

# Le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) : un modèle de régulation d'expression génique et un marqueur d'agressivité tumorale. Une cible thérapeutique évidente ?

Renaud Grépin et Gilles Pagès

Institut Biologie du Développement et Cancer, UMR CNRS 6543, Université de Nice Sophia Antipolis, Centre Antoine Lacassagne, 33 avenue de Valombrose, 06189 Nice, France

Auteur correspondant : Dr Gilles Pagès : [gpages@unice.fr](mailto:gpages@unice.fr)

Reçu le 5 novembre 2008

**Résumé** – Le VEGF constitue un modèle de régulation d'expression génique. Les voies de signalisation RAS/RAF/MEK ERK et PI3 Kinase induites par des facteurs de croissance ou des oncogènes contribuent à son expression notamment en activant des facteurs de transcription requis pour la transcription de son gène mais aussi en inactivant des protéines impliquées dans la dégradation de son ARNm. Ces facteurs (Sp1/Sp3, HIF-1 et TTP) constituent des marqueurs moléculaires de l'agressivité tumorale. Le VEGF est surexprimé dans un grand nombre de tumeurs solides et hématologiques. Ainsi de nombreux composés régulant l'angiogenèse en ciblant le VEGF et/ou ses récepteurs ont vu le jour. Cependant leur effet n'est pas aussi spectaculaire que prévu. La présence de formes anti-angiogéniques du VEGF pourrait en être partiellement la cause. Ces différents points sont discutés dans cet article de revue.

**Mots clés** : Angiogenèse / thérapie ciblée / VEGF / voie de signalisation ERK

**Abstract** – The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF): a model of gene regulation and a marker of tumour aggressiveness. An obvious therapeutic target?

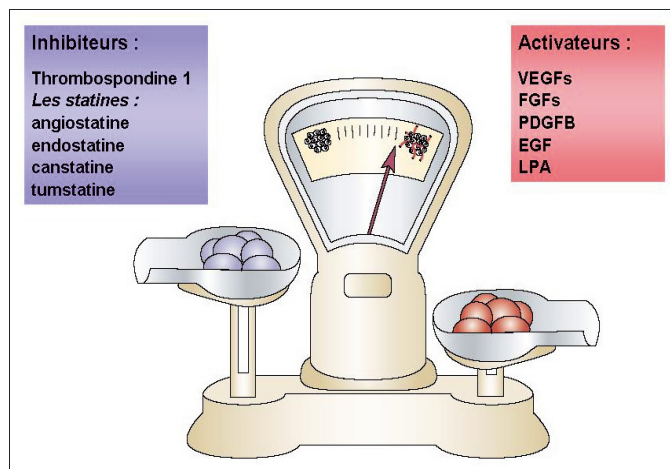
VEGF represents a model of gene expression regulation. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3 Kinase pathways, activated in response to growth factors stimulation or by oncogenes, contribute to its expression by activating transcription factors or inactivating proteins implicated in degradation of its mRNA. These factors (Sp1/Sp3, HIF-1 and TTP) constitute molecular markers of tumor aggressiveness. VEGF is overexpressed in solid or hematologic tumors. Thus, numerous compounds regulating angiogenesis by targeting VEGF have been developed. However, their effects are not as spectacular as expected. The existence of anti-angiogenic isoforms of VEGF could be a cause of their less potent activity. These different points are discussed in this review article.

**Key words**: Angiogenesis / targeted therapy / VEGF / ERK signalisation pathway

## Introduction

Les vaisseaux sanguins sont présents dans tous les organes du corps, fournissant l'oxygène et les nutriments nécessaires aux cellules pour survivre et fonctionner, et permettant l'élimination des déchets métaboliques et du CO<sub>2</sub>. Dans les embryons des organismes vertébrés, le système cardiovasculaire est le premier organe fonctionnel à se mettre en place. Les premiers

vaisseaux sanguins sont formés par différenciation *in situ* des précurseurs des cellules endothéliales, appelés angioblastes. Ce processus est nommé **vasculogénèse**. Longtemps considérée comme restreinte aux étapes précoces de l'embryogenèse, il apparaît désormais que la vasculogénèse intervient également dans la formation des vaisseaux sanguins chez l'adulte, compte tenu de l'existence de cellules progénitrices capables de se différencier en cellules endothéliales.



**Fig. 1.** La balance angiogénique : équilibre / déséquilibre entre facteurs pro- et anti-angiogéniques (d'après Bergers G. et Benjamin L.E., 2003, *Nature Reviews Cancer* ; vol. 3, p. 401-410).

**Tableau 1.** Les différentes pathologies caractérisées ou causées par une angiogénèse anormale ou excessive (d'après Carmeliet P., 2003, *Nature Medicine* ; vol. 9, p. 653-660).

Organe	Pathologies chez la souris ou l'homme
Nombreux organes	Cancers
	Maladies infectieuses
	Désordres auto-immuns
Vaisseaux sanguins	Malformations vasculaires, syndrome de Di George
	Télangiectasie hémorragique héréditaire
	Hémangiome carverneux, athérosclérose, artériopathies
Tissus adipeux	Obésité
Peau	Psoriasis, verrues, dermatite allergique, cicatrice chéloïde, granulome pyogénique
	Sarcome de Kaposi chez les patients atteints du SIDA
Œil	Syndrome vitreux hyperplasique persistant
	Rétinopathie diabétique, rétinopathie du prématuré
	Néovascularisation chororéidienne
Poumon	Hypertension pulmonaire primaire, asthme, polypes nasaux
Intestin	Maladies inflammatoires de l'intestin, ascites
	Adhérences péritonéales
Système reproducteur	Endométriose, saignements utérins, kystes ovariens, hyperstimulation ovarienne
Os, articulations	Arthrite, synovite, ostéomyélite, formation ostéophytique

Durant la vasculogénèse embryonnaire, un plexus vasculaire primitif se forme et servira par la suite « d'échafaudage » au processus d'**angiogénèse**, au cours duquel de nouveaux vaisseaux sanguins se formeront à partir des vaisseaux préexistants. Dans des conditions normales, l'angiogénèse est un processus rigoureusement contrôlé, puisqu'il permet à des cellules quiescentes de se diviser et d'étendre le réseau vasculaire uniquement dans les proportions requises à la croissance des tissus demandeurs. En fait, l'état fonctionnel et prolifératif des vaisseaux sanguins est déterminé par une balance entre des facteurs pro- et anti-angiogéniques (Figure 1) (Hanahan & Folkman, 1996). À l'état quiescent la balance entre activa-

teurs et inhibiteurs est à l'équilibre. Toute rupture dans cet équilibre peut conduire à une situation pathologique. On parle alors d'**angiogénèse pathologique**. La rupture de l'équilibre en faveur des facteurs pro-angiogéniques, ou « *switch* angiogénique », aboutit à l'établissement d'un excès de vascularisation. Ce dernier est à l'origine de nombreuses pathologies, dont les plus connues sont le cancer, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la rétinopathie diabétique ou encore le sarcome de Kaposi associé au SIDA. Viennent également s'ajouter des désordres tels que l'obésité, l'asthme, l'athérosclérose et certaines maladies infectieuses. L'ensemble de ces désordres est présenté dans le tableau 1. Différents signaux sont

