondamentale : l'inhibition de l'activité protéolytique responsable de la libération des facteurs de croissance « EGF » pourrait diminuer la stimulation autocrine ou paracrine des récepteurs (étape 1). La conception d'antagonistes ou d'anticorps anti-ligands diminuerait l'activation ligand-dépendante des récepteurs (étape 2). En sus des anticorps, la dimérisation des récepteurs (étape 3) pourrait être empêchée par des peptides ou peptidomimétiques semblables au bras de dimérisation du domaine II, ou à d'autres domaines comme l'hélice transmembranaire impliqués dans cette dimérisation. Les interactions de type SH2 ou PTB pourraient aussi être inhibées par des peptides ou peptidomimétiques (étape 5). Pour l'étape 6, l'inactivation de voies de signalisation intracellulaires fait déjà l'objet de recherches très actives. L'internalisation et la dégradation des récepteurs pourrait aussi être activée pharmacologiquement (étape 7). Enfin, la diminution de la synthèse des récepteurs, par inhibition de la transcription des gènes, est elle aussi envisageable (antisens, siRNAs, étape 8).

patient. L'existence de ces mutations pourrait aussi aboutir à l'utilisation simultanée de plusieurs inhibiteurs, de structure différente, ciblant la même kinase.

La sélection des patients pouvant bénéficier de tel ou tel traitement ciblé devrait pouvoir reposer sur la détection d'anomalies au niveau de la cible. D'autres facteurs que les mutations évoquées ci-dessus sont certainement à prendre en considération. On sait que la démonstration d'une surexpression d'ErbB2 ne suffit pas à garantir une réponse au trastuzumab dans les cancers du sein. De même, le statut de l'EGFR n'a pas toujours de valeur pronostique quant à la sensibilité d'une tumeur aux molécules, anticorps ou inhibiteurs de kinase, ciblant ce récepteur. Très probablement, la diversité des mécanismes d'activation évoqués ci-dessus fait que la seule mise en évidence d'une surexpression de l'EGFR ne rend pas compte de l'activation réelle des voies de signalisation. L'analyse du degré d'activation de ces voies serait peut-être un meilleur prédicteur de sensibilité et pourrait se

faire par exemple à l'aide d'anticorps antiphosphotyrosine, ou spécifiques des récepteurs phosphorylés. Les progrès de l'imagerie de fluorescence permettent l'analyse quantitative de la phosphorylation de l'EGFR dans des tissus [20]. ▼

RÉFÉRENCES

La bibliographie sur les récepteurs de la famille ErbB est singulièrement pléthorique (une recherche dans PubMed (<http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>) avec les mots clés du MESH retrouve par exemple 1 815 publications dont 272 revues pour la seule année 2004!). Cette sélection est donc stricte et nécessairement subjective, privilégiant des articles de synthèse récents.

- Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases : targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004 ; 4 : 361-70.
- Holbro T, Civenni G, Hynes N. The Erb-B receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 2003 ; 284 : 99-110.
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000 ; 103 : 211-25.
- Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001 ; 411 : 355-65.
- Bennasroune A, Gardin A, Aunis D, Cremel G, Hubert P. Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004 ; 50 : 23-38.
- Holbro T, Hynes N. Erb-B receptors : directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004 ; 44 : 195-217.
- Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the Erb-B signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 ; 2 : 127-37.
- Peschard P, Park M. Escape from Cbl-mediated downregulation : a recurrent theme for oncogenic deregulation of receptor tyrosine kinases. *Cancer Cell* 2003 ; 3 : 519-23.
- Casalini P, Iorio M, Galmozzi E, Ménard S. Role of HER receptors family in development and differentiation. *J Cell Physiol* 2004 ; 200 : 343-50.
- Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/Erb-B receptors. *Mol Cell* 2003 ; 12 : 541-52.
- Ferguson K. Active and inactive conformations of the epidermal growth factor receptor. *Biochem Soc Trans* 2004 ; 32 : 742-5.
- Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* 2000 ; 69 : 373-98.
- Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor : mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 2003 ; 284 : 31-53.
- Franklin MC, Carey KD, Vajdos FF, Leahy DJ, de Vos AM, Sliwkowski MX. Insights into Erb-B signaling from the structure of the Erb-B2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* 2004 ; 5 : 317-28.
- Yaish P, Gazit A, Gilon C, Levitzki A. Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors. *Science* 1988 ; 242 : 933-5.
- Scapin G. Structural biology in drug design : selective protein kinase inhibitors. *Drug Discov Today* 2002 ; 7 : 601-11.
- Cohen P. Protein kinases: the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* 2002 ; 1 : 309-15.
- Daub H, Specht K, Ullrich A. Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2004 ; 3 : 1001-10.
- Dancey JE. Predictive factors for epidermal growth factor receptor inhibitors : the bull's-eye hits the arrow. *Cancer Cell* 2004 ; 5 : 411-5.
- Keese M, Magdeburg RJ, Herzog T, Hasenberg T, Offerdinger M, Pepperkok R, et al. Imaging epidermal growth factor receptor phosphorylation in human colorectal cancer cells and human tissues. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 27826-31.