



**HAL**  
open science

# Production et caractérisation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux ciblant les récepteurs des endothélines en vue d'une immunothérapie des cancers

Bertrand Allard

## ► To cite this version:

Bertrand Allard. Production et caractérisation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux ciblant les récepteurs des endothélines en vue d'une immunothérapie des cancers. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114803 . tel-00669677

**HAL Id: tel-00669677**

**<https://theses.hal.science/tel-00669677>**

Submitted on 13 Feb 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

**ECOLE DOCTORALE:**

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE: DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

*PÔLE: IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES*

**DISCIPLINE: IMMUNOLOGIE**

ANNÉE 2008 – 2011

SÉRIE DOCTORAT N° 1159

**THÈSE DE DOCTORAT**

soutenu le 27/01/2012

par

Bertrand ALLARD

## **PRODUCTION ET CARACTERISATION D'ANTICORPS POLYCLONAUX ET MONOCLONAUX CIBLANT LES RECEPTEURS DES ENDOTHELINES EN VUE D'UNE IMMUNOTHERAPIE DES CANCERS**

**Directeur de thèse :** Pr. Jean-Yves Couraud  
**Co-directrice :** Dr. Anne Wijkhuisen

**Composition du jury:**

<i>Président du jury :</i>	Karl Balabanian	CR (UMR 996 INSERM – Univ. Paris 11)
<i>Rapporteurs :</i>	André Pèlerin Jean-Sébastien Silvestre	DR (INSERM U896, Montpellier) DR (UMR S970 INSERM – Univ. Paris 5)
<i>Examineurs :</i>	Jean-Yves Couraud Frédérique Deshayes Zahra Tanfin Jean-Luc Teillaud Anne Wijkhuisen	PR (EA3515 Univ. Paris 7 – CEA) MCU (UMR 7592 CNRS – Univ. Paris 7) CR (UMR 8619 CNRS – Univ. Paris 11) DR (INSERM U872, Paris) MCU (EA3515 Univ. Paris 7 – CEA)





# REMERCIEMENTS

Ces travaux de thèse ont été réalisés dans le Laboratoire d'Ingénierie des Anticorps pour la Santé (LIAS) au sein du Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse (SPI) du Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEAEA) de Saclay. Ils ont été financés par le ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur ainsi que par le SPI.

Mes premiers remerciements vont au Pr Jean-Yves Couraud, mon directeur de thèse et chef de l'équipe « anticorps recombinant pour la thérapie et l'imagerie des cancers » qui m'a accueilli pendant trois ans dans son équipe de recherche. Merci pour ta disponibilité, pour toutes les corrections du manuscrit (désolé pour mes fautes d'orthographe) et pour les publications.

Je tiens à remercier très chaleureusement le Dr Anne Wijkhuisen, sans qui ma thèse n'aurait probablement pas pu être possible. Merci pour m'avoir si bien encadré et aidé dans les manips dès que tu étais disponible. Merci également pour tout ce que tu as fait pour les congrès. Enfin, merci pour ta gentillesse et pour avoir toujours été là pour me soutenir. Tu as vraiment contribué à la réussite de cette thèse et j'ai vraiment apprécié de travailler avec toi. Merci pour tout ce que tu as fait.

Je remercie par ailleurs les membres de mon jury, le Dr André Pèlegri et le Dr Jean-Sébastien Silvestre, rapporteurs de cette thèse, qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail. Je remercie également les Dr Zahra Tanfin et Frédérique Deshayes, avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer, et qui ont eu la gentillesse d'être membre de ce jury, tout comme les Dr Jean-Luc Teillaud et Karl Balabanian.

Je tiens à remercier le Dr Frédéric Ducancel pour son accueil au sein du LIAS, sa bonne humeur ainsi que sa disponibilité. Merci pour ces quelques discussions (scientifiques ou non) qui m'ont toujours permis de me remotiver. Je remercie aussi tous les autres membres du LIAS, et en particulier Céline (super congrès à Turin), Alexandra, Narciso (mon coéquipier dans l'équipe de foot), Nicolas, Adeline, Guillaume, Yves, Michel, Jean-Claude et Bruno, pour leur gentillesse et leur gaieté. Enfin, un grand merci au Dr Fabienne Priam qui m'a beaucoup aidé pendant mes deux premières années de thèse et à Mira Moussa pour le travail qu'elle a réalisé lors de ma dernière année.

Je remercie également toutes les personnes du deuxième étage qui ont elles aussi largement contribué à la réalisation de cette thèse. Merci de m'avoir toujours consacré du temps dès que j'avais une question technique et merci pour votre bonne humeur. Merci à Hervé Volland pour ses conseils sur les purifs d'anticorps, à Marie Claire pour l'utilisation des laveurs et la préparation de l'Ellman, à Boubou pour les western blot, à KAP pour le fonctionnement du GUAVA, à Marie, Julie, Steph, Nathalie, Stéphane H, Sandrine, Blanche et Corinne pour leur aide et leur disponibilité au quotidien. Enfin, mention spéciale pour les « monoclonaux » : Patou, Marc et Karine, qui m'ont vraiment beaucoup aidé lors des deux fusions et sans qui je n'aurais certainement pas pu produire d'anticorps monoclonaux, et pour mon voisin de bureau, Hervé Bernard ; merci Hervé pour ton aide au quotidien, pour la synthèse peptidique, pour l'utilisation du MALDI, pour ta disponibilité (même à 19h ou 20h le soir pour m'accompagner à l'animalerie ou faire des manips un peu « à l'arrache ») et tout simplement pour ta gentillesse. Je remercie aussi les animaliers, en particulier Jean-Charles qui m'a donné un gros coup de main pour les ponctions d'ascites.

Je tiens également à remercier les Dr Denis Servent et Gilles Mourier pour l'utilisation de la FlexStation et pour leurs conseils scientifiques ainsi que le Dr Fabrice Beau et le futur docteur Bertrand Czarny pour les inhibiteurs de l'ECE.

Par ailleurs, je remercie personnellement mon chef de service, le Dr Christophe Créminon, ainsi que toute son équipe administrative et technique (Laurie, Sandrine, Stéphane Nano, Florence et Anna) pour le bon fonctionnement du laboratoire et les excellentes conditions de travail dont j'ai pu bénéficier.

Je remercie tous les doctorants et post-docs du bâtiment pour leur sympathie, leur soutien et les petits verres au « Christ »: Mazhoura, Julie P, Stéphanie M, Sophie, Alexandra, Agnès, Anne-Cécile, Rania, Cédric et Emilie.

Pour finir, je remercie ma famille qui m'a toujours soutenu pendant ces trois années de thèse, mais aussi tout au long des mes études. Si j'en suis là aujourd'hui c'est bien grâce à vous ! Enfin, je remercie Juliette, ma compagne, pour son soutien et sa présence pendant ces trois années.

## RESUME

L'importance des anticorps monoclonaux dans l'arsenal thérapeutique contre les cancers est grandissante. Les anticorps antitumoraux sur le marché ou en développement clinique avancé ciblent majoritairement des antigènes membranaires, comme des récepteurs à activité tyrosine kinase ou des molécules d'adhésion, mais étonnamment peu de récepteurs couplés à des protéines G (RCPGs), qui constituent pourtant des cibles pharmacologiques membranaires très pertinentes en cancérologie. Ceci est dû au fait que les RCPGs, à cause de leurs sept segments transmembranaires, sont des molécules particulièrement délicates à produire et à renaturer *in vitro*, ce qui ne favorise pas leur utilisation dans des protocoles d'immunisation ni l'obtention d'anticorps reconnaissant leur conformation native. Ainsi, la production d'anticorps thérapeutiques contre les RCPGs représente aujourd'hui un réel défi technique mais également une option thérapeutique attractive du fait de l'implication des ces récepteurs dans diverses pathologies dont le cancer. Entre autres, les récepteurs des endothélines (ETAR et ETBR) apparaissent comme des RCPGs particulièrement prometteurs pour les thérapies anticancéreuses ciblées. En effet, une dérégulation de leur expression a été identifiée dans divers types de tumeurs et leur impact favorable sur de multiples étapes de la carcinogenèse a été clairement démontré. ETBR, qui a été le modèle utilisé dans cette thèse, est principalement surexprimé par les mélanomes et par l'endothélium vasculaire de diverses tumeurs : dans ce dernier cas, sa stimulation contribue à favoriser l'angiogenèse et l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire.

Dans ce contexte, l'objectif de mon projet de thèse a été de produire des anticorps polyclonaux puis monoclonaux capables de se lier spécifiquement à la forme native du récepteur ETB (i.e. dans la conformation qu'il adopte à la surface cellulaire), dans le but de développer de nouveaux agents thérapeutiques pour la thérapie des cancers impliquant une dérégulation de ce récepteur. Pour ce faire, une méthode originale d'immunisation génique, couplée à un criblage en ELISA sur cellules vivantes, ont été mis oeuvre afin de favoriser l'obtention d'anticorps reconnaissant ETBR dans son contexte membranaire. Grâce à cette approche, un ensemble de 27 anticorps monoclonaux fixant spécifiquement ETBR à la surface de diverses lignées cellulaires a été obtenu. Parmi ces anticorps, le « rendomab-B1 » s'est révélé être un antagoniste puissant de l'activation d'ETBR par les endothélines et un inhibiteur potentiel des signaux pro-angiogéniques médiés par ETBR dans des cellules endothéliales vasculaires. Le rendomab-B1 est, à notre connaissance, le premier anticorps décrit possédant des activités pharmacologiques sur ETBR. Parallèlement, le rendomab-B1 a également été testé sur des lignées cancéreuses de mélanomes humains. L'absence de liaison du rendomab-B1 à la membrane de ces cellules, malgré la présence de récepteurs ETB fonctionnels, apporte pour la première fois une preuve concrète de la présence de récepteurs ETB structurellement modifiés à la surface des mélanomes. Ce résultat, bien que remettant en cause l'utilisation du rendomab-B1 pour le ciblage des mélanomes, ouvre la voix à la production d'anticorps monoclonaux spécifiques de la forme « tumorale » du récepteur ETB, qui est d'ailleurs peut-être présente dans d'autres cancers que les mélanomes. A la lumière de ces résultats, le rendomab-B1 apparaît donc comme un outil prometteur, à la fois pour l'étude structurale et fonctionnelle d'ETBR, mais aussi pour une éventuelle thérapie anticancéreuse via le blocage d'ETBR au niveau de l'endothélium vasculaire tumoral. Par ailleurs, les 26 autres anticorps monoclonaux anti-ETBR, actuellement en cours de caractérisation, constituent également des molécules potentiellement intéressantes pour un usage fondamental ou thérapeutique impliquant ETBR. Pour conclure, ces travaux ont démontré l'intérêt de la méthode d'immunisation génique pour la production d'anticorps monoclonaux anti-RCPGs à visée thérapeutique.

**Mots clés : anticorps thérapeutiques ; axe endothéline ; RCPG ; immunisation génique.**

## LISTE DES ABBREVIATIONS

a.a	Acides aminés	IGF	Insulin-like Growth Factor
ADC	Antibody Drug Conjugate	IGF-R	Insulin-like Growth Factor Receptor
ADCC	Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity	IL	Interleukine
ADCP	Antibody Dependent Cell-mediated Phagocytosis	ILK	Integrin Linked Kinase
ADNc	ADN complémentaire	ImTox	Immunotoxine
BCR	B Cell Receptor	INCa	Institut National du Cancer
BiTE	Bispecific T-Cell Engager	IP3	Inositol Triphosphate
BSA	Bovin Serum Albumin	ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif
CDC	Complement Dependent Cytotoxicity	ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motif
CDCC	Complement Dependent Cell-mediated Cytotoxicity	K <sub>D</sub>	Constante de dissociation
CDR	Complementarity Determining Region	kDa	kilo Dalton
CHO	Chinese Hamster Ovary	KO	Knock Out
CML	Cellule Musculaire Lisse	LDL	Low Density Lipoprotein
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité	LEMP	Leucoencéphalopathie Multifocale Progressive
CPA	Cellule Présentatrice de l'Antigène	L <sub>B</sub>	Lymphocyte B
COX	Cyclooxygenase	L <sub>T</sub>	Lymphocyte T
ECE	Endothelin Converting Enzyme	MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
ECM	Matrice extracellulaire	MMP	Matrix Metalloproteinase
EGF	Epidermal Growth Factor	NEP	Neprilysine
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	NO	Nitric Oxide
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	ORL	Oto-rhino-laryngée
EMA	European Medicines Agency	PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
EMT	Epithelial-to-Mesenchymal Transition	PBS	Phosphate Buffer Saline
ETAR	Endothelin Receptor A	PCR	Polymerase Chain Reaction
ETBR	Endothelin Receptor B	PDGF	Platelet Derived Growth Factor
ETRs	Endothelin Receptors	PEG	Polyéthylène glycol
ETs	Endothelins	PET	Positron Emission Tomography
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting	PGE2	Prostaglandine E2
FAK	Focal Adhesion Kinase	PKA	Protéine Kinase A
FAM	Fluorescein	PKC	Protéine Kinase C
Fc	Fragment constant	PLA2	Phospholipase A2
FcR	Fc Receptor	PLC	Phospholipase C
FDA	Food and Drug Administration	RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
FGF	Fibroblast Growth Factor	RIC	Radioimmunoconjugué
GPCR	G-Protein Coupled Receptor	RTK	Récepteur à activité Tyrosine Kinase
GPI	Glycosyl-phosphatidylinositol	SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
HACA	Human Anti-Chimeric Antibodies	ScFv	Single chain variable fragment
HAHA	Human Anti-Human Antibodies	sDAb	Single Domain Antibody
HAMA	Human Anti-Mouse Antibodies	siRNA	small interfering RNA
HAT	Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine	SVF	Sérum de Veau Foetal
HEK	Human Embryonic Kidney	TAM	Tumor Associated Macrophages
hETBR	Human Endothelin B Receptor	TIL	Tumor Infiltrating Lymphocytes
HIF	Hypoxia Inducible Factor	TNF	Tumor Necrosis Factor
HTAP	Hypertension Artérielle Pulmonaire	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
HUVEC	Human Umbilical Vascular Endothelial Cell	VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
Ig	Immunoglobuline	VHL	Von Hippel-Lindau
IC	Immunoconjugué	WT	Wild Type