à l'origine du *switch* angiogénique : (i) le stress métabolique (hypoxie, hypoglycémie, acidose, radicaux libres) ; (ii) le stress mécanique (pression induite par les cellules en prolifération) ; (iii) les réponses inflammatoires et immunes, ainsi que (iiii) les mutations génétiques (activations d'oncogènes, délétions de gènes suppresseurs de tumeur contrôlant la production de régulateurs angiogéniques) (Kerbel, 2000). L'élucidation des mécanismes conduisant à la mise en place d'une angiogenèse pathologique est capitale afin de concevoir des approches thérapeutiques inhibitrices ou stimulatrices de l'angiogenèse. De nombreuses études ont été menées dans ce sens, et plus particulièrement dans le cas de la vascularisation associée à la progression tumorale. Durant l'angiogenèse physiologique, les nouveaux vaisseaux deviennent rapidement matures et stables, les cellules endothéliales ayant établi des contacts avec les cellules de soutien ainsi qu'avec la matrice extra-cellulaire. Au contraire, les tumeurs – décrites comme « des blessures qui ne se referment jamais » (Dvorak, 1986) – ont perdu le juste équilibre entre signaux activateurs et inhibiteurs. Une des particularités des vaisseaux sanguins tumoraux est leur échec à devenir quiescents, induisant ainsi leur constante croissance. La vasculature tumorale présente alors des caractéristiques propres, bien distinctes de la vasculature normale. Les vaisseaux tumoraux sont désorganisés, tortueux et dilatés, de diamètre irrégulier et présentant une ramification excessive. Par conséquent, le flux sanguin est chaotique et variable, ce qui entraîne des régions hypoxiques et acides dans les tumeurs qui peuvent alors diminuer l'efficacité de traitements anti-cancéreux (Jain, 2008). Les vaisseaux tumoraux ne sont pas organisés en veines, artérioles et capillaires comme le sont leurs homologues normaux. Le réseau vasculaire tumoral est souvent perméable et hémorragique, en partie à cause de la surproduction de VEGF (aussi connu sous le nom de VPF, *Vascular Permeability Factor*). Étant donné son importance dans les processus de vascularisation tumorale cette revue sera dédiée aux mécanismes contrôlant son expression. Nous décrirons également son rôle en tant que facteur pronostic d'agressivité tumorale ainsi que les outils thérapeutiques destinés à bloquer son action.

## Mécanismes de régulation de l'expression de VEGF

Le VEGF représente un paradigme de régulation d'expression puisque son expression est régulée à tous les niveaux possibles : transcription, stabilité de l'ARN, traduction. Une liste exhaustive de ces régulations déborderait largement du contexte de cette revue. Nous nous concentrerons donc sur les phénomènes

de transcription et de stabilité de l'ARNm et le lien existant entre ces mécanismes et l'activation de voies de signalisation majeures impliquées dans le développement tumoral.

### a) Le gène VEGF et son promoteur

Le gène VEGF est organisé en 8 exons et 7 introns sur une région d'environ 14 kb du chromosome 6p21.3 chez l'Homme. Ce gène a été cloné chez plusieurs espèces dont la souris et le rat. La majorité des éléments de régulation de ce promoteur ont été découverts dans un domaine de 2,362 kb en amont du site d'initiation de la transcription. Le promoteur VEGF ne contient pas de TATA box consensus mais contient de nombreux éléments régulateurs fonctionnels notamment pour la liaison des facteurs Sp1, Sp3, AP-2, Egr-1, STAT-3 et HIF-1. Le promoteur du gène de souris contient un élément de réponse au facteur NF $\kappa$ B mais ce dernier est absent des promoteurs humain et de rat. Récemment, un nouveau promoteur cryptique a été découvert. Ce dernier est présent dans une région du gène originellement décrite comme faisant partie du 5'UTR de l'ARNm du VEGF. Le nouveau site d'initiation de la transcription est situé 632 paires de bases en aval du site d'initiation de transcription classique. De manière intéressante, ce promoteur n'est pas régulé par l'hypoxie, condition expérimentale conduisant à une activation du promoteur canonique.

### b) La séquence 3' non codante de l'ARNm VEGF

La majorité des ARNm possèdent une extrémité 3' non codante relativement courte. De plus, l'étude de cette zone non traduite montre peu de similitudes inter-espèces. Ce domaine 3'UTR dans le cas du VEGF est plus long que la région codante (2 kb contre 0,5 kb) et présente de fortes similitudes inter-espèces en termes de séquence primaire mais aussi en termes de structures tridimensionnelles. Ceci sous-entend la conservation de régions régulatrices importantes au cours de l'évolution. Des souris chez lesquelles le gène de la  $\beta$ -galactosidase a été introduit dans le domaine correspondant au 3'UTR de l'ARNm meurent au cours du développement embryonnaire de défauts cardiaques liés à une production excessive de VEGF (Miquerol *et al.*, 2000). Ce domaine régulateur important permet une modulation très fine des niveaux d'ARNm VEGF et par conséquent de la protéine évitant une angiogenèse pathologique. Ce domaine de l'ARNm, loin d'être inerte, est donc important pour la physiologie du VEGF.

## Liens entre voies de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK et PI3 Kinase et l'expression de VEGF

L'activation de récepteurs à activité tyrosine kinase (EGF, Yen *et al.*, 2002; insuline, Lu *et al.*, 1999; IGF, Warren *et al.*, 1996; HGF, Zhang *et al.*, 2003a; TGF $\alpha$ ; Gille *et al.*, 1997 et PDGF Finkenzeller *et al.*, 1992) et certains oncogènes induisent la production de VEGF dans des modèles cellulaires de différents organes normaux ou tumoraux. Le dénominateur commun entre oncogènes et facteurs de croissance est l'activation de deux voies de signalisation majeures : les voies RAS/RAF/MEK/ERK et PI3 Kinase. Les liens entre voies de signalisation et production de VEGF ont été établis à la suite d'une observation selon laquelle des cellules transformées par des membres constitutifs actifs de la voie de signalisation ERK expriment des quantités importantes d'ARNm VEGF (Milanini *et al.*, 1998). De plus, l'expression conditionnelle de la MAP Kinase phosphatase 3/Dual Specificity phosphatase 6 dans des cellules transformées par RAS bloque la formation de VEGF et empêche le développement de tumeurs vascularisées chez la souris nude (Marchetti *et al.*, 2004). L'expression de formes constitutives actives de PI3 Kinase induit l'augmentation des niveaux de VEGF dans des cellules ovariennes (Zhang *et al.*, 2003b). Les résultats de Rak *et al.* (2000) tendent à démontrer que la voie de signalisation ERK est importante pour la production de VEGF dans les fibroblastes alors que la voie PI3 Kinase est davantage impliquée pour cette régulation dans le cas des cellules épithéliales. Trois autres situations pathologiques sont caractérisées par une augmentation des niveaux d'ARNm et de protéine VEGF ; i) les cas de leucémies myéloïdes chroniques (LMC) dans lesquels une translocation chromosomique entre les gènes BCR et ABL entraîne une augmentation de l'activité ERK et PI3 Kinase (Aguayo *et al.*, 2000). L'inhibition de ces voies de signalisation par l'Imatinib mesylate normalise les taux de VEGF dans des modèles cellulaires de LMC et chez des patients en rémission cytogénétique (Legros *et al.*, 2004) ; ii) la surexpression de récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF, HER1 ou HER2 s'accompagne aussi d'une activation des voies ERK et PI3 Kinase. Des thérapies ciblées contre ces récepteurs constitutifs actifs ou exprimés à des taux pathologiques (Gefitinib, Erlotinib spécifiques de HER1 et Trastuzumab, un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre HER2, Lapatinib bloquant HER1 et HER2) sont capables de normaliser les taux de VEGF (Press & Lenz, 2007; Izumi *et al.*, 2002) ; iii) l'infection par *Helicobacter pylori* entraîne une augmentation d'activité ERK et des niveaux d'ARNm VEGF et de protéine (Strowski *et al.*, 2004). L'expression accrue de VEGF peut être liée à

plusieurs phénomènes ; l'augmentation de la transcription du gène, la stabilisation de l'ARNm et également la traduction de l'ARNm. Une combinaison de l'ensemble de ces phénomènes peut être également envisageable. Le lien entre voie de signalisation ERK et transcription a été en partie décodé. Les résultats de Milanini *et al.* montrent que la voie de signalisation ERK active le promoteur ERK par l'intermédiaire d'éléments riches en GC proches du site d'initiation de la transcription. Cette zone fixe les facteurs Sp1 et Sp3 dont l'activité de liaison à l'ADN et l'activité transactivatrice sont augmentées suite à une phosphorylation directe par les kinases ERKs. Ces sites de phosphorylation ont été identifiés (Pagès, 2007; Milanini-Mongiat *et al.*, 2002). Une phosphorylation de Sp1 *via* la voie Akt a aussi été suggérée dans le cas de l'augmentation d'expression de VEGF par suite d'une activation des récepteurs de la famille de l'EGF (Pore *et al.*, 2004). Les facteurs Sp ont également été décrits comme des marqueurs d'agressivité tumorale. Ce caractère est probablement lié à leur capacité d'induire une angiogenèse excessive tout au long du développement tumoral (Abdelrahim *et al.*, 2006; Abdelrahim *et al.*, 2004). La transcription du gène du VEGF est également augmentée après une hypoxie *via* le *Hypoxia Inducible Factor* (HIF-1). Cependant facteurs de croissance et hypoxie induisent tous deux l'expression de HIF-1. Ce phénomène est dépendant d'une diminution de dégradation constitutive de HIF-1 $\alpha$  par le protéasome, liée d'une part à une inactivation des proline-hydroxylases spécifiques (Berra *et al.*, 2003) et d'autre part à une phosphorylation directe de HIF-1 $\alpha$  par ERK, ce qui permet son accumulation dans le noyau (Mylonis *et al.*, 2006) et une augmentation de son activité transactivatrice (Richard *et al.*, 1999). Un dernier volet concerne également l'augmentation de la traduction de l'ARNm codant pour HIF-1 $\alpha$  *via* la signalisation dépendant de HER2 (Laughner *et al.*, 2001). Ainsi, facteurs de croissance et hypoxie ont un effet additif sur l'expression de VEGF (Milanini *et al.* 1998) par suite d'une activation transcriptionnelle dépendant de la fixation de HIF-1 sur son élément de réponse (Richard *et al.* 1999). Si la transcription du gène VEGF a été considérablement étudiée, un autre volet de sa régulation encore peu exploité concerne l'étude de la stabilité de son ARNm et le lien pouvant exister entre l'activation de voies de signalisation par des facteurs de croissance ou des oncogènes. Finalement, peu de protéines ont été identifiées comme participant à la régulation de la stabilité de l'ARNm VEGF, HuR (Lévy *et al.*, 1998), hnRNPL (Shih & Claffey, 1999), PAIP2 (Onesto *et al.*, 2004), TIS11b (Ciais *et al.*, 2004) et TTP (Essafi-Benkhadir *et al.*, 2007). Seules les protéines TTP (Cao *et al.*, 2006) et HuR (Doller *et al.*, 2008; Doller *et al.*, 2007) ont été décrites comme des phospho-protéines,

**Tableau 2.** Lien signalé entre VEGF et agressivité tumorale dans différents types de cancers.

Cancer	Référence
Ovaire	(Yamamoto <i>et al.</i> , 1997)
Astrocytes	(Abdulrauf <i>et al.</i> , 1998)
Colon	(Ishigami <i>et al.</i> , 1998)
Rein	(Jacobsen <i>et al.</i> , 2000)
Pancréas	(Seo <i>et al.</i> , 2000)
Leucémie aiguë	(Aguayo <i>et al.</i> , 2000)
Sein	(Foekens <i>et al.</i> , 2001)
Leucémie myéloïde chronique	(Legros <i>et al.</i> , 2004)
Poumon	(Yuan <i>et al.</i> , 2005)
Mélanome	(Pelletier <i>et al.</i> , 2005)
Tête et cou	(Onesto <i>et al.</i> , 2006)

événements de phosphorylation pouvant modifier leur activité. TTP et TIS11b faisant partie de la même famille, des zones de phosphorylation conservées entre ces deux protéines pourraient cependant exister. Les voies de signalisation ERK et PI3 Kinase ont été impliquées dans la régulation de l'activité « dégradatrice des ARNm » de TTP (Essafi-Benkhadir *et al.* 2007; Marderosian *et al.*, 2006) alors qu'il s'agit plutôt de PKC normales ou atypiques agissant dans le cas de HuR. Alors que HuR a été décrit comme un marqueur d'agressivité tumorale dans les cancers du colon entre autres, cancers dans lesquels des mutations de la voie RAS/RAF/MEK/ERK ont été rapportées (Lopez de Silanes *et al.*, 2003), seul le rôle de TTP dans les processus inflammatoires avait été décrit jusqu'alors (Katsanou *et al.*, 2006). TTP est aussi capable d'induire une réversion du phénotype tumoral de cellules transformées par l'oncogène Ras par un défaut de production de VEGF et d'angiogenèse (Essafi-Benkhadir *et al.* 2007; Stoecklin *et al.*, 2003). Ceci établit un lien direct entre protéines « stabilisatrices ou dégradatrices » des ARNm, voies de signalisation et angiogenèse tumorale.

### Le VEGF en tant que marqueur d'agressivité tumorale

Le VEGF apparaît comme l'un des facteurs pro-angiogéniques les plus importants dès que la taille de la tumeur dépasse 1 à 2 mm. Au-dessous de cette taille les éléments nutritifs et l'oxygène parviennent aux cellules tumorales par simple diffusion (Bergers & Benjamin, 2003). Le tableau 2 dresse une liste qui se veut indicatrice mais non exhaustive du lien qui existe entre différents types de cancer et la survie (Dvorak, 2002; Toi *et al.*, 2001). De manière intéressante, le VEGF est décrit comme un marqueur d'agressivité tumorale aussi bien dans les tumeurs solides que dans les tumeurs hématologiques.