# SOMMAIRE

<b>I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Structures et fonctions biologiques des anticorps .....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Structure protéique des anticorps.....</i>	<i>1</i>
1.2. <i>Modifications post-traductionnelles des anticorps : les glycosylations .....</i>	<i>3</i>
1.3. <i>Les différentes classes d'anticorps : isotypes, allotypes et idiotypes .....</i>	<i>3</i>
1.4. <i>Organisation et réarrangements des gènes codant les immunoglobulines .....</i>	<i>7</i>
1.5. <i>Maturation des lymphocytes B et biosynthèse des immunoglobulines .....</i>	<i>7</i>
1.6. <i>Fonctions effectrices et régulatrices des anticorps dans la réponse immune .....</i>	<i>9</i>
1.6.1. <b>Fonctions effectrices des IgG.....</b>	<b>10</b>
1.6.2. <b>Régulation de la réponse immune humorale par les IgG et les FcγRs .....</b>	<b>13</b>
1.6.3. <b>Activités anti-inflammatoires des IgG.....</b>	<b>15</b>
1.7. <i>Caractéristiques pharmacodynamiques et pharmacocinétiques particulières.....</i>	<i>17</i>
1.7.1. <b>Affinité / Avidité .....</b>	<b>17</b>
1.7.2. <b>Demi-vie et biodistribution .....</b>	<b>17</b>
<b>2. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques.....</b>	<b>19</b>
2.1. <i>Historique .....</i>	<i>19</i>
2.2. <i>Les différentes générations d'anticorps thérapeutiques.....</i>	<i>21</i>
2.2.1. <b>Les anticorps murins.....</b>	<b>21</b>
2.2.2. <b>Les anticorps recombinants chimériques et humanisés.....</b>	<b>21</b>
2.2.3. <b>Les anticorps recombinants entièrement humains .....</b>	<b>23</b>
2.2.4. <b>Les anticorps optimisés .....</b>	<b>27</b>
2.3. <i>Les anticorps monoclonaux thérapeutiques en 2011.....</i>	<i>29</i>
2.3.1. <b>Aspects économiques.....</b>	<b>29</b>
2.3.2. <b>Aperçu des différents formats et indications thérapeutiques.....</b>	<b>31</b>
2.3.3. <b>Les cibles des anticorps thérapeutiques .....</b>	<b>35</b>
2.3.4. <b>Les modes d'action des anticorps thérapeutiques.....</b>	<b>36</b>
2.3.5. <b>Les limitations des anticorps thérapeutiques.....</b>	<b>41</b>
2.4. <i>L'ingénierie des anticorps thérapeutiques : les anticorps optimisés .....</i>	<i>50</i>
2.4.1. <b>Optimisation des propriétés de liaison à l'antigène .....</b>	<b>50</b>
2.4.2. <b>Optimisation des fonctions effectrices .....</b>	<b>51</b>
2.4.3. <b>Optimisation des propriétés pharmacocinétiques et de biodistribution .....</b>	<b>55</b>
2.4.4. <b>Optimisation de l'immunogénicité.....</b>	<b>61</b>
2.4.5. <b>Optimisation des propriétés biophysiques .....</b>	<b>63</b>
2.4.6. <b>Les immunoconjugués.....</b>	<b>64</b>
2.4.7. <b>Les anticorps bispécifiques et multispécifiques .....</b>	<b>68</b>
2.5. <i>Les anticorps anti-RCPGs .....</i>	<i>73</i>
<b>3. L'axe endothéline et son implication dans la physiopathologie cardiovasculaire et les cancers.....</b>	<b>76</b>
3.1. <i>Généralités sur le système endothéline.....</i>	<i>77</i>
3.1.1. <b>Structure des endothélines.....</b>	<b>77</b>
3.1.2. <b>Biosynthèse des endothélines.....</b>	<b>77</b>
3.1.3. <b>Régulation de la biosynthèse des endothélines .....</b>	<b>79</b>
3.1.4. <b>Récepteurs des endothélines et voies de signalisation associées.....</b>	<b>81</b>
3.2. <i>Principaux rôles physiopathologiques de l'axe endothéline.....</i>	<i>83</i>
3.2.1. <b>L'axe endothéline dans le développement embryonnaire .....</b>	<b>83</b>
3.2.2. <b>L'axe endothéline dans les vaisseaux sanguins.....</b>	<b>84</b>
3.2.3. <b>L'axe endothéline dans le muscle cardiaque.....</b>	<b>89</b>
3.2.4. <b>L'axe endothéline dans les poumons .....</b>	<b>90</b>

3.2.5. L'axe endothéline dans les reins .....	90
3.2.6. L'axe endothéline dans les autres organes .....	91
3.3. L'axe endothéline dans la carcinogenèse .....	92
3.3.1. Expression de l'axe endothéline dans les cancers .....	92
3.3.2. Mécanismes d'action de l'axe endothéline dans la croissance tumorale .....	95
3.4. L'axe endothéline comme cible pour les thérapies anticancéreuses .....	106
3.4.1. Les modulateurs pharmacologiques des ETRs et leur impact sur la progression tumorale .....	107
3.4.2. Essais cliniques impliquant des molécules ciblant les ETRs pour la thérapie des cancers .....	109
3.4.3. Les anticorps ciblant le système endothéline et leurs applications en cancérologie .....	111
<b>II. OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE .....</b>	<b>112</b>
<b>III. RESULTATS et DISCUSSION .....</b>	<b>113</b>
<b>1. Mise en place et validation des outils cellulaires .....</b>	<b>113</b>
1.1. Liaison des endothélines sur les lignées surexprimant ETBR .....	113
1.2. Caractérisation pharmacologique des lignées surexprimant ETBR .....	115
<b>2. Production et caractérisation d'anticorps polyclonaux anti-ETBR .....</b>	<b>117</b>
2.1. Une approche par immunisation génique .....	117
2.2. Description du protocole d'immunisation génique .....	119
2.3. Validation de l'expression d'ETBR in vivo .....	119
2.4. Suivi de la réponse en anticorps polyclonaux anti-ETBR lors du protocole d'immunisation génique .....	121
2.5. Importance de l'immunisation génique dans la production d'anticorps anti-ETBR ..	123
2.6. Article n°1: Electroporation-aided DNA immunization generates polyclonal antibodies against the native conformation of human endothelin B receptor .....	124
2.7. Conclusions et perspectives .....	150
<b>3. Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux anti-ETBR .....</b>	<b>151</b>
3.1. Première fusion cellulaire «ETBR» : production du rendomab-B1 .....	151
3.2. Article n°2: In vitro characterization of Rendomab-B1, a new antibody against the human endothelin B receptor with antagonist properties: potential uses in oncology .....	153
3.3. Conclusions et perspectives de l'article .....	192
3.4. Deuxième fusion cellulaire « ETBR » : production et caractérisation de 26 anticorps monoclonaux anti-ETBR .....	194
3.5. Les anticorps produits ciblent spécifiquement le récepteur ETB .....	195
3.6. Les anticorps reconnaissent le récepteur ETB avec une forte affinité .....	197
3.7. Certains anticorps entrent en compétition avec l'ET-1 .....	201
3.8. Certains anticorps sont capables de bloquer la voie de signalisation calcique déclenchée par l'interaction ET-1/ETBR .....	203
3.9. Perspectives .....	204
<b>IV. DISCUSSION GENERALE - CONCLUSION .....</b>	<b>206</b>
<b>VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>212</b>

# LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure schématique d'une immunoglobuline G.....	2
Figure 2. Motifs glucidiques présents sur les IgG.....	4
Figure 3. Caractéristiques structurales et fonctionnelles principales des différentes classes d'anticorps.....	6
Figure 4. Biosynthèse des immunoglobulines et réarrangements des gènes codant les chaînes lourdes et légères.....	8
Figure 5. La diversité jonctionnelle est à l'origine de l'immense variabilité des paratopes.....	8
Figure 6. Maturation des cellules B et production des anticorps.....	10
Figure 7. Mécanismes d'action principaux des anticorps.....	12
Figure 8. Famille étendue des récepteurs Fcγ humains et murins.....	12
Figure 9. Modulation de l'activité des cellules B par les IgG et le FcγRIIb.....	14
Figure 10. Activités régulatrices des complexes immuns.....	16
Figure 11. Modèle expliquant le rôle anti-inflammatoire des IgG.....	16
Figure 12. Recyclage des IgG grâce au FcRn.....	18
Figure 13. Production des anticorps monoclonaux d'après Köhler et Milstein.....	20
Figure 14. Les différentes générations d'anticorps thérapeutiques.....	22
Figure 15. Méthodes permettant d'obtenir des anticorps humains et humanisés.....	24
Figure 16. Stratégies pour améliorer les propriétés pharmacologiques des anticorps.....	28
Figure 17. Chiffre d'affaire des 13 biomédicaments les plus vendus en 2010.....	30
Figure 18. Chiffre d'affaire des 14 médicaments les plus vendus en 2010.....	30
Figure 19. Cumuls des différents types d'anticorps monoclonaux thérapeutiques et immunoadhésines approuvés jusqu'en Août 2011, et prédictions pour la période 2012-2015.....	33
Figure 20. Cibles des anticorps thérapeutiques approuvés et en cours de phase III.....	36
Figure 21. Mécanismes d'action principaux des anticorps monoclonaux anticancéreux.....	40
Figure 22. Motifs oligosaccharidiques greffés sur les protéines recombinantes thérapeutiques en fonction des différents systèmes d'expression.....	46
Figure 23. Schématisation du phénomène de « binding site barrier effect ».....	48
Figure 24. Affinité des différents FcγR humains pour les quatre isotopes d'IgG.....	52
Figure 25. Représentation schématique et non exhaustive des différents formats d'anticorps.....	58
Figure 26. Optimisation de la biodistribution intratumorale des anticorps.....	58
Figure 27. Différents types de fragments en cours de phase clinique ou préclinique.....	60
Figure 28. Modifications permettant d'améliorer l'homogénéité et les propriétés biophysiques des anticorps.....	64
Figure 29. Les différents types d'immunoconjugués.....	66
Figure 30. Différents formats d'anticorps bispécifiques ou trispécifiques.....	70
Figure 31. Séquences des endothélines (ET) et des sarafotoxines (STX).....	78
Figure 32. Biosynthèse de l'endothéline-1.....	78
Figure 33. Régulation transcriptionnelle de la production d'ET-1 dans l'endothélium.....	80
Figure 34. Voies de signalisation majoritaires déclenchées par les ETRs au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses.....	82
Figure 35. Rôles physiopathologiques principaux du système endothéline.....	84
Figure 36. Régulation du tonus vasculaire par le système endothéline.....	86
Figure 37. Dérégulation de l'axe endothéline au niveau vasculaire et complications associées.....	88
Figure 38. Actions des endothélines sur les différentes étapes de la progression tumorale... ..	96

Figure 39. Voies de signalisation déclenchées par l'axe endothéline contrôlant la progression tumorale.....	98
Figure 40. Rôles du récepteur ETBR exprimé par le stroma tumoral dans la carcinogenèse	102
Figure 41. Saturation de la liaison à l'équilibre de l'ET-1 FAM sur ETBR à la surface de cellules CHO ou HEK transfectées.....	114
Figure 42. Compétition de la liaison de l'ET-1 FAM.....	116
Figure 43. Stimulation de la voie de signalisation IP3-calcium avec les endothélines.....	116
Figure 44. Stimulation de la voie de signalisation IP3-calcium par l'ET-1 et la S6c.....	116
Figure 45. Induction d'une réponse immune cellulaire et humorale par la méthode d'immunisation génique.....	118
Figure 46. Schématisation du protocole d'immunisation génique.....	120
Figure 47. Expression du récepteur ETB après électroporation <i>in vivo</i> .....	120
Figure 48. Suivi de la réponse humorale polyclonale anti-ETBR au cours du protocole d'immunisation génique.....	122
Figure 49. Spécificité des anticorps polyclonaux de la saignée n°5 (S5) vis à vis du récepteur ETB.....	122
Figure 50. Comparaison de la réponse immunitaire, au stade du prélèvement sanguin n°5 (S5), entre un protocole « prime-boost » impliquant l'immunisation génique et un protocole n'incluant que des rappels cellulaires.....	124
Figure 51. Isotypes des 27 anticorps isolés après deux campagnes d'immunisation et deux fusions ETBR.....	152
Figure 52. Marquage spécifique du surnageant de l'hybridome 3H7 sur les cellules CHO-ETBR.....	152
Figure 53. Processus de criblage des hybridomes après la fusion cellulaire.....	152
Figure 54. Analyse des anticorps sur gel après purification par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine A.....	195
Figure 55. Comparaison de la fixation des anticorps monoclonaux entre les CHO WT et les CHO ETBR.....	196
Figure 56. Comparaison de la fixation des anticorps monoclonaux sur des cellules CHO ETBR transfectées ou non avec un siRNA spécifique du transcrit ETBR.....	196
Figure 57. Saturation de la liaison à l'équilibre des différents anticorps anti-ETBR.....	199
Figure 58. B <sub>MAX</sub> des différents anticorps groupés par isotype.....	200
Figure 59. B <sub>MAX</sub> des différents « groupes » d'anticorps.....	200
Figure 60. Compétition de la liaison de l'ET-1 FAM avec les anticorps anti-ETBR.....	202
Figure 61. Compétition de la liaison des anticorps anti-ETBR avec l'ET-1.....	202
Figure 62. Inhibition du flux calcique intracellulaire déclenché par l'ET-1.....	204
Figure 63. Différents formats d'immunogènes utilisés pour produire des anticorps anti-RCPGs.....	208
Figure 64. Stratégies envisageables pour optimiser l'efficacité de l'immunisation génique.	209

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Anticorps monoclonaux et dérivés approuvés pour un usage thérapeutique (FDA, EMA, SDA).....	32
Tableau 2. Anticorps monoclonaux et dérivés en phase III d'essai clinique.....	34
Tableau 3. Anticorps ayant atteint la commercialisation pour un usage en imagerie.....	60
Tableau 4. Immunogénicité de quelques anticorps thérapeutiques sur le marché.....	62
Tableau 5. RCPGs ciblés par des anticorps monoclonaux ou des agents chimiques en phase clinique pour le traitement des cancers.....	75
Tableau 6. Expression des endothélines et de leurs récepteurs dans différents tissus ou cellules humains.....	80
Tableau 7. Expression de l'axe endothéline dans les cancers humains.....	94
Tableau 8. Affinité des différents anticorps pour ETBR et ETAR.....	110
Tableau 9. Molécules ciblant les ETRs utilisées dans des essais cliniques pour la thérapie des cancers.....	198

## PREAMBULE

Les cancers représentent la première cause de mortalité dans le monde avec 13% des décès (7,8 millions de décès en 2008, World Cancer Report, 2008). En France, le cancer se caractérise par environ 357 500 nouveaux cas et 146 500 décès en 2010, constituant ainsi la première cause de mortalité chez l'homme et la deuxième chez la femme après les maladies cardiovasculaires (INCa, 2010). Cette incidence, associée à une démographie croissante en France comme dans le monde, entraîne une hausse du nombre de patients à traiter et donc une augmentation des traitements, en particulier la chimiothérapie (+ 25% depuis 2005).

Dans ce contexte, le développement de nouveaux agents anticancéreux est en plein essor. En effet, 31 nouveaux composés ont obtenu une première autorisation de mise sur le marché en oncologie depuis 2004. Parmi ces composés, on retrouve des drogues cytostatiques non spécifiques mais surtout de plus en plus de « nouvelles molécules », permettant une thérapie ciblée, mieux adaptée aux phénotypes tumoraux des patients et comportant moins d'effets secondaires. Les anticorps monoclonaux, grâce à leur grande spécificité pour leur cible, leurs différents modes d'action ainsi que leurs structures moléculaires adaptables à la stratégie thérapeutique, apparaissent comme des molécules de choix pour les thérapies anticancéreuses ciblées. Ainsi, de nombreux anticorps monoclonaux thérapeutiques sont actuellement en cours d'essai clinique pour des indications en cancérologie et 15 anticorps sont approuvés pour des traitements antitumoraux. Néanmoins, une grande partie des anticorps sur le marché ou en développement se concentrent sur des cibles validées mais redondantes (EGFR, CD20). De plus, encore peu d'anticorps ciblant les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) sont en développement malgré le rôle important de ces récepteurs dans la progression tumorale. Entre autres, les deux sous-types de récepteurs des endothélines (ETAR et ETBR) sont impliqués dans le développement de diverses tumeurs et apparaissent comme des cibles thérapeutiques pertinentes en oncologie, un constat appuyé par de multiples publications récentes et essais cliniques mettant en jeu ces récepteurs.

Ainsi, le développement d'anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement les récepteurs des endothélines (ETRs) semble être une stratégie prometteuse pour la thérapie des cancers mais devrait également permettre de disposer d'outils moléculaires uniques pour mieux caractériser la structure et le rôle de ces récepteurs dans divers processus physiopathologiques. Par ailleurs, la mise au point d'une stratégie de production d'anticorps anti-RCPGs efficace pourra servir de base pour générer des anticorps monoclonaux contre d'autres RCPGs d'intérêt pharmacologique. C'est pour ces raisons que mon travail de thèse a

consisté à produire et à caractériser les propriétés d'anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur B humain des endothélines.

Ce manuscrit décrit donc les méthodes employées ainsi que les résultats obtenus au cours de ces trois années de thèse qui ont abouti à la production d'un ensemble de 27 anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement le récepteur ETB. Ces résultats ont donné lieu à la rédaction de deux articles scientifiques (1 publié en Mars 2011 et 1 soumis en Novembre 2011) et d'un brevet déposé en Octobre 2010 (PCT/EP2011/067390). Avant d'aborder la partie « résultats », ce manuscrit comporte une partie introductive permettant d'avoir une vue d'ensemble sur les dernières avancées concernant les anticorps monoclonaux thérapeutiques dans un premier temps, et l'implication du système endothéline dans les cancers dans un second temps.