### Présence de récepteurs du VEGF sur des cellules tumorales : un effet pro-angiogénique « à deux étages »

Si l'effet paracrine du VEGF sur ses cibles dédiées que sont les cellules endothéliales a été très bien décrit, un nouveau concept d'« entretien autocrine de l'angiogenèse » apparaît de plus en plus clairement. Cette nouvelle hypothèse provient de l'observation suivante : les cellules tumorales expriment également les récepteurs du VEGF, VEGF-R1 et VEGF-R2 (Ferrara & Kerbel, 2005) et également ses co-récepteurs Neuropiline 1 et 2 (NRP1, 2) et ce dans différents types de tumeurs (Klagsbrun & Eichmann, 2005). La fixation du VEGF à ses récepteurs à activité tyrosine kinase induit l'activation des voies de signalisation décrites ci-dessus (ERK et PI3 Kinase). L'activation de ces récepteurs induit la migration et la prolifération des cellules endothéliales, étapes observées lors de l'angiogenèse. L'effet autocrine de cette stimulation peut également promouvoir la survie des cellules tumorales mais également le maintien de l'expression de VEGF ou d'autres facteurs pro-angiogéniques.

### VEGF<sub>165</sub> et VEGF<sub>165b</sub> : deux frères ennemis

L'ARN pré-messager du VEGF est organisé en huit exons. L'épissage alternatif de cet ARN pré-messager conduit à six isoformes d'ARNm codant pour six formes de VEGF dont la prédominante est le VEGF<sub>165</sub> (Neufeld *et al.*, 1999). En 2002 un nouveau variant d'épissage a été identifié. Seul le domaine correspondant au 8<sup>e</sup> exon diffère entre les deux ARN messagers (18 nucléotides). La traduction de ce nouveau variant d'épissage conduit à une forme de VEGF appelée VEGF<sub>165b</sub>. VEGF<sub>165</sub> et VEGF<sub>165b</sub> ne diffèrent que de six acides aminés situés côté C-terminal (VEGF<sub>165</sub> : Cys-Asp-Lys-Pro-Arg-Arg et VEGF<sub>165b</sub> : Ser-Leu-Thr-Arg-Lys-Asp). Ces deux isoformes peuvent se lier avec la même affinité aux récepteurs du VEGF. Par contre, la forme VEGF<sub>165b</sub> n'active pas les voies de signalisation dépendantes du VEGF-R2. Le VEGF<sub>165b</sub> est capable d'inhiber la prolifération et la migration des cellules endothéliales induites par le VEGF<sub>165</sub>. La forme VEGF<sub>165</sub> est une forme pro-angiogénique sur-exprimée dans les tumeurs alors que la forme VEGF<sub>165b</sub>, initialement découverte dans le rein, est anti-angiogénique et sous-exprimée au niveau des tumeurs (Bates *et al.*, 2002; Woolard *et al.*, 2004). De plus, la proportion de VEGF<sub>165b</sub> par rapport au VEGF<sub>165</sub> varie suivant les tissus ; elle peut aller de 1 % dans le placenta (Perrin *et al.*, 2005) à 90 % dans le colon normal (Varey *et al.*, 2008).

**Tableau 3.** Comparaison des taux de réponse et des survies sans progression de thérapies anti-VEGF, en essais cliniques de phase III, par rapport aux traitements classiques (*Traduit d'après Lee M. Ellis and Daniel J. Hicklin, Nature Reviews 2008.*)

Essai clinique	Type de cancer	Ligne de traitement	% augmentation taux de réponse lors traitement anti-VEGF adjuvant	Nombre de mois gagnés de survie sans progression
Capecitabine +/- BEV*	Sein métastatique	Réfractaire	10	0,7
Paclitaxel +/- BEV	Sein métastatique	1 <sup>re</sup> ligne	22	5,9
Docetaxel +/- BEV	Sein métastatique	1 <sup>re</sup> ligne	11	0,7-0,8
Carboplatine +/- BEV	NSCLC	1 <sup>re</sup> ligne	15	1,9
Gemcitabine+cisplatine +/- BEV	NSCLC	1 <sup>re</sup> ligne	10-14	0,4-0,6
Xelox+FOLFOX +/- BEV	CRC métastatique	1 <sup>re</sup> ligne	0	1,4
IFL +/- BEV	CRC métastatique	1 <sup>re</sup> ligne	10	4,4
FOLFOX +/- BEV	CRC métastatique	1 <sup>re</sup> ligne	14	2,6
Interféron +/- BEV*	RCC	1 <sup>re</sup> ligne	18	4,8
Sorafenib versus placebo	RCC	Réfractaire	5.4	2,7
Sunitinib versus interféron	RCC	1 <sup>re</sup> ligne	31	5,9

\* Varie suivant les essais, augmentation taux de réponse et survie sans progression typique. BEV, bevacizumab ; CRC, cancer colorectal ; FOLFOX, acide folinique, fluorouracil, oxaliplatine ; NSCLC, cancer bronchique non à petites cellules ; RCC, cancer du rein ; XELOX, capecitabine (Xeloda) et oxaliplatine ; IFL, 5 Fluorouracile/LV + irinotecan.

## Développement de thérapies anti-angiogéniques

Différentes stratégies ont été développées afin de bloquer l'action du VEGF. La première ayant montré un intérêt évident dans le cas des cancers du colon, du sein, du rein à cellules claires et du cancer bronchique non à petites cellules est le bévacizumab, un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF (Pivot, 2007 ; Escudier *et al.*, 2007 ; Sandler *et al.*, 2006 ; Hurwitz *et al.*, 2004). Deux autres stratégies ont été développées : des inhibiteurs de tyrosine kinase capables de bloquer la signalisation des récepteurs aux VEGF ou le VEGF-Trap.

### a) Le bévacizumab : un anticorps monoclonal humanisé ciblant le VEGF

Le bévacizumab (Avastin®) est dirigé contre les différentes isoformes du VEGF-A. En piégeant le VEGF, cet anticorps de forte affinité (Kd  $\approx$  0,5 nM) (Presta *et al.*, 1997) prévient la liaison de ce facteur de croissance à ses récepteurs, ce qui empêche l'activation des voies de signalisation des VEGFR. *In vivo*, après injection de cellules tumorales (13 lignées différentes testées dont des glioblastomes, carcinomes pancréatiques, carcinomes mammaires, adénocarcinomes du colon, hépatoblastomes,

neuroblastomes) à des souris ou des rats, les traitements au bévacizumab inhibent la croissance tumorale (Gerber & Ferrara, 2005). Le bévacizumab est le premier traitement anti-angiogénique approuvé en 2004 par la FDA (*Food and Drug Administration*), en association avec des chimiothérapies classiques. Il est utilisé depuis en première et seconde lignes dans le traitement du cancer colorectal métastatique couplé avec une chimiothérapie comprenant une fluoropyrimidine (mCRC). Le bévacizumab est également employé en première ligne pour le cancer bronchique non à petites cellules, en association avec une chimiothérapie à base de platine (octobre 2006), le cancer du sein métastatique couplé avec du paclitaxel (août 2007) et les carcinomes rénaux à un stade avancé ou métastatiques en association avec l'interféron- $\alpha$  (décembre 2007). Cet anticorps monoclonal (demi-vie sérique d'une vingtaine de jours) est administré tous les 14 jours en combinaison avec une chimiothérapie classique (Hurwitz *et al.*, 2004). Il permet d'augmenter les effets des chimiothérapies (Borgstrom *et al.*, 1999 ; Fox *et al.*, 2002). Les taux de réponse, par rapport aux traitements classiques seuls, sont accrus tout comme la survie sans progression des patients (tableau 3). Par exemple, dans le cadre des traitements du cancer du rein métastatique, la médiane de survie sans progression passe de 2,8 mois avec le placebo, à 5,4 mois lors des traitements avec de l'interféron- $\alpha$  et à 8,5 mois pour les traitements