## **INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**

Avant de résumer l'état des connaissances concernant d'une part les anticorps monoclonaux thérapeutiques, et d'autre part l'implication des endothélines et de leurs récepteurs dans les cancers, quelques rappels généraux sur la structure et les fonctions biologiques des anticorps sont présentés. Certains paragraphes, notamment ceux concernant les fonctions régulatrices des anticorps dans la réponse immune, sont clairement à la marge du sujet de thèse. Cependant, ils permettent selon moi d'aborder brièvement des aspects importants de la biologie des anticorps, souvent relégués au second plan, mais qui peuvent pourtant avoir un intérêt dans la conception des anticorps thérapeutiques et dans la compréhension de leurs effets pharmacologiques et toxiques.

# I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

## 1. Structures et fonctions biologiques des anticorps

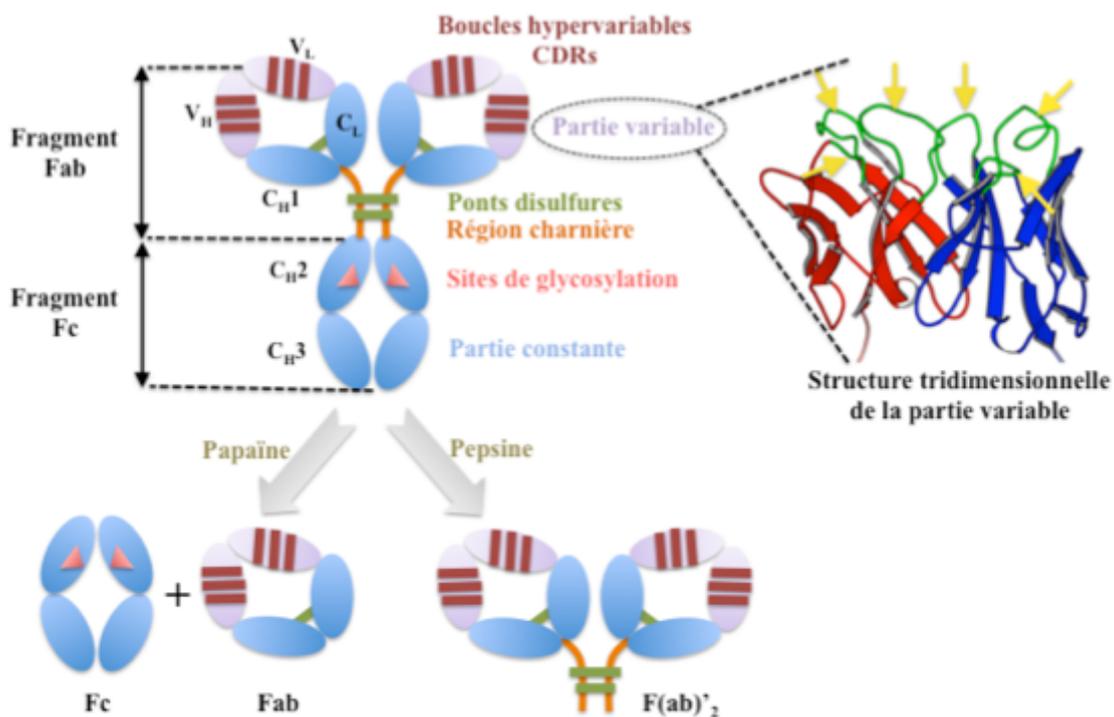
### 1.1. Structure protéique des anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Toutes les protéines de cette famille, contiennent au moins un motif structural dénommé « domaine immunoglobuline ». Ce domaine, de 70 à 130 acides aminés (a.a), possède une structure secondaire caractéristique, formée par deux feuillets bêta antiparallèles superposés à la manière d'un sandwich (Figure 1, structure tridimensionnelle). Cette structure est stabilisée par des interactions entre des a.a hydrophobes ainsi que par des ponts disulfures formés par des résidus cystéines très conservés [1]. Il existe différents types de domaines Ig : des domaines constants (IgC) et des domaines variables (IgV). Les anticorps sont formés par un ensemble de domaines IgC et IgV, eux-mêmes localisés au sein de quatre chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes (notées H pour Heavy) et 2 chaînes légères (notées L pour light) identiques entre elles, et reliées par des ponts disulfures. Chaque chaîne lourde comprend 3 ou 4 domaines constants (notés  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  et  $C_{H4}$ ) et un domaine variable  $V_H$ , pour une masse totale d'environ 50 kDa; chaque chaîne légère comprend 1 domaine constant  $C_L$  et 1 domaine variable  $V_L$  aboutissant à une masse de 25 kDa. Ainsi, un anticorps entier monomérique, composé de ses 4 chaînes, présente une masse d'environ 150 kDa. Cette organisation protéique particulière est à l'origine de la structure de base (monomérique) des anticorps en forme de « Y » (Figure 1) [2]. Il existe différents types d'anticorps ou isotypes (IgG, IgA, IgM, IgE et IgD) qui diffèrent en terme de séquence et de structure, mais ayant comme élément commun la structure en « Y » décrite ci-dessus.

Outre la dichotomie chaîne lourde versus chaîne légère, les anticorps sont caractérisés par une partie constante (domaines  $C_L$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  et  $C_{H3}$ ) et une partie variable (domaines  $V_L$  et  $V_H$ ). La partie variable se compose de six régions hypervariables ou CDR (Complementary Determining Regions) de 5 à 15 a.a, formant des boucles entre des régions charpentes ou FR (Framework). Ces six boucles hypervariables, appartenant aux domaines  $V_L$  et  $V_H$ , peuvent se rapprocher dans l'espace grâce à des interactions non covalentes pour former une zone particulière appelée paratope, responsable de la liaison de l'anticorps à un épitope spécifique [3]. Comme leur nom l'indique, les régions hypervariables sont très peu conservées entre les anticorps. Elles sont propres à chaque anticorps et leurs séquences et leurs organisations spatiales sont responsables de la spécificité d'un anticorps pour un épitope sur antigène

donné. Ainsi, un anticorps possède deux sites de liaison à l'antigène, un au bout de chaque bras, d'où la possibilité de lier deux molécules d'antigène par anticorps. Par ailleurs, la partie constante se caractérise par une séquence en acides aminés proche d'un anticorps à l'autre, avec tout de même des différences en fonction de l'espèce ou de l'isotype. A la différence de la partie variable, la région constante n'est pas ou peu impliquée dans la reconnaissance de l'antigène. Cependant, sa présence est nécessaire pour assurer les fonctions effectrices cytotoxiques des anticorps permettant l'élimination des antigènes. Ces fonctions effectrices mettent en jeu le système du complément ou des cellules de l'immunité innée (macrophages, granulocytes, cellules natural killer,...) qui peuvent interagir avec les Ig grâce à des récepteurs membranaires spécifiques, les FcRs (récepteurs au fragment constant).

Les anticorps peuvent également être caractérisés par différents fragments obtenus par clivage enzymatique à la papaïne ou à la pepsine (Figure 1, partie inférieure). La papaïne dissocie les 2 bras formant le « Y » et permet d'obtenir 2 fragments différents : le fragment Fab (Fragment having the antigen binding site) ainsi que le fragment Fc (Fragment cristallisable) [4]. La pepsine digère l'anticorps au niveau des ponts disulfures de la région charnière, libérant ainsi le fragment F(ab)<sub>2</sub> [5]. La région charnière permet de relier le fragment F(ab)<sub>2</sub> au Fc et apporte également une grande flexibilité à l'anticorps qui peut ainsi interagir avec l'antigène dans différents plans de l'espace [6].



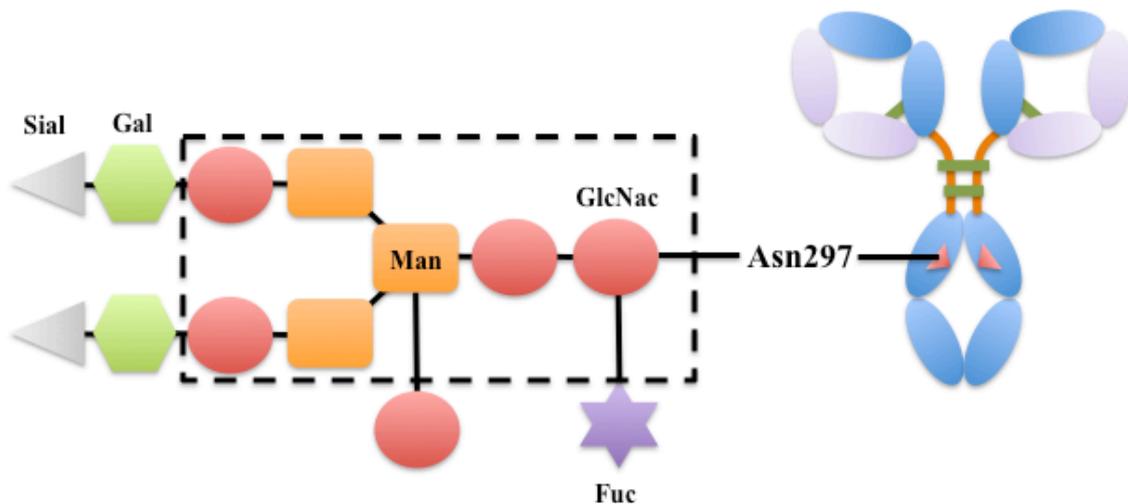
**Figure 1. Structure schématique d'une immunoglobuline G.** La structure tridimensionnelle de la partie variable provient du site suivant : <http://xray.bmc.uu.se/lars/Practicals/Immun/antibody.html> ; les six CDRs représentés en vert sont localisés par des flèches jaunes ; rouge = VL ; bleu = VH .La partie inférieure du schéma présente les fragments obtenus à la suite de digestions enzymatiques à la pepsine ou à la papaïne.

## *1.2. Modifications post-traductionnelles des anticorps : les glycosylations*

Les immunoglobulines comportent des résidus glucidiques qui sont associés majoritairement au niveau du fragment Fc. Le nombre et la localisation des glycosylations varient en fonction des isotypes. Les IgG présentent deux N-glycosylations au niveau des domaines C<sub>H</sub>2, sur l'asparagine 297 (Asn297). Le motif oligosaccharidique de base comprend un heptamère biantennaire, composé de N-acétylglucosamine et de mannose. Ce motif conservé peut être modifié par l'ajout d'un nombre variable de résidus de fucoses à sa base, de galactoses ou d'acides sialiques à ses extrémités (Figure 2). Ainsi, plus de 30 motifs oligosaccharidiques différents peuvent être produits à partir de la structure heptamérique de base [7]. Les glycosylations au niveau du Fc interviennent dans la stabilité structurale des anticorps et influencent l'affinité des IgG pour les récepteurs FcγRs [8]. Par exemple, des IgG non glycosylées sont incapables de se fixer aux FcγRs pour médier leurs fonctions effectrices d'élimination des antigènes [9]. De plus, la composition du motif oligosaccharidique influence aussi sur l'activité des anticorps. En effet, des taux anormaux d'IgG sans acide sialique ou galactose sont retrouvés chez des patients atteints de maladies auto-immunes (e.g. polyarthrite rhumatoïde) [7, 10]. Il a également été montré que des IgG non fucosylées présentent des fonctions effectrices améliorées [11]. Par ailleurs, les résidus glucidiques du Fc des IgA et IgE semblent moins déterminants dans la liaison sur leurs FcR respectifs. En revanche, ils permettent des interactions avec certaines autres molécules : la galectine 3 pour les IgE, le récepteur des asialoglycoprotéines (ASGP-R) pour les IgA sériques, les adhésines et lectines bactériennes pour les IgA mucosales. Ces interactions permettent respectivement : l'association des IgE avec leurs FcRs, l'élimination des IgA sériques et la neutralisation des pathogènes au niveau des muqueuses [12-14]. Des O-glycosylations sont également présentes au niveau de la région charnière des IgA et des IgD, les protégeant ainsi des protéases et permettant de leurrer les pathogènes (IgA).

## *1.3. Les différentes classes d'anticorps : isotypes, allotypes et idiotypes*

Chez l'homme, les anticorps se répartissent en cinq classes qui diffèrent par leurs propriétés physicochimiques, leurs structures, leurs concentrations sériques et leur comportement en tant qu'antigène (Figure 3). C'est d'ailleurs cette dernière caractéristique qui est utilisée pour classer les anticorps : on parle de déterminants antigéniques [15]. Il en existe trois types: les déterminants isotypiques, allotypiques et idiotypiques.



**Figure 2. Motifs glucidiques présents sur les IgG.** Les IgG sont N-glycosylées sur l'asparagine 297 du domaine C<sub>H</sub>2. Les résidus encadrés correspondent au motif structural de base présent sur les IgG. Asn : asparagine ; GlcNac : N-acétylglucosamine ; Man : mannose ; Fuc : fucose ; Gal : galactose ; Sial : acide sialique.

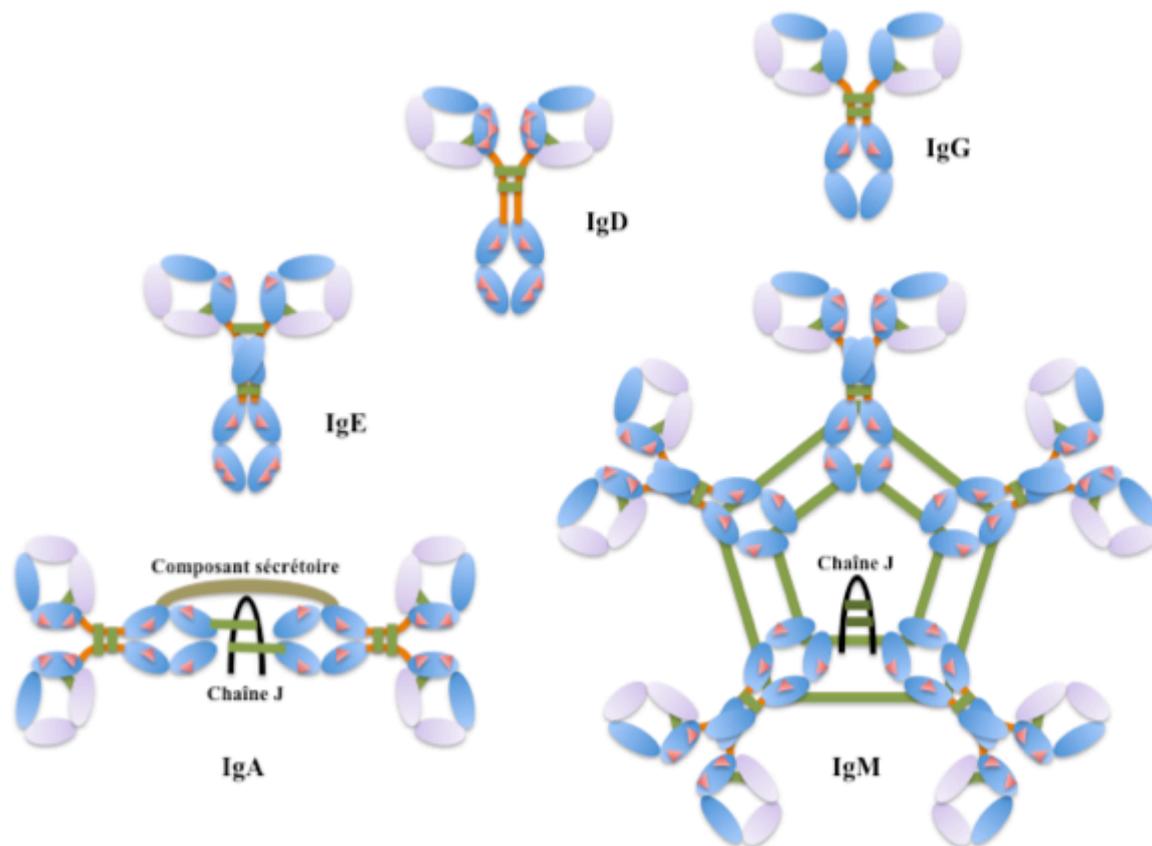
Les déterminants antigéniques des chaînes lourdes sont appelés déterminants isotypiques et permettent de définir les cinq grandes classes d'anticorps : IgG, IgA, IgD, IgM et IgE, correspondant respectivement à la présence de chaînes lourdes de type gamma, alpha, delta, mu et epsilon [16]. D'autres déterminants isotypiques de chaînes lourdes caractérisent des sous-classes d'anticorps. C'est le cas pour les IgG, qui présentent quatre sous-classes chez l'homme :  $\gamma$ 1, 2, 3 et 4, et pour les IgA, pour lesquelles on trouve deux sous-classes,  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2. Il existe également des déterminants isotypiques sur les chaînes légères qui se répartissent ainsi en deux groupes : kappa et lambda. Sur un même anticorps, les deux chaînes lourdes et les deux chaînes légères sont identiques en terme de classe ou de sous-classe et les déterminants isotypiques sont présents chez tous les individus d'une même espèce.

Les déterminants allotypiques correspondent aux polymorphismes des gènes codant pour les anticorps d'une même espèce [17]. En effet, au sein d'une population, certains individus vont présenter des allèles différents pour certains gènes codant les immunoglobulines, générant ainsi des variants allotypiques. Il existe des déterminants allotypiques pour les chaînes gamma, alpha et kappa, notés respectivement Gm, Am et Km.

Enfin, les déterminants idiotypiques permettent de regrouper les anticorps ayant des spécificités antigéniques similaires. Ces déterminants se trouvent dans les régions variables, à proximité des sites de liaison aux antigènes, et sont spécifiques à chaque individu [18].

Les cinq classes d'anticorps définies grâce aux déterminants isotypiques présentent des structures et des fonctions physiologiques différentes (figure 3). On trouve des formes monomériques (IgG, D et E) ou multimériques (IgA, IgM), ainsi que des formes circulantes

(IgG, A, M, E) ou membranaires (IgD, IgM). Les IgG sont les plus abondantes dans le sérum (70 % des anticorps) et interviennent principalement dans les réponses immunitaires secondaires. Elles participent à la protection de l'organisme vis à vis des pathogènes ou des toxines en induisant leur neutralisation et leur destruction par le complément, les phagocytes ou les cellules cytotoxiques. Les IgG sont également la seule classe à pouvoir traverser la barrière placentaire conférant ainsi une immunité passive au fœtus [19]. Les IgA représentent environ 20% des anticorps sériques et constituent la classe prédominante dans les fluides corporels (salive, larmes, lait maternel, sécrétions nasales, génitales, mucus bronchique, digestif) assurant ainsi la protection au niveau des points d'entrée de l'organisme. Les IgA sont sécrétées sous forme de dimères grâce à l'ajout d'une chaîne J reliant les deux monomères. Elles sont ensuite internalisées au niveau des cellules épithéliales des muqueuses via le récepteur poly-Ig qui assure la transcytose et le relargage des IgA associées à leur composant sécrétoire dans les fluides mucosaux [20]. Les IgM représentent environ 8% des anticorps sériques ; elles sont les premières immunoglobulines exprimées par les cellules B matures (sous forme de monomères membranaires composant le BCR), et apparaissent durant les phases précoces d'une infection. Dans le sérum, les IgM sont sous forme pentamérique (parfois hexamérique), ce qui leur confère une forte avidité permettant une agglutination efficace des antigènes, couplée à une forte capacité d'activation du complément [21]. Les IgD sont majoritairement membranaires, exprimées par les lymphocytes B matures, mais on les retrouve également en faible quantité dans le sérum (< 1% des anticorps). Depuis leur découverte en 1964, leurs fonctions physiologiques restent énigmatiques [22]. Co-exprimées à la surface des lymphocytes B ( $L_B$ ) matures avec les IgM, les IgD ont la fonction de récepteur à l'antigène (BCR) et pourraient intervenir dans l'anergie des  $L_B$  [23]. D'autres études récentes suggèrent que les IgD ont un rôle dans l'immunité mucoale des voies respiratoires [24]. Les IgE sont l'isotype le moins abondant dans le sang. Elles sont impliquées dans les phénomènes allergiques et dans l'immunité antiparasitaire. Dans l'allergie, les IgE fonctionnent via leur interaction avec les récepteurs Fc de type epsilon ( $Fc\epsilon R$ ), exprimés principalement à la surface des mastocytes, basophiles, éosinophiles, macrophages, monocytes et plaquettes. La fixation des complexes IgE-allergène sur les  $Fc\epsilon R$  induit le relargage de médiateurs inflammatoires et vasoactifs responsables des symptômes liés à la réaction allergique [25].



Classes	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Structures	monomère	monomère ou dimère	pentamère	monomère	monomère
Poids moléculaire (kDa)	150	160-350	950	170-180	190
% carbohydrates	2-3	7-11	10-12	9-14	12-13
Sous classes	$\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \gamma 4$	$\alpha 1, \alpha 2$			
% anticorps totaux sériques	70 50 ( $\gamma 1$ ), 15 ( $\gamma 2$ )	20 15 ( $\alpha 1$ ), 5 ( $\alpha 2$ )	10	0,2	0,004
Demi-vie (jours)	21-24 / 7 ( $\gamma 3$ )	4-7	5-10	0,5	1-5
Passage transplacentaire	Oui	Non	Non	Non	Non
Activation du complément	$\gamma 3 > \gamma 1 > \gamma 2 > \gamma 4$	$\pm (\alpha 1)$	+++		
Fixation au FcR	Fc $\gamma$ R	Fc $\alpha$ R		Fc $\delta$ R	Fc $\epsilon$ R
Localisation	sérum	sérum (monomère), mucus (dimère)	sérum, membrane L <sub>B</sub>	sérum, membrane L <sub>B</sub>	sérum

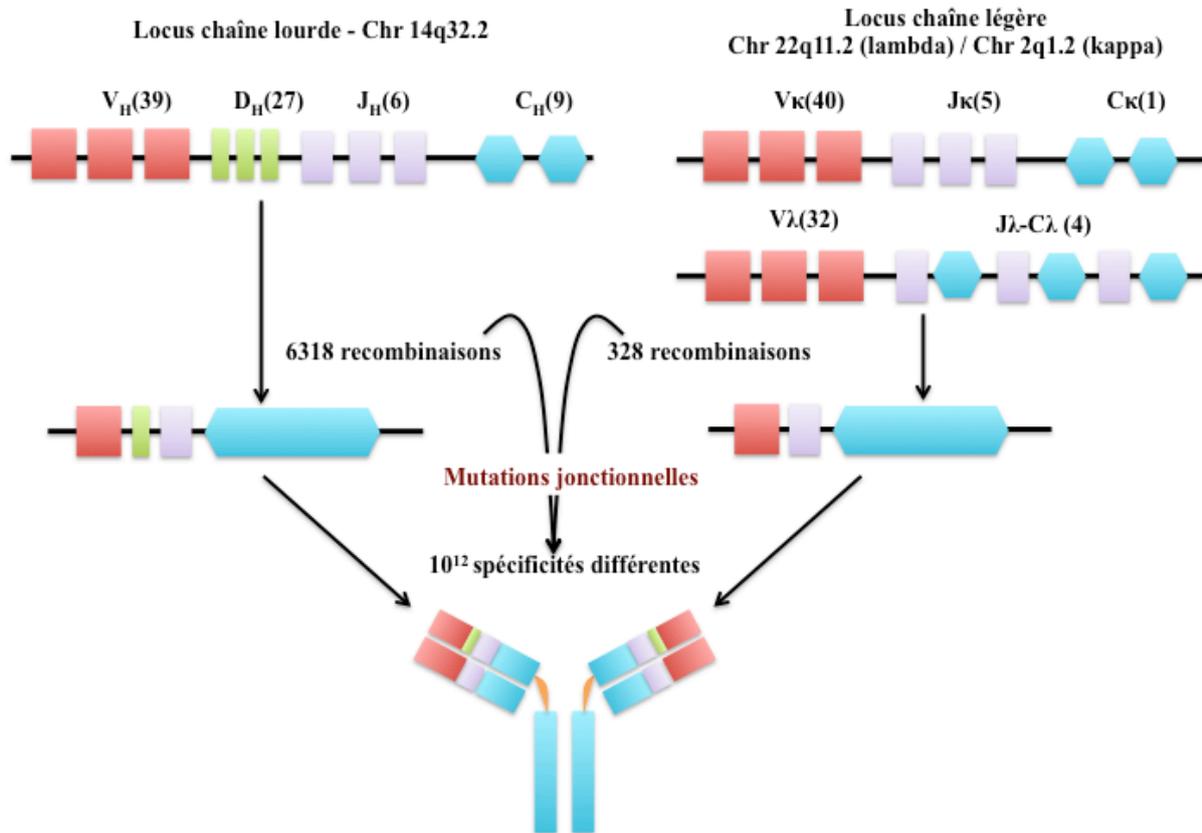
**Figure 3. Caractéristiques structurales et fonctionnelles principales des différentes classes d'anticorps.**  
 Source : [http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/IGandBcells/\\_UK/IGproperties/Hu\\_IGproperties.html](http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/IGandBcells/_UK/IGproperties/Hu_IGproperties.html)

#### *1.4. Organisation et réarrangements des gènes codant les immunoglobulines*

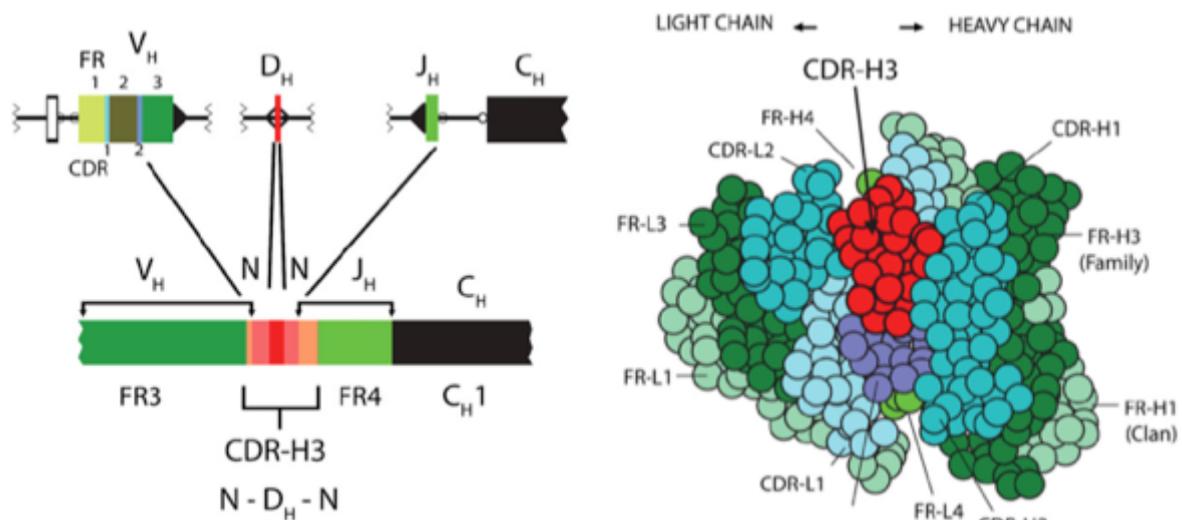
Les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines sont codées par des familles multigéniques séparées, localisées sur les chromosomes 2 (chaînes légères kappa), 14 (chaînes lourdes) et 22 (chaînes légères lambda) [26]. Les domaines constants et variables des différentes chaînes sont codés par des gènes indépendants: C pour les parties constantes, V, D, J et V, J pour les parties variables des chaînes lourdes et légères respectivement. Les immunoglobulines sont donc le produit de l'association aléatoire des différents gènes codants pour les parties variables et constantes des chaînes lourdes et légères (Figure 4). Les chaînes légères résultent de l'association V-J-C alors que les chaînes lourdes combinent les gènes V-D-J-C [27]. Du fait du nombre important des différents gènes (environ 150 gènes fonctionnels), la diversité des combinaisons possibles est immense donnant au système immunitaire la possibilité de produire plus de  $10^{12}$  immunoglobulines différentes. Cette immense variabilité est en fait due majoritairement à des mutations intervenant au niveau des jointures, lors du réappariement des gènes VDJ [28]. En effet, des nucléotides peuvent être délétés ou insérés aléatoirement aux extrémités des gènes VDJ lors de leur appariement, générant ainsi des zones de grande variabilité. Cette diversité jonctionnelle est particulièrement forte au niveau des extrémités des gènes  $D_H$  résultant ainsi en une grande variabilité du  $CDR_{H3}$  qui joue souvent un rôle important dans le paratope (Figure 5) [29]. Cette extraordinaire diversité, permet la production d'anticorps contre des antigènes putatifs, jamais rencontrés par l'hôte, établissant ainsi un mécanisme de défense puissant contre les pathogènes à évolution rapide. En revanche, une telle variabilité engendre également la production d'anticorps auto-réactifs, généralement éliminés lors de la maturation des lymphocytes B.

#### *1.5. Maturation des lymphocytes B et biosynthèse des immunoglobulines*

La biosynthèse des immunoglobulines est hiérarchisée et commence dans les stades précoces de la maturation des lymphocytes B (Figure 6) [30]. Dans les cellules pro-B, les réarrangements  $D_H - J_H$  ont lieu, suivis par les appariements  $V_H - DJ_H$  au stade pré-B. Pendant ces deux phases de maturation, des enzymes de recombinaison (RAG1/2) sont exprimées et permettent l'appariement des chaînes lourdes [31]. On trouve également la TdT (Terminal deoxyribonucleotidyl Transférase), responsable de l'ajout de nucléotides aux jonctions V-D-J assurant ainsi la diversité des chaînes lourdes [32].



**Figure 4. Biosynthèse des immunoglobulines et réarrangements des gènes codant les chaînes lourdes et légères.** H : heavy ; Chr : chromosome. Les chiffres indiqués entre parenthèses correspondent au nombre de gènes fonctionnels. Schéma réalisé d'après <http://www.imgt.org/IMGTeducation/>.

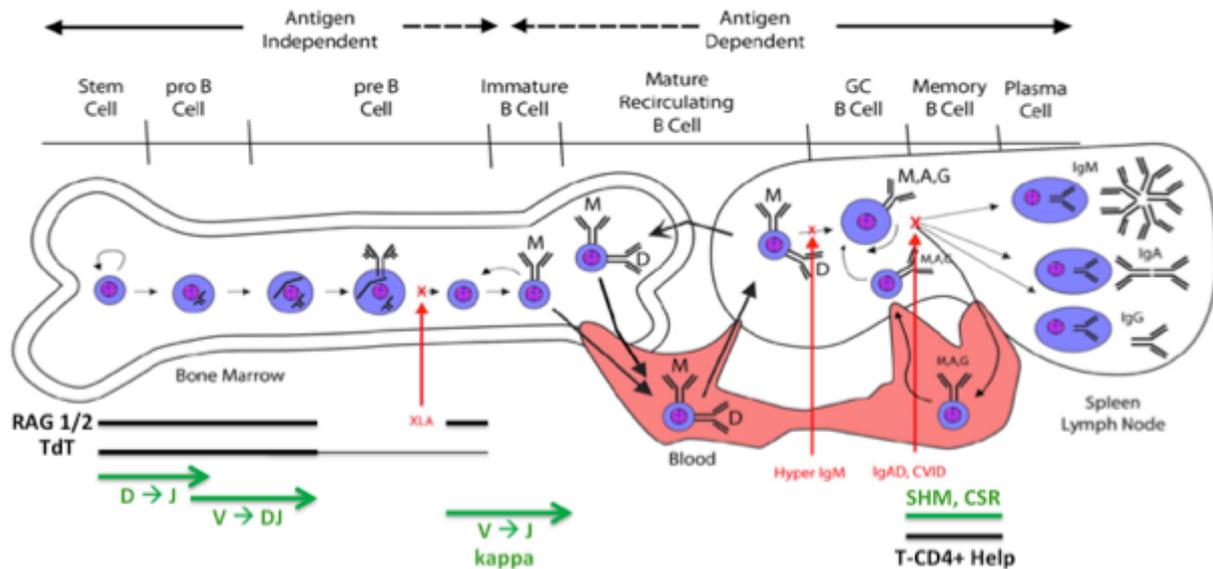


**Figure 5. La diversité jonctionnelle est à l'origine de l'immense variabilité des paratopes.** Le paratope ou site de liaison à l'antigène est formé par les six CDRs des chaînes lourdes et légères de la partie variable. Les CDRs ou régions hypervariables se localisent entre des régions charpentes ou FR plus conservées. Le CDR<sub>H3</sub> fait l'objet d'une très grande variabilité car il est généré en partie par les mutations jonctionnelles intervenant au niveau des extrémités des gènes V, D et J. Panneau de gauche : réarrangements géniques et mutations à l'origine de la diversité du CDR<sub>H3</sub>. Panneau de droite : représentation schématique du paratope dans lequel le CDR<sub>H3</sub> possède une localisation centrale. D'après [2].