**Tableau 4.** Agents anti-angiogéniques en phase de développement clinique.

Drogue	Cible(s)	Phase de développement	Effets secondaires
<b>Anticorps monoclonal</b>			
Bevacizumab (Avastin <sup>®</sup> , Genentech)	VEGF-A	Approuvé pour les NSCLC avancés et les CRC avancés ; phase II SCLC en cours	Hypertension, protéinurie, hémorragies, thrombo-embolie artérielle.
<b>Inhibiteurs récepteurs à activité tyrosine kinase</b>			
SU11248 (Sutent <sup>®</sup> , Sunitinib <sup>®</sup> , Pfizer)	VEGFR-1-3, PDGFR, c-kit, FLT-3	Approuvé pour RCC et GIST métastatiques ; phase II NSCLC en cours	Fatigue, asthénie, rash, jaunissement ou décoloration de la peau, neutropénie, hypertension, stomatites
PTK787 (Vatalanib <sup>®</sup> , Novartis)	VEGFR-1-3, PDGFR- $\beta$ , c-kit, cFms	Phase II NSCLC	Fatigue, nausées/vomissements, vertiges, hypertension, ataxie, dyspnée
ZD6474 (Zactima <sup>®</sup> , Astra-Zeneca)	VEGFR-2, EGFR	Phase II/III NSCLC	Diarrhée, rougeurs, hypertension, protéinurie, prolongation QTc, transaminases
AZD2171 (Astra-Zeneca)	VEGF-1-3	Phase II/III NSCLC	Fatigue, nausées/vomissements, diarrhée, douleurs abdominales, hémorragies, hypoglycémie, hypertension
BAY 93-4006 (Sorafenib <sup>®</sup> , Bayer)	Raf-1, VEGFR-2, -3, PDGFR, c-kit	Approuvé pour RCC métastatique ; phase II NSCLC en cours	Fatigue, diarrhée, transaminases, toxicité cutanée, hypertension
GW-786034 (Glaxo-Smith-Kline)	VEGFR-1-3	Phase I	Fatigue, nausées/vomissements, anorexie, hypertension, dépigmentation cheveux
CP-547,632 (Pfizer)	VEGFR-2	Phase I	Fatigue, nausées/vomissements, diarrhée, rash, sécheresse de la bouche
AG-013736 (Pfizer)	VEGFR-1-3, PDGFR, c-kit	Phase II NSCLC	Fatigue, nausée, hypertension, transaminases, attaques, pancréatite, stomatite, hémoptysie

CRC, cancer colorctal ; GIST, cancer gastro-intestinal, NSCLC, cancer bronchique non à petites cellules ; RCC, cancer du rein ; SCLC, cancer bronchique à petites cellules.

au bévacizumab. La médiane de survie sans progression est encore allongée lorsque le bévacizumab est associé à l'interféron- $\alpha$  (10,2 mois). Parmi les effets secondaires du bévacizumab notons l'hypertension, la protéinurie, hémorragies et thromboembolies artérielles (tableau 4). Le VEGF, cible du bévacizumab, peut-il servir de biomarqueur plasmatique ? Cela permettrait de déterminer avant tout la

pertinence de son utilisation et aussi d'évaluer l'efficacité du traitement. L'étude de Ramaswamy, dans le cadre du cancer du sein métastatique (Ramaswamy *et al.*, 2006), tend à montrer que les patients ayant des faibles niveaux de VEGF plasmatique avant traitement (bévacizumab + docetaxel) ne répondent pas à ce traitement. Dans ce cas, les traitements au bévacizumab peuvent être remis en cause. De

plus, chez ces patients, l'anticorps monoclonal ferait augmenter les niveaux de VEGF plasmatique. Inversement, les patients ayant de forts taux de VEGF plasmatique avant traitement répondent au bévacizumab + docetaxel. Cela se traduit par la baisse des niveaux de VEGF plasmatiques. Dans d'autres cancers : rein (Yang *et al.*, 2003) et pancréas (Kindler *et al.*, 2005), les études montrent que les niveaux de VEGF mesurés dans le sang ont tendance à augmenter à la suite de la première cure de bévacizumab. Dans ces études, le VEGF n'est pas considéré comme marqueur plasmatique de la réussite du traitement et ce pour plusieurs raisons. Dans le cadre du cancer du rein, il semble que l'augmentation des taux de VEGF plasmatique soit due à la baisse de la fonction rénale et donc à la mauvaise excrétion du VEGF. En plus d'être produit par la tumeur, le VEGF l'est également par les plaquettes, les dosages doivent donc être réalisés uniquement sur le plasma. Le bévacizumab semble interférer avec les anticorps utilisés pour les dosages (tests ELISA). Par contre d'autres molécules comme l'E-sélectine (Ramaswamy *et al.*, 2006), VCAM-1 soluble et VEGFR-2 soluble voient leurs taux plasmatiques varier lors des traitements dans le cadre du cancer du sein métastatique (Denduluri *et al.*, 2008). Ces protéines semblent être de meilleurs marqueurs plasmatiques en réponse au bévacizumab et pourraient être mesurées dans d'autres types de cancer. Enfin, le bévacizumab reconnaît et fixe avec la même affinité les formes pro- et anti-angiogéniques (respectivement VEGF<sub>165</sub> et VEGF<sub>165b</sub>) du VEGF. De plus, dans un modèle de xénogreffes de cellules de cancer du colon exprimant ou non le VEGF<sub>165b</sub>, le traitement au bévacizumab induit une croissance plus rapide des tumeurs produisant ce facteur anti-angiogénique (Varey *et al.*, 2008). Bloquer le VEGF<sub>165b</sub> empêche donc ce facteur anti-angiogénique de moduler la croissance tumorale. Un anticorps monoclonal humanisé, reconnaissant uniquement les formes pro-angiogéniques, permettrait-il d'améliorer les traitements anti-VEGF chez l'Homme ?

#### b) Inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase

De nombreux processus intervenant dans la croissance et la progression tumorale passent par l'activation de récepteurs à activité tyrosine kinase, comme ceux du VEGF, ce qui induit les voies de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK et PI3 Kinase. Empêcher l'activation des récepteurs au VEGF constitue un autre moyen de bloquer les effets du VEGF sur l'angiogenèse tumorale et ce en aval du bévacizumab. Les inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase (TKI) sont de petites molécules mimétiques de l'ATP. En se fixant aux domaines I et II du site catalytique de la kinase, à la place de l'ATP, les TKI vont