Au stade pré-B, les lymphocytes expriment également le domaine constant mu, qui après combinaison avec la partie variable  $VDJ_H$ , peut s'associer avec une pseudo chaîne légère formant ainsi le récepteur pré-B [33]. L'expression du récepteur pré-B à la surface des lymphocytes est essentielle pour poursuivre le processus de différenciation. Il empêche également la réalisation d'autres réarrangements  $VDJ_H$  (phénomène d'exclusion allélique) [34], et permettrait d'induire le réarrangement du locus VJ des chaînes légères kappa. Le stade lymphocyte B immature est atteint lorsque qu'une chaîne légère fonctionnelle est produite (pour remplacer la pseudo chaîne légère), assurant ainsi la présence d'une IgM entière à la surface cellulaire. Les  $L_B$  immatures subissent une sélection négative afin d'éliminer ou d'inactiver les clones auto-réactifs et deviennent matures lorsqu'ils co-expriment à leur surface des IgM et des IgD possédant les mêmes parties variables. Ces  $L_B$  matures immunocompétents, dits « naïfs », peuvent ensuite quitter la moelle osseuse et coloniser les organes lymphoïdes périphériques. Une fois dans les ganglions lymphatiques, la durée de vie des  $L_B$  dépend de leur rencontre avec un antigène : les cellules non stimulées par l'antigène meurent par apoptose au bout de quelques jours. Au contraire, les clones activés par un antigène étranger reçoivent des signaux de survie, prolifèrent et subissent des phénomènes de commutation de classe (ou switch isotypique) et d'hypermutation somatique [35], permettant d'une part la synthèse de tous les isotypes d'anticorps et d'autre part l'amélioration de l'affinité de l'anticorps pour l'antigène. Ces phénomènes nécessitent l'intervention de lymphocytes T ( $L_T$ )  $CD4^+$ , qui génèrent un environnement cytokinique responsable de la synthèse d'isotypes d'anticorps adaptés à la situation (e.g. IgG pour les virus, bactéries, IgE pour les parasites). Il en résulte l'apparition de cellules B spécialisées dans la sécrétion d'anticorps : les plasmocytes, et l'émergence de lymphocytes B mémoires caractérisés par une durée de vie longue et la production d'anticorps de haute affinité.

### *1.6. Fonctions effectrices et régulatrices des anticorps dans la réponse immune*

La réponse immunitaire résulte de l'intégration de signaux activateurs et inhibiteurs déterminant la rapidité, l'intensité ainsi que la durée de la réponse [36]. Une dérégulation de la balance entre ces différents signaux peut engendrer des maladies auto-immunes ou au contraire des infections opportunistes. Du point de vue moléculaire, les voies activatrices et inhibitrices sont initiées par des récepteurs membranaires associés à des motifs peptidiques activateurs ITAM ou inhibiteurs ITIM (pour Immunoreceptor tyrosine-based activating or inhibiting motifs) [37].



**Figure 6. Maturation des cellules B et production des anticorps.** Les cellules B effectuent leur maturation dans la moelle osseuse avant de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate). Au cours de leur maturation, les lymphocytes réalisent les réarrangements géniques nécessaires à la production des anticorps et à l'élaboration d'un répertoire immunitaire diversifié. SHM : somatic hypermutations ; CSR : class switch recombination. D'après [2].

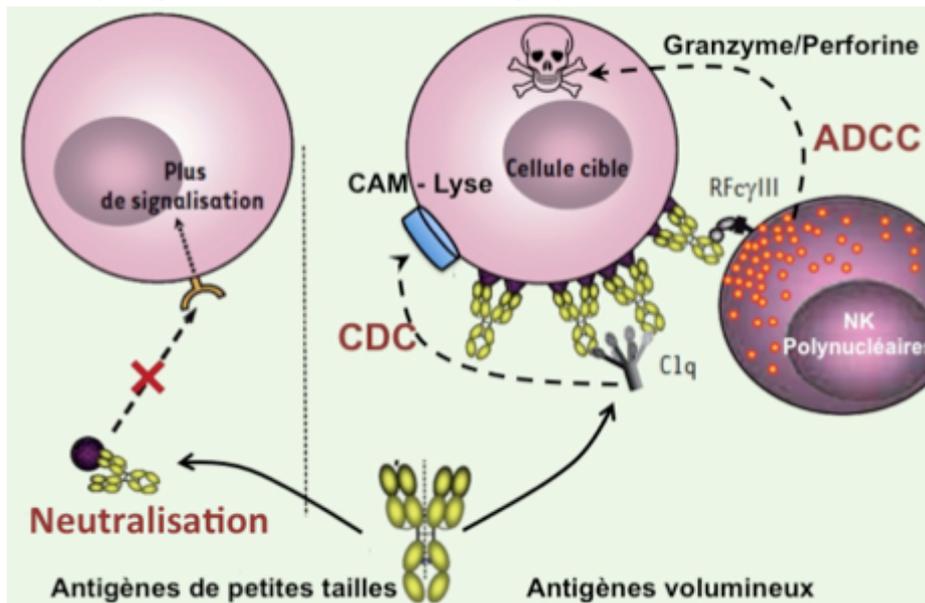
Ces motifs permettent de scinder les récepteurs en deux catégories : activateurs ou inhibiteurs. La co-expression des récepteurs activateurs et inhibiteurs par la majorité des cellules du système immunitaire inné et adaptatif, permet d'établir un seuil de déclenchement de la réponse immune. Parmi ces récepteurs, on trouve les FcRs, et en particulier les FcγRs, dont les ligands principaux sont les IgG, l'isotype majoritaire retrouvé dans le sang. Mis à part leurs fonctions effectrices via leur interaction avec les FcγRs activateurs, les IgG ont également des fonctions régulatrices anti-inflammatoires par l'intermédiaire de FcRs inhibiteurs [38]. Ainsi, les anticorps (en particulier les IgG), via différents types de récepteurs, sont capables de moduler les phases afférentes pro-inflammatoires et efférentes anti-inflammatoires de la réponse immune.

### 1.6.1. Fonctions effectrices des IgG

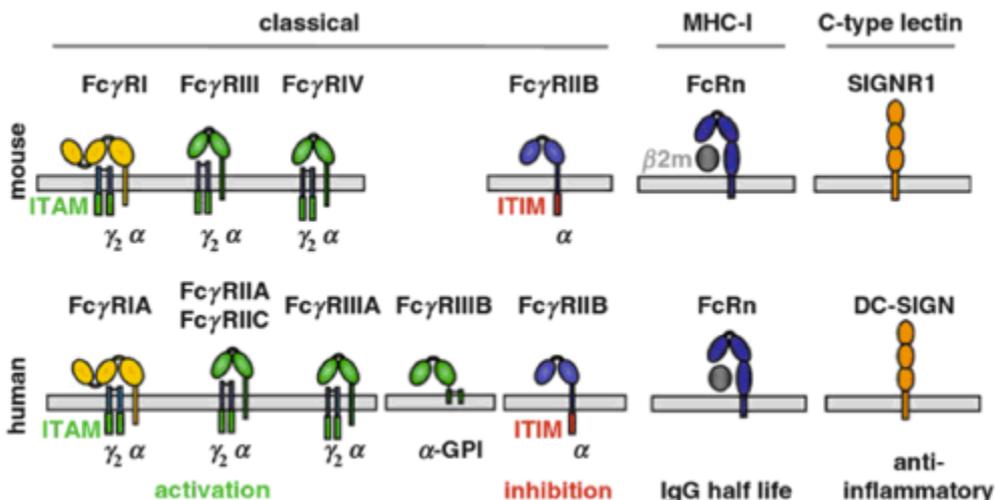
Les IgG sont produites à la suite d'une infection ou à cause de la présence d'éléments étrangers dans l'organisme. La première fonction des IgG est de se lier à l'antigène pour le neutraliser. Cette liaison s'effectue grâce au fragment Fab et met en jeu l'interaction entre le paratope de l'anticorps et l'épitope de l'antigène. Cette interaction non covalente implique entre 6 à 20 acides aminés et fait intervenir différents types de liaisons de faible énergie (forces de Van der Waals, électrostatiques, liaisons hydrogènes, groupements hydrophobes) [39, 40]. La fixation de l'anticorps sur l'antigène a deux fonctions principales : (1) le blocage de l'activité biologique de l'antigène (e.g. neutralisation de la nocivité d'une toxine), (2)

l'élimination de l'antigène grâce aux effecteurs immunitaires. La première fonction est assurée par le fragment Fab, la deuxième par le fragment Fc (Figure 7). La région Fc médie les fonctions effectrices des anticorps en activant des voies cytotoxiques dépendantes de cellules immunitaires (cellules NK, Granulocytes) ou du complément [41]. Ces phénomènes sont nommés ADCC (pour *Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*) et CDC (pour *Complement Dependent Cytotoxicity*). La CDC met en jeu l'interaction entre le Fc et la protéine C1q du complément. La liaison du fragment C1q sur le Fc permet d'activer la cascade du complément, ce qui abouti à la formation d'un complexe d'attaque membranaire et à la lyse de la cellule cible [42]. Le complément peut également potentialiser l'ADCC via la protéine iC3b et son récepteur CR3 (CD11b / CD18) qui est exprimé par les phagocytes et les cellules NK [43]. Dans ce cas, on parle de CDCC pour *Complement Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*. Le processus d'ADCC, quant à lui, implique les Fc $\gamma$ Rs qui comptent six membres chez l'homme et quatre chez la souris (Figure 8) [44]. Ces récepteurs sont caractérisés par leurs affinités variables pour les différentes sous-classes d'IgG et par leur fonction activatrice ou inhibitrice [45]. Il n'existe qu'un seul récepteur inhibiteur chez l'homme et la souris, le Fc $\gamma$ RIIb, qui présente une affinité moyenne à faible pour les IgG. Autre cas particulier, le Fc $\gamma$ RI est le seul récepteur de haute affinité ( $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  M) capable de fixer des IgG monomériques ( $\gamma$ 1 et  $\gamma$ 3 chez l'homme ;  $\gamma$ 2a chez la souris). Tous les autres Fc $\gamma$ Rs présentent une affinité 100 à 1000 fois supérieure pour les IgG et requièrent la fixation de complexes immuns pour être activés [46]. L'affinité faible de la majeure partie des Fc $\gamma$ Rs pour les IgG empêche l'activation non spécifique de signaux inflammatoires par des IgG monomériques (non complexées à leur antigène) présentes en fortes quantités dans le sérum. Comme mentionné précédemment, les Fc $\gamma$ Rs activateurs et inhibiteurs sont généralement co-exprimés par les cellules immunitaires (macrophages, polynucléaires, cellules dendritiques, monocytes, mastocytes) [47]. Cependant, il existe des exceptions : les L<sub>B</sub> qui expriment sélectivement le Fc $\gamma$ RIIb, les L<sub>T</sub> qui n'expriment pas de Fc $\gamma$ Rs et les cellules NK qui expriment sélectivement le récepteur activateur Fc $\gamma$ RIIIa. D'ailleurs, l'ADCC est généralement médiée par les cellules NK grâce au récepteur Fc $\gamma$ RIIIa qui, une fois activé, permet le relargage de médiateurs cytotoxiques (granzyme B, perforine, granulysine) induisant la mort cellulaire. Par ailleurs, le potentiel cytotoxique des IgG n'est pas équivalent et dépend fortement de la sous-classe. Ceci s'explique par les différentes affinités des IgG1, 2, 3 et 4 pour les Fc $\gamma$ Rs activateurs et inhibiteurs [48, 49]. Un ratio « activation/inhibition » (A/I ratio) peut être calculé pour chaque sous classe en comparant les affinités pour les récepteurs

activateurs avec celles pour le FcγRIIb. Ces ratios de liaison, spécifiques à chaque isotype d'IgG, sont prédictifs des activités effectrices *in vivo* [48]. Enfin, les antigènes ou pathogènes tapissés par des anticorps peuvent également être internalisés puis détruits par des phagocytes ou bien présentés via les molécules du CMH I ou II (cellules dendritiques) [50, 51]. Ce phénomène met en jeu les FcγRs activateurs (FcγRIIIa et RIIa principalement) et est nommé ADCP pour *Antibody Dependent Cell-mediated Phagocytosis*.



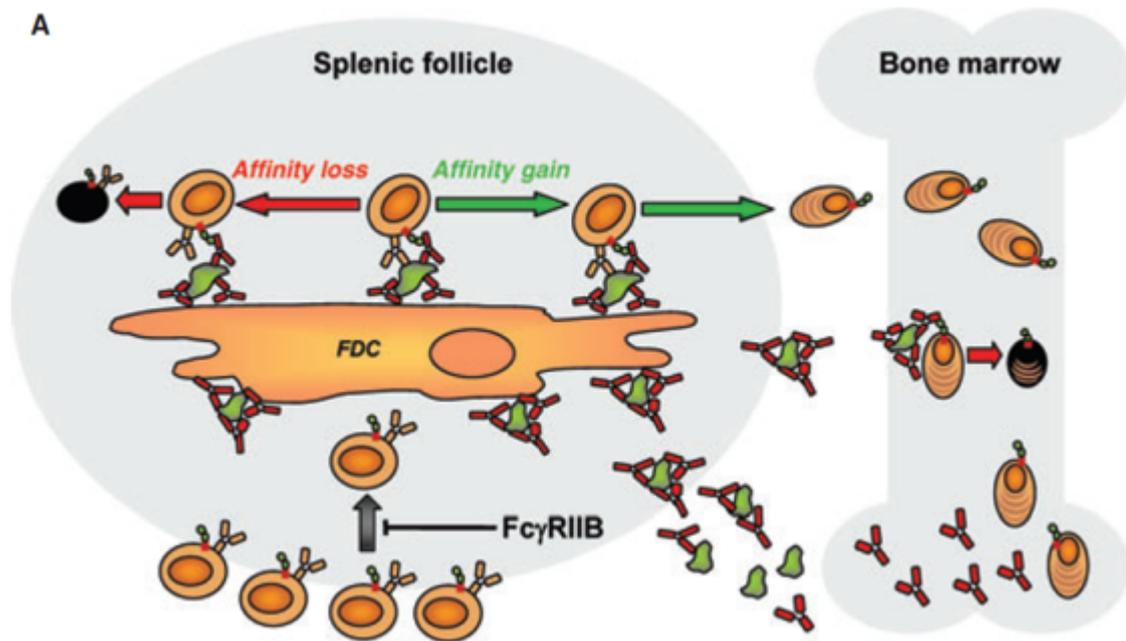
**Figure 7. Mécanismes d'action principaux des anticorps.** Les anticorps peuvent éliminer les antigènes de différentes façons. Les antigènes de petite taille (toxines, xénobiotiques, allergènes) sont neutralisés puis détruits par les phagocytes. Les antigènes plus gros (pathogènes) sont reconnus par les anticorps puis éradiqués par l'intermédiaire d'effecteurs cellulaires (cellules cytotoxiques, phagocytes) ou moléculaires (le système du complément). ADCC : *Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity* ; CDC : *Complement Dependent Cytotoxicity* ; CAM : Complexe d'Attaque Membranaire. Schéma modifié à partir de Abès *et al.* 2009.



**Figure 8. Famille étendue des récepteurs Fcγ humains et murins.** Chez l'homme et la souris il existe plusieurs récepteurs activateurs et un seul inhibiteur, le FcγRIIb. Chez l'homme, le FcγRIIIB est le seul à comporter une ancre GPI et est sélectivement exprimé par les neutrophiles. Le récepteur FcRn, responsable de la demi-vie des anticorps, appartient à la famille des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH I). Le récepteur murin SIGNR1 et son orthologue humain DC-SIGN ont récemment été identifiés comme des récepteurs pour les IgG comportant des oligosaccharides riches en acides sialiques terminaux. D'après [44].