empêcher la phosphorylation du récepteur et ainsi bloquer le signal intracellulaire induit par la liaison du VEGF. Parmi les TKI développés nous ne citerons que le sorafenib (BAY 43-9006 ou Nexavar) et le sunitinib (SU11248 ou Sutent), deux molécules ayant fait l'objet d'études cliniques de phase III en monothérapie (tableau 3). Le sorafenib est un inhibiteur, à large spectre, de récepteurs à activité tyrosine kinase. Il bloque également l'activité kinase de c-RAF et b-RAF. De plus, suivant les récepteurs auxquels il se lie, le sorafenib agit sur l'angiogenèse (*via* l'inhibition de VEGFR1, 2 et 3 et PDGFR- $\beta$ ) et la tumorigenèse (en ciblant Flt-3, c-Kit et RET) (Gridelli *et al.*, 2007). *In vivo*, le sorafenib inhibe l'angiogenèse tumorale de xénogreffes de cellules de cancer bronchique non à petites cellules, de colon et de sein (Wilhelm & Chien, 2002). Les essais cliniques de phase III (tableau 3) montrent l'activité anti-tumorale de cet inhibiteur chez des patients atteints de carcinomes hépatiques (602 patients, autorisation de mise sur le marché = AMM février 2006), de cancer du rein métastatique (903 patients, AMM décembre 2005) et pour lesquels les traitements par l'interféron- $\alpha$  ou l'interleukine-2 ont échoué ou ne peuvent être utilisés. Dans ce type de cancer, le sorafenib permet d'augmenter, par rapport aux traitements classiques, le taux de réponse de 8 % et la survie sans progression de 2,7 mois (Ellis & Hicklin, 2008). La demi-vie du sorafenib étant de  $\approx$  40 h, il est prescrit deux fois par jour sous forme de comprimés de 200 mg. Parmi les effets secondaires les plus fréquents citons la lymphopénie, fatigue, l'hypertension, effets cutanés, éruptions cutanées et le « syndrome pieds-mains » (tableau 4). Le sunitinib, un autre inhibiteur des récepteurs à activité tyrosine kinase, possède une activité anti-tumorale directe en agissant sur les cellules tumorales dépendant des voies de signalisation PDGFR, KIT, FLT-3 ou VEGFR (O'Farrell *et al.*, 2003). Chez la souris, différents modèles de xénogreffes ont été testés : cellules de cancer du colon, du sein et cancer bronchique non à petites cellules. Dans cette étude, le sunitinib réduit la taille des tumeurs générées (Mendel *et al.*, 2003). Des essais cliniques de phase III sont menés dans le cadre des carcinomes à cellules rénales (750 patients, en première ligne), des tumeurs stromales gastro-intestinales (312 patients n'ayant pu recevoir de traitement par Imatinib mésylate), de cancers du sein, de cancers bronchiques non à petites cellules, d'hépatocarcinomes et de cancers de la prostate (données Pfizer). Dans le traitement du cancer du rein métastatique ce TKI augmente, par rapport au traitement classique (interféron  $\alpha$ ), le taux de réponse de 31 % et allonge la survie sans progression des patients de 5,9 mois (tableau 3). Le sunitinib est administré par cycles de six semaines : 4 semaines consécutives de prises quotidiennes de 50 mg



suivies d'une fenêtre thérapeutique de 2 semaines. Les niveaux de VEGFR-3 et de VEGF-C plasmatiques, couple impliqué dans les mécanismes de lymphangiogenèse, baissent lors du traitement des cancers du rein métastatique (insensibles au bévécizumab) par du sunitinib. Ces deux protéines peuvent servir de biomarqueurs de la réussite de ce traitement (Rini *et al.*, 2008). Parmi les effets secondaires de ce TKI notons l'anémie, la neutropénie, la thrombopénie, l'hypertension, le jaunissement de la peau, les stomatites (tableau 4).

## Conclusion

L'activation de voies de signalisation majeures dans de nombreuses tumeurs représente un paradigme universellement reconnu. De cette observation princeps se dégage une nouvelle hypothèse de travail qui est « l'addiction » à une voie de signalisation majoritaire permettant d'expliquer la croissance anormale et la dissémination métastatique. Cette « addiction » suppose également que l'inhibition spécifique de cette voie de signalisation essentielle devrait entraîner une « fonte tumorale » majeure. Ainsi l'identification la plus détaillée possible de tous les acteurs moléculaires impliqués dans la croissance et la dissémination tumorale *via* une exacerbation de l'angiogenèse représente un challenge majeur pour la découverte de traitements les plus adaptés et les plus « patients-spécifiques ». La mise sur le marché de thérapies ciblées entre dans la logique de traitements « à la carte » limitant ainsi les effets secondaires invalidants pour la qualité de vie du malade. Cependant, le décryptage des mécanismes et des acteurs moléculaires impliqués dans la croissance tumorale reste important pour l'élaboration des traitements de demain. La découverte de formes anti-angiogéniques de VEGF illustre le va-et-vient indispensable qui doit exister entre chercheurs fondamentalistes et cliniciens. Ainsi, la démarche « de la paille au lit du malade » doit également être « réversible » notamment pour expliquer certains échecs thérapeutiques. Être capable d'établir l'équivalent d'un antibiogramme pour chaque tumeur au moment du diagnostic représente le défi des années à venir.

## Références

- Abdelrahim M., Baker C.H., Abbruzzese J.L., Safe S., Tolfenamic acid and pancreatic cancer growth, angiogenesis, and Sp protein degradation. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98, 855–868.
- Abdelrahim M., Smith R. 3rd, Burghardt R., Safe S., Role of Sp proteins in regulation of vascular endothelial growth factor expression and proliferation of pancreatic cancer cells. *Cancer Res*, 2004, 64, 6740–6749.
- Abdulrauf S.I., Edvardsen K., Ho K.L., Yang X.Y., Rock J.P., Rosenblum M.L., Vascular endothelial growth factor expression and vascular density as prognostic markers of survival in patients with low-grade astrocytoma. *J Neurosurg*, 1998, 88, 513–520.
- Aguayo A., Kantarjian H., Manshoury T., Gidel C., Estey E., Thomas D., Koller C., Estrov Z., O'Brien S., Keating M., Freireich E., Albitar M., Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2000, 96, 2240–2245.
- Bates D.O., Cui T.G., Doughty J.M., Winkler M., Sugiono M., Shields J.D., Peat D., Gillatt D., Harper S.J., VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 2002, 62, 4123–4131.
- Bergers G., Benjamin L.E., Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3, 401–410.
- Berra E., Benizri E., Ginouves A., Volmat V., Roux D., Pouyssegur J., HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *Embo J*, 2003, 22, 4082–4090.
- Borgstrom P., Gold D.P., Hillan K.J., Ferrara N., Importance of VEGF for breast cancer angiogenesis in vivo : implications from intravital microscopy of combination treatments with an anti-VEGF neutralizing monoclonal antibody and doxorubicin. *Anticancer Res*, 1999, 19, 4203–4214.
- Cao H., Deterding L.J., Venable J.D., Kennington E.A., Yates J.R., 3rd, Tomer K.B., Blackshear P.J., Identification of the anti-inflammatory protein tristetraprolin as a hyperphosphorylated protein by mass spectrometry and site-directed mutagenesis. *Biochem J*, 2006, 394, 285–297.
- Ciais D., Cherradi N., Bailly S., Grenier E., Berra E., Pouyssegur J., Lamarre J., Feige J.J., Destabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the zinc-finger protein TIS11b. *Oncogene*, 2004, 23, 8673–8680.
- Denduluri N., Yang S.X., Berman A.W., Nguyen D., Liewehr D.J., Steinberg S.M., Swain S.M., Circulating biomarkers of bevacizumab activity in patients with breast cancer. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7, 15–20.
- Doller A., Akool el S., Huwiler A., Muller R., Radeke H.H., Pfeilschifter J., Eberhardt W., Posttranslational modification of the AU-rich element binding protein HuR by protein kinase C delta elicits angiotensin II-induced stabilization and nuclear export of cyclooxygenase 2 mRNA. *Mol Cell Biol*, 2008, 28, 2608–2625.
- Doller A., Huwiler A., Muller R., Radeke H.H., Pfeilschifter J., Eberhardt W., Protein kinase C alpha-dependent phosphorylation of the mRNA-stabilizing factor HuR : implications for posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2. *Mol Biol Cell*, 2007, 18, 2137–2148.
- Dvorak H.F., Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor : a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*, 2002, 20, 4368–4380.