### 1.6.2. Régulation de la réponse immune humorale par les IgG et les FcγRs

En se fixant sur les FcγRs, les anticorps sont capables d'induire de puissantes réactions pro-inflammatoires, nécessaires pour l'élimination des pathogènes, mais pouvant également aboutir à des pathologies auto-immunes en l'absence de mécanismes régulateurs efficaces. Depuis quelques années, des études ont permis d'élucider en partie les points de contrôle centraux et périphériques responsables de la régulation de la réponse immunitaire humorale [52]. Ces études convergent vers le fait que les acteurs moléculaires responsables de la régulation de l'activité des cellules B, comportent ou interagissent avec des protéines contenant des motifs peptidiques ITIM, comme le FcγRIIb [53, 54]. Ce récepteur, exprimé à la surface de la majorité des cellules immunitaires (à l'exception des cellules NK et des L<sub>T</sub>), a récemment été identifié comme un élément clé dans la régulation de l'activité des cellules B sécrétrices d'anticorps, car il constitue un point de contrôle périphérique tardif pour la tolérance humorale. En effet, des données récentes indiquent que le récepteur FcγRIIb régule la survie des cellules B activées et des plasmocytes [55, 56]. Le FcγRIIb permettrait d'éliminer les L<sub>B</sub> « peu affins » ou auto-réactifs générés lors du processus de maturation d'affinité : alors que les clones B possédant un BCR de haute affinité reçoivent des signaux à la fois du BCR et du FcγRIIb (via les complexes immuns présentés à la surface des cellules dendritiques folliculaires), les clones non pertinents (peu affins ou auto-réactifs) ne reçoivent que le signal inhibiteur du FcγRIIb et sont éliminés (Figure 9) [57]. Ainsi, ce mécanisme permettrait la sélection de clones B produisant des anticorps de haute affinité contre l'antigène tout en empêchant l'émergence de clones auto-réactifs lors du processus d'hypermutation somatique. Ce modèle est appuyé par l'étude de souris KO pour le récepteur FcγRIIb : de telles souris produisent des taux plus élevés d'anticorps de faible affinité et donc de spécificité plus large [58]. De plus, ces souris sont également plus sujettes au développement de maladies auto-immunes [59]. Chez l'homme, on constate également une plus faible expression du récepteur chez des patients atteints de pathologies auto-immunes humérales [60, 61], prouvant ainsi l'importance du FcγRIIb dans la régulation de la production des anticorps par les L<sub>B</sub> [38]. Concernant les plasmocytes, qui n'expriment plus le BCR à leur surface mais toujours le FcγRIIb, les complexes immuns produits à la suite d'une réponse immunitaire seraient capables de se fixer à ces cellules et d'induire leur apoptose, permettant ainsi de terminer la réponse humorale. Ce phénomène permettrait également de libérer l'accès à des niches hématopoïétique au niveau de la moelle osseuse qui pourraient ainsi accueillir et assurer la survie prolongée de nouveaux plasmocytes.

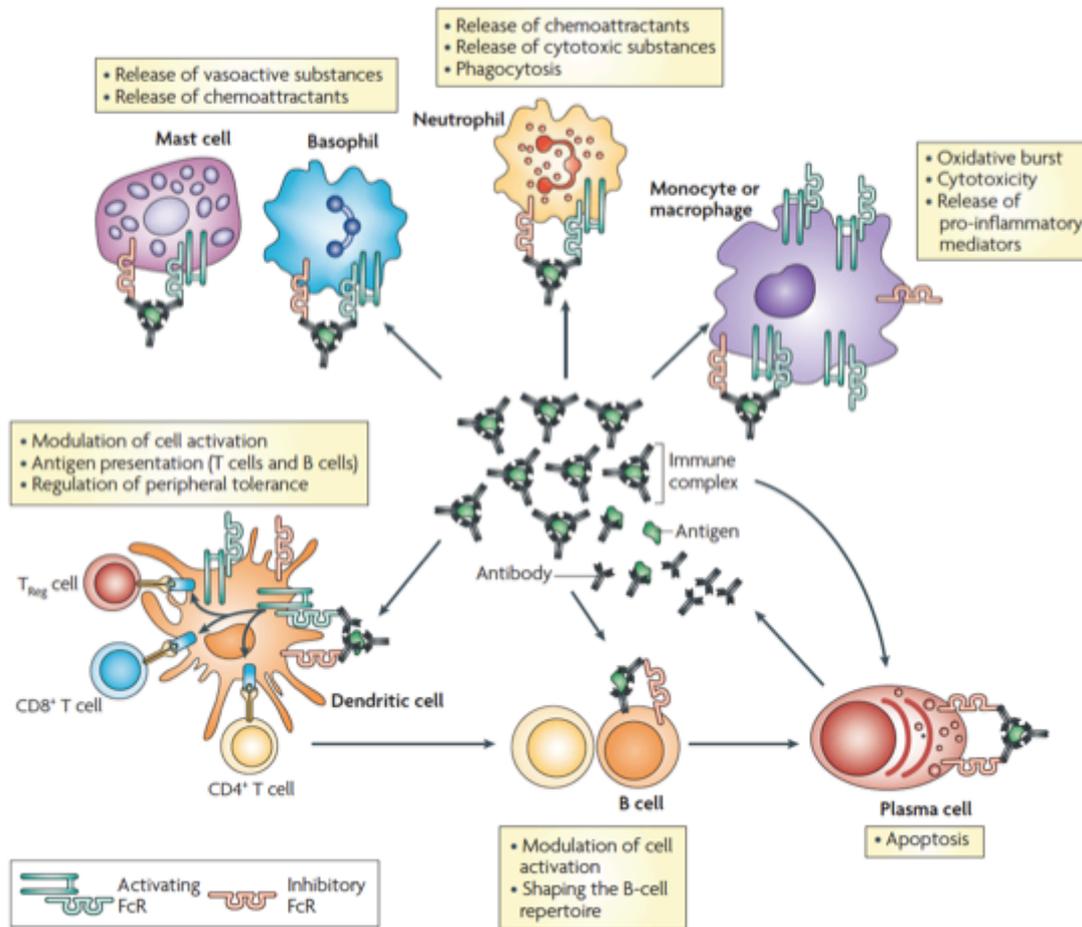


**Figure 9. Modulation de l'activité des cellules B par les IgG et le FcγRIIb.** Dans les centres germinatifs des ganglions ou de la rate, les L<sub>B</sub> activés prolifèrent et subissent le processus d'hypermutation somatique afin de générer des anticorps de haute affinité pour l'antigène. Au contact des cellules dendritiques folliculaires (FDC) arborant les complexes immuns, les L<sub>B</sub> qui possèdent un BCR de haute affinité s'engagent dans la différenciation en plasmocytes alors que les clones de faible affinité sont éliminés, ne recevant que le signal pro-apoptotique du FcγRIIb. Dans la moelle osseuse, les complexes immuns induisent l'apoptose des plasmocytes via le FcγRIIb, libérant ainsi des niches hématopoïétiques pour les plasmocytes nouvellement générés. D'après [57]

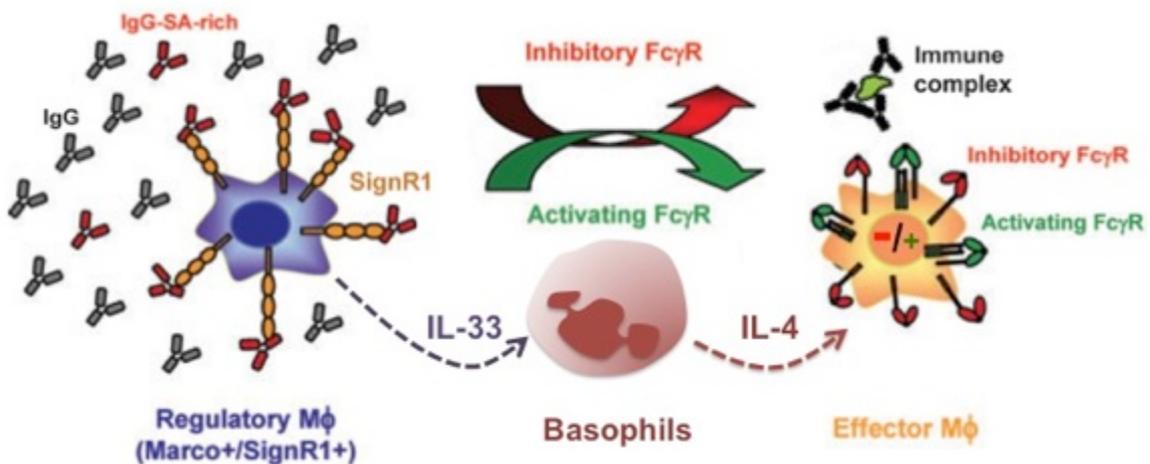
Cette hypothèse est supportée par le fait que des souris déficientes pour le FcγRIIb présentent un nombre plus important de plasmocytes [56]. De plus, il a été montré que l'immunisation de souris, préalablement exposées à un antigène A1, avec un antigène différent A2 réduit le nombre de plasmocytes spécifiques de l'antigène A1 d'une manière dépendante du FcγRIIb [56]. Ainsi, via leur interaction avec le récepteur Fc inhibiteur FcγRIIb, les IgG semblent jouer un rôle majeur dans l'homéostasie des cellules B activées en régulant la quantité (plasmocytes) et la qualité (sélection d'anticorps de haute affinité) des anticorps nouvellement produits. Par ailleurs, étant donné l'expression étendue des récepteurs FcγRs dans les cellules hématopoïétiques, les IgG (sous forme de complexes immuns) constituent des molécules régulatrices clés de la réponse immune permettant d'établir un lien entre les compartiments immunitaires humoral et cellulaire. En particulier, l'interaction des IgG avec le récepteur inhibiteur FcγRIIb impose un seuil de déclenchement qui régule ainsi l'activation de la majeure partie des cellules immunitaires (Figure 10) [64, 65].

### 1.6.3. Activités anti-inflammatoires des IgG

On sait depuis presque 20 ans que l'injection de fortes doses d'IgG (IVIg) permet de traiter certaines maladies auto-immunes et que la portion Fc des anticorps joue un rôle majeur dans cet effet [66]. Pour expliquer ceci, plusieurs modèles ont été proposés dont la saturation du FcRn (augmentant ainsi l'élimination des auto-anticorps) [67] ou le blocage des FcγRs activateurs [68]. Cependant, le mécanisme le plus vraisemblable, à la lumière des connaissances actuelles, implique un nouveau récepteur spécifique des IgG riches en acides sialiques, le récepteur SIGN-R1 (DC-SIGN chez l'homme). En effet, il a été montré que l'effet anti-inflammatoire de la thérapie IVIg est en fait dû à la fraction d'anticorps présentant de forts taux d'acide sialique dans la préparation d'IgG injectée aux patients [69]. Ces anticorps fortement sialylés se fixent faiblement sur les FcγRs classiques, mais sont capable de lier le récepteur SIGN-R1 avec une affinité de l'ordre du micromolaire [70, 71]. Ce récepteur est exprimé à la surface des macrophages de la zone marginale des follicules spléniques, cellules identifiées comme responsables de l'effet anti-inflammatoire observé [72]. Cependant, il est assez improbable que ces cellules spécifiques puissent entrer en contact direct avec les cellules effectrices au niveau du site inflammatoire. En accord avec cette hypothèse, il a récemment été montré que l'effet anti-inflammatoire implique la sécrétion de cytokines (IL-33 par les macrophages puis IL-4 par des basophiles) induisant simultanément une surexpression du récepteur FcγRIIb et une diminution de l'expression des récepteurs Fc activateurs dans les cellules effectrices du site inflammatoire [73]. Ainsi, le seuil d'activation des cellules effectrices se trouve grandement augmenté et entraîne l'arrêt de la réaction inflammatoire (Figure 10). Chez l'homme, le récepteur DC-SIGN (orthologue de SIGN-R1) est aussi capable de fixer les IgG riches en acides sialiques mais est exprimé abondamment par les cellules dendritiques, suggérant une implication de ces cellules dans l'effet anti-inflammatoire des IgG [71]. En résumé, ce modèle indique que l'état de glycosylation des IgG circulantes (en particulier la présence d'acides sialiques) permet de réguler le processus inflammatoire. Des macrophages exprimant SIGN-R1 jouent le rôle de senseur des IgG fortement sialylées et maintiennent un état stationnaire anti-inflammatoire via la synthèse de cytokines, qui régulent l'expression des FcγRs activateurs et inhibiteurs sur les cellules effectrices de l'immunité innée. Lors de processus inflammatoires chroniques (comme dans les maladies auto-immunes), la fraction d'IgG riches en acides sialiques est réduite, levant ainsi le frein anti-inflammatoire maintenant les effecteurs immunitaires au repos [57].



**Figure 10. Activités régulatrices des complexes immuns.** Les IgG sous forme de complexes immuns participent à la régulation d'une grande partie des cellules immunitaires via leur interaction avec les Fc $\gamma$ Rs. Les IgG régulent les fonctions cytotoxiques et pro-inflammatoires des cellules de l'immunité innée comme les macrophages, les granulocytes et les mastocytes. Par le biais des cellules dendritiques, les complexes immuns participent à la régulation de la réponse cellulaire adaptative. Sur les cellules B et les plasmocytes, l'expression sélective du récepteur Fc inhibiteur permet de moduler et d'adapter la réponse humorale. D'après [47].



**Figure 11. Modèle expliquant le rôle anti-inflammatoire des IgG.** A l'état de repos, la fraction d'IgG riches en acides sialiques interagit avec le récepteur SIGNR1 à la surface des macrophages régulateurs de la zone marginale de la rate, ce qui induit la synthèse d'IL-33. L'IL-33 stimule ensuite l'expansion de basophiles sécrétant de l'IL-4, une cytokine permettant d'augmenter l'expression du Fc $\gamma$ RIIb et donc d'inhiber l'activité de macrophages effecteurs au niveau du site inflammatoire. En cas d'inflammation chronique, comme dans les maladies auto-immunes, la fraction d'IgG riches en acides sialiques est réduite. Ainsi, les Fc $\gamma$ Rs activateurs deviennent majoritaires sur les cellules effectrices qui sont, par conséquent, constamment activées par les nombreux complexes immuns présents sur le site inflammatoire. Schéma modifié à partir de [57].