- Dvorak H.F., Tumors : wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, 1986, 315, 1650–1659.
- Ellis L.M., Hicklin D.J., VEGF-targeted therapy : mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8, 579–591.
- Escudier B., Pluzanska A., Koralewski P., Ravaud A., Bracarda S., Szczylik C., Chevreau C., Filipek M., Melichar B., Bajetta E., Gorbunova V., Bay J.O., Bodrogi I., Jagiello-Gruszfeld A., Moore N., Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma : a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet*, 2007, 370, 2103–2111.
- Essafi-Benkhadir K., Onesto C., Stebe E., Moroni C., Pagès G., Tristetraprolin inhibits Ras-dependent tumor vascularization by inducing vascular endothelial growth factor mRNA degradation. *Mol Biol Cell*, 2007, 18, 4648–4658.
- Ferrara N., Kerbel R.S., Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 2005, 438, 967–974.
- Finkenzeller G., Marme D., Weich H.A., Hug H., Platelet-derived growth factor-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is mediated by protein kinase C. *Cancer Res*, 1992, 52, 4821–4823.
- Foekens J.A., Peters H.A., Grebenchtchikov N., Look M.P., Meijer-van Gelder M.E., Geurts-Moespot A., van der Kwast T.H., Sweep C.G., Klijn J.G., High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer Res*, 2001, 61, 5407–5414.
- Fox W.D., Higgins B., Maiese K.M., Drobnjak M., Cordon-Cardo C., Scher H.I., Agus D.B., Antibody to vascular endothelial growth factor slows growth of an androgen-independent xenograft model of prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2002, 8, 3226–3231.
- Gerber H.P., Ferrara N., Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res*, 2005, 65, 671–680.
- Gille J., Swerlick R.A., Caughman S.W., Transforming growth factor alpha induced transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) gene requires AP-2 dependent DNA binding and transactivation. *EMBO J*, 1997, 16, 750–759.
- Gridelli C., Maione P., Del Gaizo F., Colantuoni G., Guerriero C., Ferrara C., Nicoletta D., Comunale D., De Vita A., Rossi A., Sorafenib and sunitinib in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Oncologist*, 2007, 12, 191–200.
- Hanahan D., Folkman J., Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996, 86, 353–364.
- Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W., Cartwright T., Hainsworth J., Heim W., Berlin J., Baron A., Griffing S., Holmgren E., Ferrara N., Fyfe G., Rogers B., Ross R., Kabbinavar F., Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2004, 350, 2335–2342.
- Ishigami S.I., Arai S., Furutani M., Niwano M., Harada T., Mizumoto M., Mori A., Onodera H., Imamura M., Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer*, 1998, 78, 1379–1384.
- Izumi Y., Xu L., di Tomaso E., Fukumura D., Jain R.K., Tumour biology : herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature*, 2002, 416, 279–280.
- Jacobsen J., Rasmuson T., Grankvist K., Ljungberg B., Vascular endothelial growth factor as prognostic factor in renal cell carcinoma. *J Urol*, 2000, 163, 343–347.
- Jain R.K., Lessons from multidisciplinary translational trials on anti-angiogenic therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8, 309–316.
- Katsanou V., Dimitriou M., Kontoyiannis D.L., Post-transcriptional regulators in inflammation : exploring new avenues in biological therapeutics. *Ernst Schering Found Symp Proc*, 2006, 37–57.
- Kerbel R.S., Tumor angiogenesis : past, present and the near future. *Carcinogenesis*, 2000, 21, 505–515.
- Kindler H.L., Friberg G., Singh D.A., Locker G., Nattam S., Kozloff M., Taber D.A., Karrison T., Dachman A., Stadler W.M., Vokes E.E., Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol*, 2005, 23, 8033–8040.
- Klagsbrun M., Eichmann A., A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16, 535–548.
- Laughner E., Taghavi P., Chiles K., Mahon P.C., Semenza G.L., HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis : novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol*, 2001, 21, 3995–4004.
- Legros L., Bourcier C., Jacquelin A., Mahon F.X., Cassuto J.P., Auberger P., Pagès G., Imatinib mesylate (STI571) decreases the vascular endothelial growth factor plasma concentration in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*, 2004, 104, 495–501.
- Lévy N.S., Chung S., Furneaux H., Lévy A.P., Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem*, 1998, 273, 6417–6423.
- Lopez de Silanes I., Fan J., Yang X., Zonderman A.B., Potapova O., Pizer E.S., Gorospe M., Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis. *Oncogene*, 2003, 22, 7146–7154.
- Lu M., Amano S., Miyamoto K., Garland R., Keough K., Qin W., Adamis A.P., Insulin-induced vascular endothelial growth factor expression in retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40, 3281–3286.
- Marchetti S., Gimond C., Roux D., Gothie E., Pouyssegur J., Pagès G., Inducible expression of a MAP kinase phosphatase-3-GFP chimera specifically blunts fibroblast growth and ras-dependent tumor formation in nude mice. *J Cell Physiol*, 2004, 199, 441–450.
- Marderosian M., Sharma A., Funk A.P., Vartanian R., Masri J., Jo O.D., Gera J.F., Tristetraprolin regulates Cyclin D1 and c-Myc mRNA stability in response to rapamycin in an Akt-dependent manner via p38 MAPK signaling. *Oncogene*, 2006, 25, 6277–6290.

- Mendel D.B., Laird A.D., Xin X., Louie S.G., Christensen J.G., Li G., Schreck R.E., Abrams T.J., Ngai T.J., Lee L.B., Murray L.J., Carver J., Chan E., Moss K.G., Haznedar J.O., Sukbuntherng J., Blake R.A., Sun L., Tang C., Miller T., Shirazian S., McMahon G., Cherrington J.M., In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors : determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res*, 2003, 9, 327–337.
- Milanini J., Vinals F., Pouysségur J., Pagès G., p42/p44 MAP Kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts. *J Biol Chem*, 1998, 273, 18165–18172.
- Milanini-Mongiati J., Pouysségur J., Pagès G., Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases : their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. *J Biol Chem*, 2002, 277, 20631–20639.
- Miquerol L., Langille B.L., Nagy A., Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development*, 2000, 127, 3941–3946.
- Mylonis I., Chachami G., Samiotaki M., Panayotou G., Paraskeva E., Kalousi A., Georgatsou E., Bonanou S., Simos G., Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *J Biol Chem*, 2006, 281, 33095–33106.
- Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z., Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 1999, 13, 9–22.
- O'Farrell A.M., Abrams T.J., Yuen H.A., Ngai T.J., Louie S.G., Yee K.W., Wong L.M., Hong W., Lee L.B., Town A., Smolich B.D., Manning W.C., Murray L.J., Heinrich M.C., Cherrington J.M., SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity *in vitro* and *in vivo*. *Blood*, 2003, 101, 3597–3605.
- Onesto C., Hannoun-Lévi J.M., Chamorey E., Formento J.L., Ramaoli A., Pagès G., Vascular endothelial growth factor-A and Poly(A) binding protein-interacting protein 2 expression in human head and neck carcinomas : correlation and prognostic significance. *Br J Cancer*, 2006, 94, 1516–1523.
- Onesto C., Berra E., Grépin R., Pagès G., Poly(A)-binding protein-interacting protein 2, a strong regulator of vascular endothelial growth factor mRNA. *J Biol Chem*, 2004, 279, 34217–34226.
- Pagès G., Sp3-Mediated VEGF regulation is dependent on phosphorylation by extra-cellular signals regulated kinases (Erk). *J Cell Physiol*, 2007, 213, 454–463.
- Pelletier F., Bermond L., Puzenat E., Blanc D., Cairey-Remonnay S., Mougin C., Laurent R., Humbert P., Aubin F., Circulating vascular endothelial growth factor in cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol*, 2005, 152, 685–689.
- Perrin R.M., Konopatskaya O., Qiu Y., Harper S., Bates D.O., Churchill A.J., Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia*, 2005, 48, 2422–2427.
- Pivot X., Bevacizumab in first-line treatment of metastatic breast cancer : a viewpoint by Xavier Pivot. *Drugs*, 2007, 67, 1800–1801.
- Pore N., Liu S., Shu H.K., Li B., Haas-Kogan D., Stokoe D., Milanini-Mongiati J., Pagès G., O'Rourke D.M., Bernhard E., Maity A., Sp1 is involved in Akt-mediated induction of VEGF expression through an HIF-1-independent mechanism. *Mol Biol Cell*, 2004, 15, 4841–4853.
- Press M.F., Lenz H.J., EGFR, HER2 and VEGF pathways : validated targets for cancer treatment. *Drugs*, 2007, 67, 2045–2075.
- Presta L.G., Chen H., O'Connor S.J., Chisholm V., Meng Y.G., Krummen L., Winkler M., Ferrara N., Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res*, 1997, 57, 4593–4599.
- Rak J., Mitsuhashi Y., Sheehan C., Tamir A., Vioria-Petit A., Filmus J., Mansour S.J., Ahn N.G., Kerbel R.S., Oncogenes and tumor angiogenesis : differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res*, 2000, 60, 490–498.
- Ramaswamy B., Elias A.D., Kelbick N.T., Dodley A., Morrow M., Hauger M., Allen J., Rhoades C., Kendra K., Chen H.X., Eckhardt S.G., Shapiro C.L., Phase II trial of bevacizumab in combination with weekly docetaxel in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2006, 12, 3124–3129.
- Richard D.E., Berra E., Gothie E., Roux D., Pouysségur J., p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem*, 1999, 274, 32631–32637.
- Rini B.I., Michaelson M.D., Rosenberg J.E., Bukowski R.M., Sosman J.A., Stadler W.M., Hutson T.E., Margolin K., Harmon C.S., DePrimo S.E., Kim S.T., Chen I., George D.J., Antitumor activity and biomarker analysis of sunitinib in patients with bevacizumab-refractory metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 2008, 26, 3743–3748.
- Sandler A., Gray R., Perry M.C., Brahmer J., Schiller J.H., Dowlati A., Lilienbaum R., Johnson D.H., Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 2006, 355, 2542–2550.
- Seo Y., Baba H., Fukuda T., Takashima M., Sugimachi K., High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*, 2000, 88, 2239–2245.
- Shih S.C., Claffey K.P., Regulation of human vascular endothelial growth factor mRNA stability in hypoxia by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L. *J Biol Chem*, 1999, 274, 1359–1365.

- Stoecklin G., Gross B., Ming X.F., Moroni C., A novel mechanism of tumor suppression by destabilizing AU-rich growth factor mRNA. *Oncogene*, 2003, 22, 3554–3561.
- Strowski M.Z., Cramer T., Schafer G., Juttner S., Walduck A., Schipani E., Kemmner W., Wessler S., Wunder C., Weber M., Meyer T.F., Wiedenmann B., Jons T., Naumann M., Hocker M., Helicobacter pylori stimulates host vascular endothelial growth factor-A (vegfa) gene expression via MEK/ERK-dependent activation of Sp1 and Sp3. *FASEB J*, 2004, 18, 218–220.
- Toi M., Matsumoto T., Bando H., Vascular endothelial growth factor : its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol*, 2001, 2, 667–673.
- Varey A.H., Rennel E.S., Qiu Y., Bevan H.S., Perrin R.M., Raffy S., Dixon A.R., Paraskeva C., Zaccaro O., Hassan A.B., Harper S.J., Bates D.O., 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, 1366–1379.
- Warren R.S., Yuan H., Matli M.R., Ferrara N., Donner D.B., Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem*, 1996, 271, 29483–29488.
- Wilhelm S., Chien D.S., BAY 43-9006 : preclinical data. *Curr Pharm Des*, 2002, 8, 2255–2257.
- Woolard J., Wang W.Y., Bevan H.S., Qiu Y., Morbidelli L., Pritchard-Jones R.O., Cui T.G., Sugiono M., Waite E., Perrin R., Foster R., Digby-Bell J., Shields J.D., Whittles C.E., Mushens R.E., Gillatt D.A., Ziche M., Harper S.J., Bates D.O., VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant : mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res*, 2004, 64, 7822–7835.
- Yamamoto S., Konishi I., Mandai M., Kuroda H., Komatsu T., Nanbu K., Sakahara H., Mori T., Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian neoplasms : correlation with clinicopathology and patient survival, and analysis of serum VEGF levels. *Br J Cancer*, 1997, 76, 1221–1227.
- Yang J.C., Haworth L., Sherry R.M., Hwu P., Schwartzentruber D.J., Topalian S.L., Steinberg S.M., Chen H.X., Rosenberg S.A., A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med*, 2003, 349, 427–434.
- Yen L., Benlimame N., Nie Z.R., Xiao D., Wang T., Al Moustafa A.E., Esumi H., Milanini J., Hynes N.E., Pagès G., Alaoui-Jamali M.A., Differential regulation of tumor angiogenesis by distinct ErbB homo- and heterodimers. *Mol Biol Cell*, 2002, 13, 4029–4044.
- Yuan A., Yu C.J., Shun C.T., Luh K.T., Kuo S.H., Lee Y.C., Yang P.C., Total cyclooxygenase-2 mRNA levels correlate with vascular endothelial growth factor mRNA levels, tumor angiogenesis and prognosis in non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer*, 2005, 115, 545–555.
- Zhang Y.W., Su Y., Volpert O.V., Van de Woude G.F., Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003a, 100, 12718–12723.
- Zhang L., Yang N., Katsaros D., Huang W., Park J.W., Fracchioli S., Vezzani C., Rigault de la Longrais, I.A., Yao W., Rubin S.C., Coukos G., The oncogene phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit alpha promotes angiogenesis via vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma. *Cancer Res*, 2003b, 63, 4225–4231.