## 1.7. Caractéristiques pharmacodynamiques et pharmacocinétiques particulières

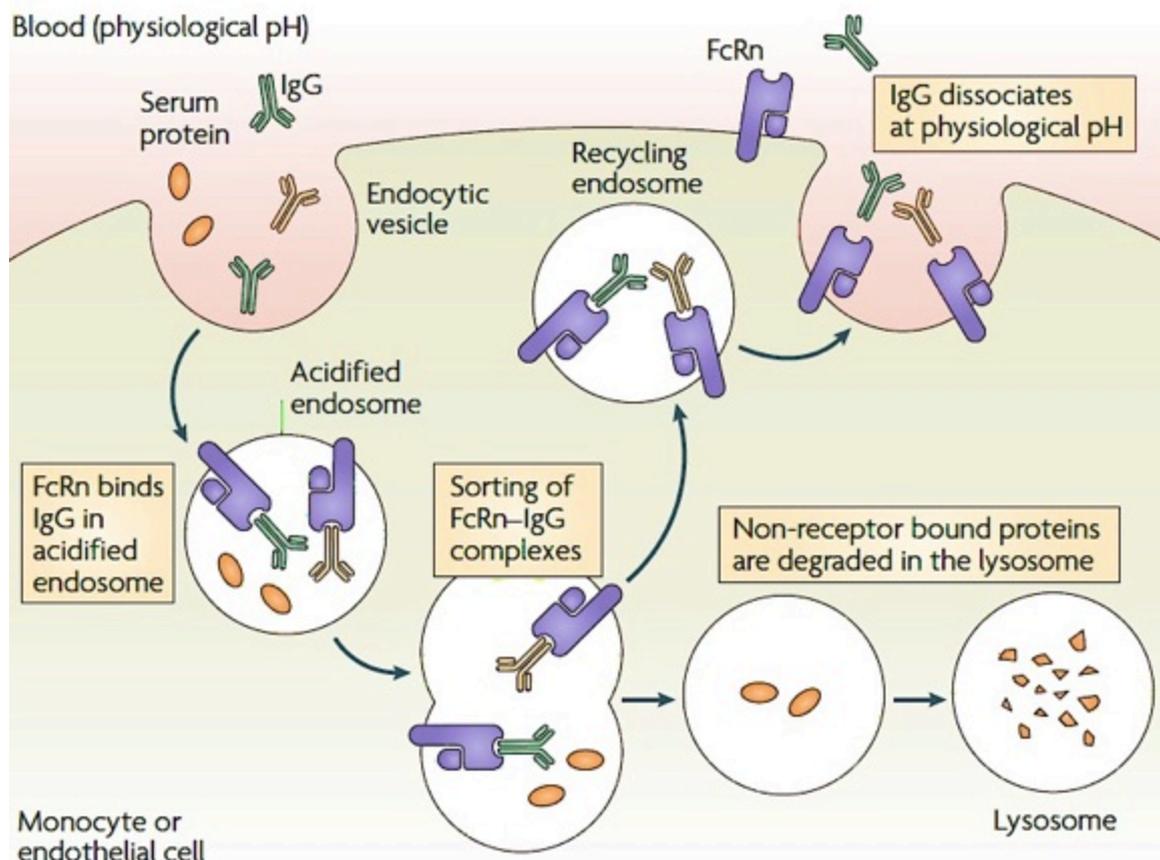
### 1.7.1. Affinité / Avidité

La force de l'interaction antigène / anticorps (mais aussi de toute interaction protéine ligand) se mesure par un paramètre appelé affinité [74]. L'affinité d'un anticorps peut se définir comme la somme des forces de liaison et de répulsion entre un épitope et un paratope. Elle correspond en fait au ratio entre la vitesse de dissociation ( $k_{off}$ ) et la vitesse d'association ( $k_{on}$ ) d'un paratope pour un épitope, lorsque l'interaction antigène / anticorps atteint un équilibre. La valeur du ratio à l'équilibre, appelée affinité ou constante de dissociation ( $K_D = k_{off}/k_{on}$ ), représente la concentration molaire d'antigène nécessaire pour occuper 50% des paratopes. Dans des conditions physiologiques, les anticorps sont au minimum bivalents et les antigènes sont eux aussi souvent multivalents (bactéries, virus, cellules tumorales,...). Cette multivalence influence fortement les interactions antigènes / anticorps. Ainsi, le paramètre d'affinité n'est souvent pas représentatif de la réalité physiologique, son calcul ne tenant compte que d'une interaction unique monovalente [75]. Par conséquent, dans un contexte physiologique, on préfère parler d'avidité (ou affinité fonctionnelle) de l'anticorps pour sa cible, ce qui représente la combinaison des affinités de chaque liaison paratope / épitope sur un antigène (on a potentiellement 2 liaisons pour une IgG, 10 pour une IgM). La relation affinité-avidité n'est pas linéaire en fonction de la valence (une IgG n'est pas deux fois plus avide qu'un Fab), la multivalence a en fait une influence beaucoup plus importante sur l'avidité. A titre d'exemple, on estime que l'avidité est augmentée d'un facteur 1000 pour un anticorps bivalent et d'un facteur  $10^7$  pour une IgM [75]. Ainsi, en dépit de leurs affinités souvent faibles, les IgM peuvent parfois présenter une avidité plus forte que des IgG ayant subi le processus de maturation d'affinité. Cependant, les IgM sont souvent moins spécifiques que les IgG, et ce à cause de l'affinité faible de chacun des paratopes pour l'épitope, ce qui entraîne la reconnaissance potentielle de plusieurs antigènes différents possédant des épitopes de séquence ou de structure proches (phénomène de « réaction croisée »).

### 1.7.2. Demi-vie et biodistribution

Les immunoglobulines G sont des protéines remarquables par leur stabilité dans la circulation sanguine (demi-vie) qui est d'environ 20 jours, à l'exception des IgG3 qui ne persistent pas plus d'une semaine. Cette longue demi-vie est assurée par le recyclage des IgG circulantes grâce au récepteur FcRn (n pour néonatal) exprimé par l'endothélium vasculaire

[76]. Le FcRn interagit avec les IgG à l'interface des domaines C<sub>H2</sub> et C<sub>H3</sub> de la portion Fc indépendamment de la présence ou de la composition du motif oligosaccharidique greffé sur l'asparagine 297 [77]. Les IgG se fixent au FcRn à pH acide (pH<6,5), à l'intérieur d'endosomes résultant de l'activité pinocytosique des cellules. Ces endosomes sont ensuite recyclés vers la surface cellulaire et libèrent les IgG qui se détachent du FcRn à pH physiologique (7,4). Ainsi, dans le cas de cellules endothéliales, les IgG sont recyclées vers la circulation ou relarguées dans les tissus sous-jacents par transcytose. Ce processus permet de maintenir une concentration élevée d'IgG dans la circulation et d'assurer leur distribution dans les tissus de l'organisme. Le FcRn est également exprimé dans d'autres organes : il intervient dans le passage transplacentaire des IgG [78], probablement dans l'immunité mucoale intestinale [79] et dans l'exclusion des IgG du système nerveux central et des urines [80, 81].

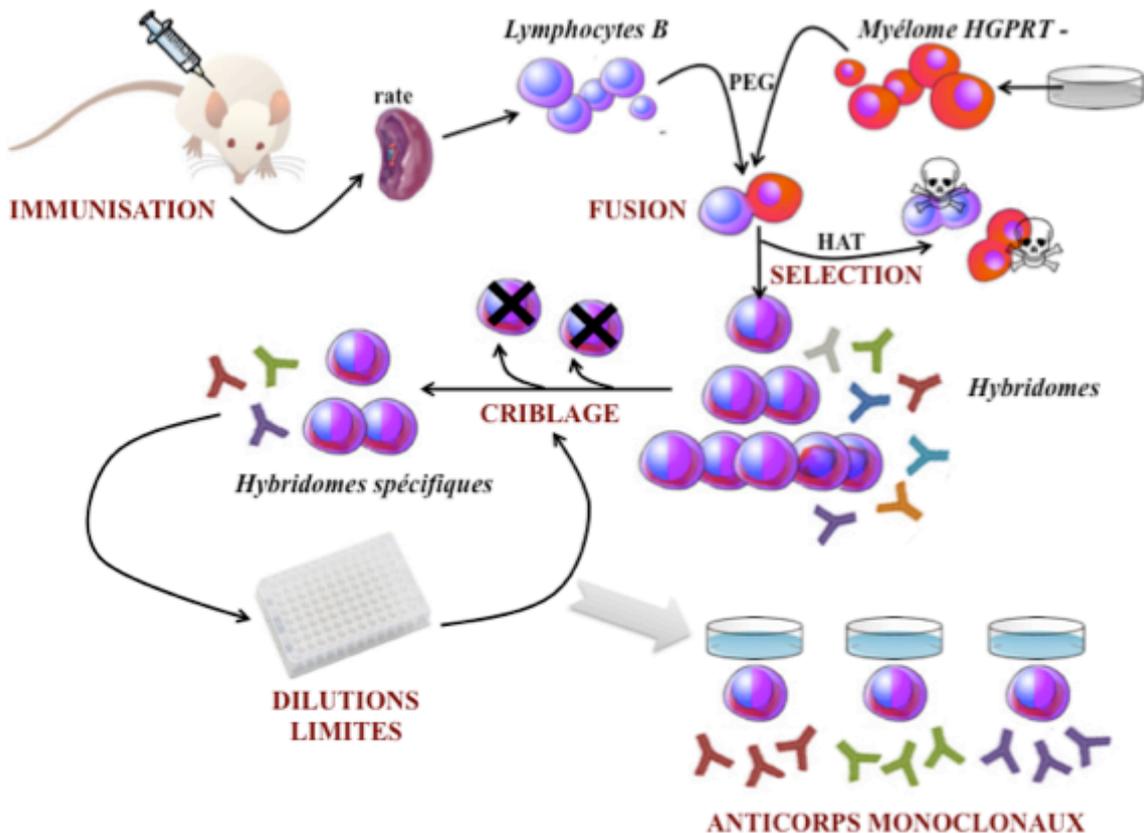


**Figure 12. Recyclage des IgG grâce au FcRn.** Le FcRn exprimé par les cellules de l'endothélium vasculaire permet d'assurer la longue demi-vie des IgG. Les IgG circulantes sont captées par les cellules endothéliales dans des vésicules d'endocytose et se fixent au FcRn à pH acide (< 6,5) dans les endosomes. Les complexes IgG / FcRn sont séparés des autres protéines endocytées et orientés vers des endosomes de recyclage qui vont fusionner avec la membrane plasmique. Au pH physiologique, l'interaction IgG / FcRn est rompue et les IgG sont libérées dans la circulation. D'après [82].

## 2. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques

### 2.1. Historique

La première utilisation des anticorps pour la thérapie remonte à 1890, lorsque Emil Von Behring et Shibasaburo Kitasato découvrirent que l'état d'immunité conféré par l'injection d'une faible dose de toxine diphtérique pouvait être communiqué à des individus naïfs par transfert de sérum [83]. C'est ainsi que naissait la sérothérapie, qui fut une véritable révolution thérapeutique et médicale, encore utilisée aujourd'hui pour neutraliser des toxines suite à des infections bactériennes ou à des envenimations. L'activité neutralisante des antisera fut rapidement attribuée aux anticorps (un terme initialement utilisé par Paul Ehrlich en 1891), gamma globulines du sérum, dont la structure fut élucidée partiellement en 1950 par Rodney Porter [84, 85]. Parallèlement, en 1948, Astrid Fagraeus montra que des cellules B spécialisées, les plasmocytes, étaient responsables de la biosynthèse des anticorps *in vivo* [86]. C'est dans ce contexte, qu'en 1975, César Milstein et Georges Köhler réussirent à développer une technique permettant de produire des anticorps *in vitro*, à partir de cellules hybrides résultant de la fusion entre des lymphocytes B murins et un myélome de la même espèce [87] (Figure 13). Chaque clone cellulaire hybride, une fois isolé, produit le même anticorps qui est donc qualifié de monoclonal. La mise au point de ce procédé résulte en fait de la combinaison des travaux de Georges Barski sur la production de cellules hybrides, de Michael Potter sur l'établissement de lignées myélomateuses murines *in vitro*, de Yoshio Okada sur la fusion cellulaire par le virus de Sendai et de John Littlefield sur des cellules comportant des déficiences enzymatiques [88-91]. Grâce à cet ensemble d'avancées techniques, Köhler et Milstein ont donc réussi à fusionner des splénocytes provenant de souris immunisées avec un myélome murin déficient pour une enzyme nécessaire à la biosynthèse des nucléotides par la voie de sauvetage (opposée à la voie *de novo*), l'HGPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase). Cette déficience enzymatique permet de sélectionner facilement les cellules hybrides (ou hybridomes) grâce à un agent de sélection ajouté au milieu de culture, l'aminoptérine. Celle-ci bloque la seule voie de biosynthèse des nucléotides qu'il reste aux cellules myélomateuses non fusionnées (la voie *de novo*), permettant d'une part, d'induire la mort de ces cellules, et d'autre part, de sélectionner par complémentarité génique les hybridomes issus de la fusion cellulaire. Le milieu de culture sélectif contient également de l'hypoxanthine qui assure la synthèse des bases puriques le temps que la complémentarité se mette en place, et de la thymidine qui permet de compenser



**Figure 13. Production des anticorps monoclonaux d'après Köhler et Milstein.** Initialement, la fusion a été réalisée grâce au virus de Sendai. Depuis, le polyéthylène glycol est classiquement utilisé pour fusionner les cellules. Le milieu HAT (Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine) permet d'éliminer les cellules non hybrides.

l'effet antagoniste indésirable de l'aminoptérine sur la thymidylate synthase. Le milieu sélectif est communément appelé milieu « HAT » pour Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine (Figure 13). Les lymphocytes B non fusionnés vont, quant à eux, disparaître au bout de quelques jours puisqu'ils sont incapables de se multiplier *in vitro*. Les hybridomes ainsi sélectionnés ont donc : (1) la capacité de se multiplier indéfiniment, (2) la capacité de sécréter des anticorps. L'obtention de clones uniques sécrétant des anticorps monoclonaux spécifiques pour la cible nécessite des étapes supplémentaires de dilutions limites pour atteindre un stade clonal, et de criblage pour vérifier la liaison spécifique à l'antigène.

Depuis 1975, la découverte de Köhler et Milstein a largement été utilisée pour générer des anticorps monoclonaux utilisés en recherche, pour le diagnostic médical et pour la thérapie de diverses pathologies. En 1986, le premier anticorps monoclonal thérapeutique murin est accepté par la FDA (Food and Drug Administration). Cet anticorps, le muromonab (Orthoclone OKT3™), est dirigé contre le récepteur CD3 des lymphocytes T et s'est révélé efficace pour limiter les réactions inflammatoires à l'origine des rejets lors des transplantations d'organes [92]. Néanmoins, le développement d'autres anticorps thérapeutiques murins a, depuis cette date, été limité à cause de la présence d'effets

secondaires importants. En effet, une utilisation chronique d'anticorps murins chez l'homme induit le déclenchement de réponses immunitaires avec la production d'anticorps humains anti-souris ou HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies) [93]. Ces anticorps diminuent grandement l'efficacité des anticorps thérapeutiques et peuvent déclencher des réactions d'hypersensibilité importantes pouvant parfois aller jusqu'au choc anaphylactique. De plus, le caractère murin des anticorps diminue leur demi-vie sérique et leurs fonctions effectrices potentielles à cause d'interactions non optimales avec les FcRs humains.

## *2.2. Les différentes générations d'anticorps thérapeutiques*

Compte tenu des effets secondaires importants dus à l'utilisation des anticorps thérapeutiques murins, il a été indispensable de développer rapidement d'autres types d'anticorps « plus humains » pour pallier ces problèmes. Les progrès des technologies liées à l'ADN recombinant et à l'ingénierie des protéines ont permis de générer successivement des anticorps chimériques, humanisés puis totalement humains, redonnant ainsi un nouvel essor à l'utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux (voir les revues [94, 95], Figure 14).

### **2.2.1. Les anticorps murins**

Les anticorps thérapeutiques murins sont aujourd'hui les moins nombreux sur le marché à cause des nombreux effets secondaires qu'ils déclenchent [96]. Ils sont utilisés rarement, en cas d'échec des autres traitements. Pour limiter les réactions immunitaires HAMA, les anticorps murins peuvent être utilisés sous forme de fragment Fab ou Fab'2 comme cela est le cas pour le Metuximab (approuvé en Chine), un fragment Fab'2 radiomarqué indiqué pour le traitement des hépatocarcinomes. Pour des applications en oncologie, les anticorps murins peuvent être couplés à des toxines ou à des radioisotopes afin d'améliorer leur efficacité et ainsi limiter les doses et la répétition des injections (Ibritumomab, Tositumomab). Dans certaines indications ne nécessitant pas de traitement chronique (e.g. neutralisation de toxines), l'utilisation d'anticorps murins peut se révéler avantageuse étant donné leur facilité d'obtention comparée aux autres formats décrits ci-après.

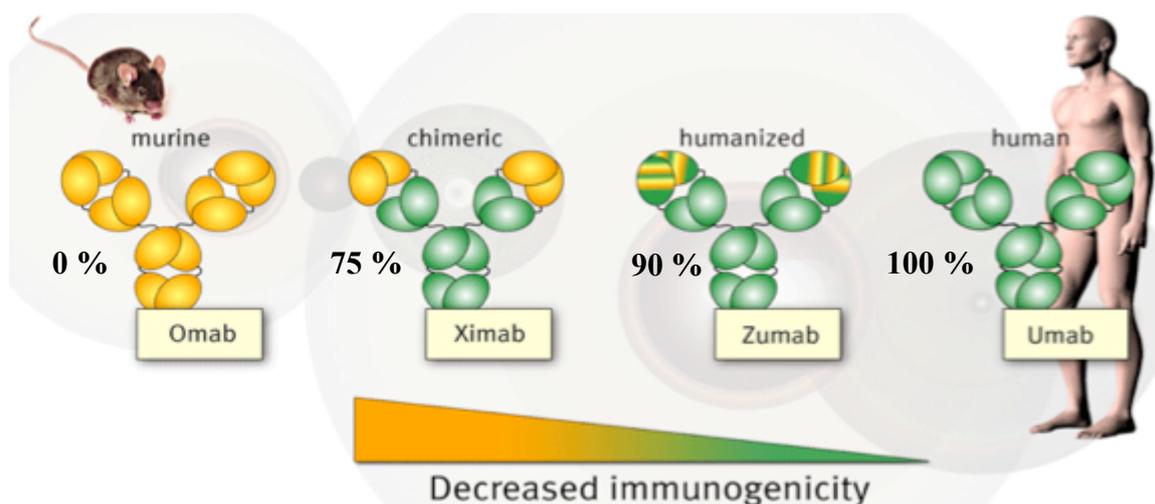
### **2.2.2. Les anticorps recombinants chimériques et humanisés**

Les progrès de la biologie moléculaire dans les années 80-90 ont permis de cloner les gènes codant pour les immunoglobulines. Ainsi, l'obtention d'anticorps monoclonaux via la technique des hybridomes donne désormais accès aux séquences des chaînes lourdes et

légères mais surtout aux séquences des régions variables et hypervariables des anticorps thérapeutiques, qui peuvent donc être clonées puis insérées dans des vecteurs d'expression [97]. Par conséquent, des versions recombinantes des anticorps monoclonaux peuvent être produites par diverses lignées cellulaires, évitant ainsi les problèmes d'instabilité des hybridomes et permettant de greffer les régions variables responsables de la spécificité sur d'autres régions constantes d'immunoglobulines (changement d'isotype, d'espèce).

Dès 1984, des anticorps chimériques comprenant des parties constantes humaines et des parties variables murines sont obtenus [98-99]. Ces anticorps chimériques comportent environ 75% de séquences humaines et un fragment Fc totalement humain. Cette construction permet de diminuer considérablement l'immunogénicité chez l'homme et assure une bonne interaction de l'anticorps avec les FcRs humains, améliorant ainsi la demi-vie et les fonctions effectrices. Le premier anticorps chimérique mis sur le marché fut l'abciximab (Réopro™), en 1994. Depuis, 7 sept anticorps chimériques ont été approuvés dont un en 2011, le Brintuximab vedotin (Adcetris™), qui est un anticorps chimérique conjugué à une toxine (l'auristatine) indiqué pour le traitement des lymphomes. Malgré la proportion réduite de séquences murines, ces anticorps génèrent encore des réactions immunitaires de type HACA (Human Anti-Chimeric Antibodies), responsables d'effets indésirables fréquents chez les patients [96].

Ainsi, d'autres anticorps dits humanisés, ne présentant que 10 % de séquences murines, ont vu le jour dès 1986 [100]. Ces anticorps sont construits en greffant les régions hypervariables murines formant le paratope sur un squelette d'anticorps humain (CDR grafting).



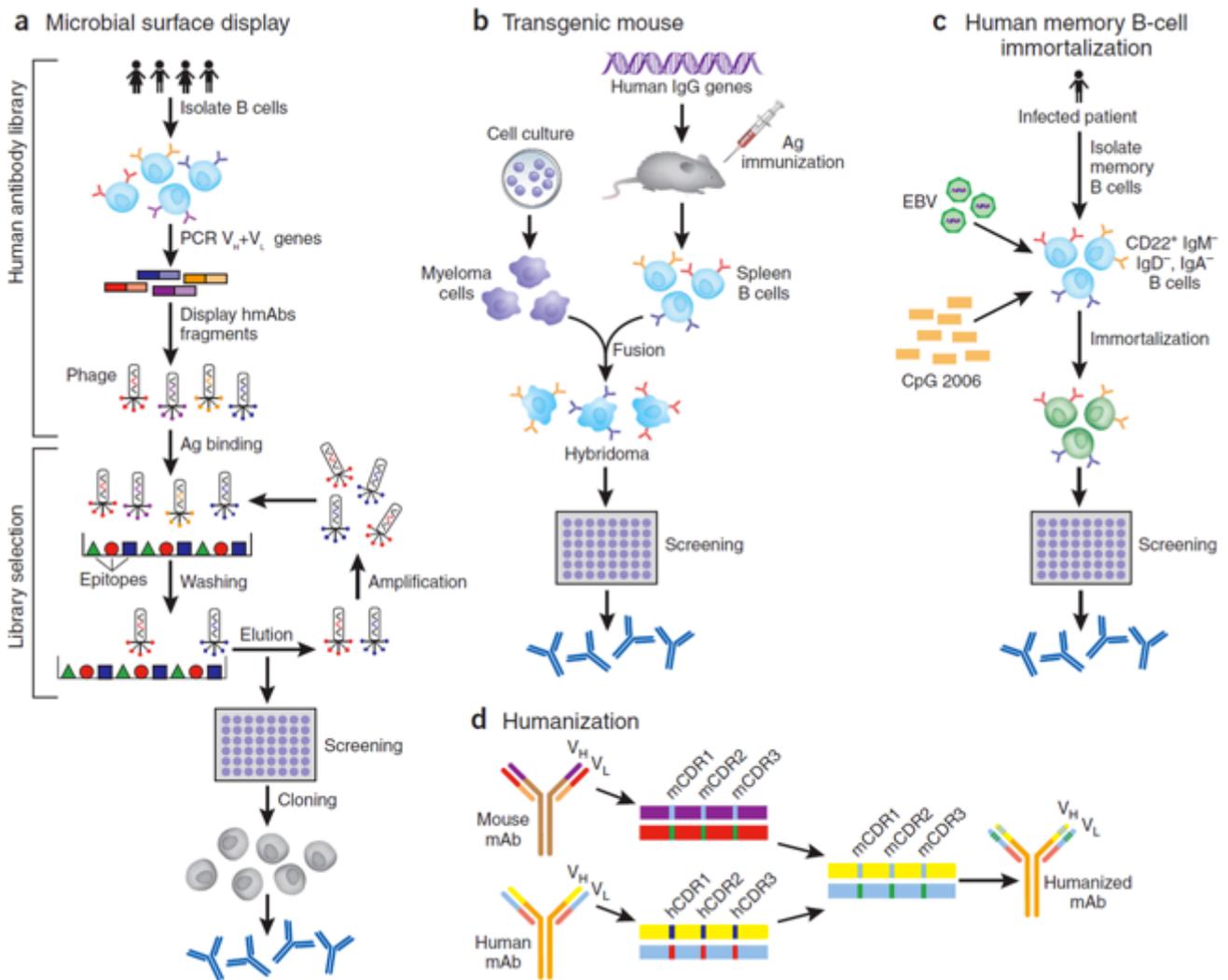
**Figure 14. Les différentes générations d'anticorps thérapeutiques.** En fonction du pourcentage de séquences humaines, on parle d'anticorps murins, chimériques, humanisés et humains, et l'immunogénicité est réduite. Les suffixes appliqués aux noms des anticorps permettent d'identifier les différents types : Omab (murin), Ximab (chimérique), Zumab (humanisé), Umab (humain). Source du schéma : Joost Bakker, Genmab

L'humanisation des anticorps est un processus complexe dont la réussite n'est pas garantie. En effet, le simple greffage des CDRs murins sur un anticorps humain conduit souvent à des anticorps de mauvaise affinité et de faible spécificité pour la cible. Par conséquent, des modifications supplémentaires comme des mutations ponctuelles dans les CDRs ou le transfert d'une ou plusieurs régions FR murines, sont souvent nécessaires pour restaurer l'affinité et la spécificité des anticorps humanisés par rapport à leurs analogues murins [101]. Une seconde stratégie d'humanisation, nommée « resurfacing », consiste à produire tout d'abord un anticorps chimérique puis à muter certains acides aminés dans les régions FR murines (des acides aminés localisés en surface) pour donner à l'anticorps un profil plus humain [102]. Les anticorps chimériques humanisés comportent le double suffixe –Xi et –Zu (e.g. l'Otélizumab). Actuellement, les anticorps thérapeutiques humanisés sont la classe d'anticorps la plus présente sur le marché avec 14 molécules et leur tolérance est généralement satisfaisante.

### **2.2.3. Les anticorps recombinants entièrement humains**

Aujourd'hui, une grande partie des anticorps entrant en phase clinique sont complètement humains et 9 anticorps thérapeutiques humains sont actuellement sur le marché (7 nouvelles approbations depuis 2009). Ces anticorps sont en théorie « transparents » pour le système immunitaire des patients et évitent les réactions d'hypersensibilité observées avec les anticorps contenant encore des fragments murins [96]. Plusieurs méthodologies ont été mises au point pour générer de tels anticorps, totalement humains : une approche cellulaire mettant directement en jeu des lymphocytes B humains, une approche combinatoire impliquant la création de banques de fragments variables d'anticorps (phage display) et une approche génétique avec des souris transgéniques possédant les gènes codant pour les immunoglobulines humaines (Figure 15).

La première méthode à être utilisée fut celle impliquant les L<sub>B</sub> humains. Dès 1970, des essais ont porté sur les possibilités de fusionner des L<sub>B</sub> humains avec un partenaire cellulaire de type myélome [103]. Néanmoins, à la différence de la technique des hybridomes chez la souris, des difficultés pour fusionner et stabiliser les L<sub>B</sub> hybrides sont apparues. De plus, peu de myélomes humains sont disponibles et adaptés à la fusion avec des L<sub>B</sub> humains [104]. Par conséquent, d'autres approches d'immortalisation ont été testées. En particulier, l'utilisation du virus d'Epstein-Barr (EBV) s'est révélée relativement efficace [105] et a permis de générer des anticorps monoclonaux contre divers antigènes, notamment contre des virus [106, 107].



**Figure 15. Méthodes permettant d'obtenir des anticorps humains et humanisés.** (a) La technique du phage display est prise comme exemple de toutes les méthodes basées sur l'expression de fragments d'anticorps à la surface de microorganismes (phages, bactéries, levures, cellules mammaliennes) ou de ribosomes. Une banque de fragments d'anticorps (scFv, Fab) est constituée à partir de lymphocytes B humains d'individus naïfs ou immunisés, en clonant les régions variables des différents anticorps exprimés par les  $L_B$ . La banque est ensuite exprimée par des phages qui sont sélectionnés pour leur interaction avec la cible d'intérêt par ELISA. Les phages spécifiques de la cible sont ensuite amplifiés, isolés et les gènes codant pour les régions  $V_H$  et  $V_L$  sont insérés dans un vecteur d'expression adapté à la production d'anticorps entiers. L'anticorps totalement humain, spécifique de la cible, est ensuite exprimé par la lignée cellulaire choisie. (b) Les anticorps humains peuvent être produits à partir de souris transgéniques dont les gènes endogènes codant pour les immunoglobulines ont été remplacés par ceux codant pour des immunoglobulines humaines. Après immunisation de ces souris avec l'antigène, on peut obtenir des anticorps humains en suivant la technique classique des hybridomes décrite par Köhler et Milstein. (c) La dernière méthode permettant l'obtention d'anticorps humains passe par l'immortalisation de lymphocytes B mémoires issus d'individus exposés à l'antigène. Les  $L_B$  mémoires sont isolés à partir des leucocytes du sang périphérique puis immortalisés à l'aide du virus Epstein Baar (EBV) en présence de CpGs. Les cellules transformées sécrétant des anticorps sont ensuite sélectionnées et isolées par dilutions limites, ce qui conduit à la production d'anticorps monoclonaux totalement humains. (d) L'humanisation des anticorps est souvent réalisée par la méthode de « CDRs grafting », qui consiste à transférer les régions hypervariables d'un anticorps murin sur un squelette d'anticorps humain, possédant si possible des régions FR homologues à celles de l'anticorps murin d'origine. D'après [108].

Les inconvénients majeurs de cette technique résident dans le faible rendement de l'étape d'immortalisation et dans la difficulté à stabiliser les L<sub>B</sub> immortalisés. De plus, même si l'utilisation de L<sub>B</sub> humains permet de disposer, *a priori*, de l'ensemble du répertoire immunologique, l'obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques d'une cible est grandement favorisée lorsque les L<sub>B</sub> proviennent d'individus immunisés (on peut alors sélectionner des L<sub>B</sub> mémoires) [109], ce qui peut se révéler difficile à obtenir dans le cas de pathogènes très virulents ou peu répandus (Anthrax, Peste, HIV, ricine,...). L'obtention d'anticorps contre des protéines humaines est elle aussi difficile à cause des mécanismes de tolérance éliminant ou inactivant une grande partie des clones B auto-réactifs [110]. Ainsi, des stratégies d'immunisations *in vitro* ont été développées afin d'utiliser des échantillons de L<sub>B</sub> naïfs et pour tenter de contourner la tolérance [111]. Cependant, il est extrêmement difficile de reconstituer *in vitro*, les conditions optimales retrouvées *in vivo* dans un centre germinatif, permettant l'obtention d'anticorps spécifiques de haute affinité. En résumé, malgré d'énormes progrès et des succès dans l'obtention d'anticorps humains (anti-SARS, anti HIV, anti H1N1) [106, 107, 109], la production d'anticorps à partir de L<sub>B</sub> humains reste pour le moment au stade de la recherche et ouvre des perspectives intéressantes concernant l'ingénierie cellulaire des L<sub>B</sub> humains.

Les deux stratégies les plus fréquemment utilisées pour produire des anticorps monoclonaux thérapeutiques entièrement humains sont l'expression de banques combinatoires de fragments d'anticorps à la surface de microorganismes [112] et l'utilisation de souris transgéniques [113]. Actuellement, il existe 2 anticorps sur le marché obtenus par phage display et 7 autres grâce aux souris transgéniques. Le phage display nécessite la constitution d'une banque de fragments variables (V<sub>L</sub> et V<sub>H</sub>), à partir de L<sub>B</sub> de donneurs naïfs ou immunisés, qui vont être associés au hasard puis exprimés à la surface de phages filamenteux en tant que protéine de fusion avec des éléments de l'enveloppe du virus. Ces petits fragments, regroupant seulement les régions variables lourdes et légères, sont appelés scFv pour *single-chain variable fragment* et constituent une des plus petites unités capables de liaison avec l'antigène. Les phages sont ensuite évalués pour leur capacité à lier l'antigène par ELISA : les phages non réactifs sont éliminés par lavages alors que les phages spécifiques sont retenus par l'antigène, élués, puis amplifiés via l'infection de bactéries compétentes. Cette étape est répétée plusieurs fois (éventuellement avec des conditions d'interaction de plus en plus stringentes) pour enrichir le mélange en phages ayant une forte affinité avec la cible (phase de « panning »). Les bactéries infectées par les phages spécifiques peuvent

ensuite être isolées, et les fragments d'anticorps produits dans leurs surnageants étudiés plus en détail en terme d'affinité pour la cible. Cette technique permet de faire un lien direct entre le phénotype de l'anticorps et son génotype contenu dans l'ADN du phage. D'autres microorganismes ont, au fur et à mesure, été employés pour exposer les fragments d'anticorps (Bactéries, Levures, Cellules mammaliennes) [114, 115]. L'utilisation de plusieurs types d'hôtes pour présenter les fragments d'une même banque permet de sélectionner des anticorps différents, suggérant un rôle important des modifications post-traductionnelles, de la renaturation et de la présentation des fragments dans le processus de sélection [116]. De même, le type de fragment exposé à la surface des cellules (scFv, Fab) influence la sélection des anticorps et leur capacité à reconnaître leurs cibles. Par ailleurs, les banques combinatoires ne permettent pas d'atteindre le niveau de diversité observé *in vivo* et excluent toute maturation d'affinité. Néanmoins, elles permettent d'obtenir les plus larges panels d'anticorps pour une même cible (parfois plus de 1000) [117], impossibles à générer avec les autres approches principalement à cause des rendements faibles des étapes de fusion et d'immortalisation. De plus, l'association aléatoire des fragments variables humains  $V_L$  et  $V_H$ , sans aucun mécanisme de contrôle, permet de générer des anticorps contre des protéines humaines d'intérêt pharmacologique, ainsi que des anticorps présentant des propriétés rares (recombinaisons moins fréquentes, chaînes légères lambda). Cependant, les anticorps monoclonaux humains obtenus par cette stratégie nécessitent souvent une optimisation de leur affinité *in vitro* par mutagenèse dirigée [113]. C'est grâce à cette technique de phage display, initialement décrite en 1990 [118], que le premier anticorps humain, l'adalimumab (Humira™), a été mis sur le marché en 2002. Depuis, un second anticorps humain sélectionné par phage display a été approuvé en 2011 (Belimumab / Benlystat™).

Tous les autres anticorps humains actuellement utilisés en clinique proviennent de l'immunisation de souris transgéniques possédant les gènes codant pour les immunoglobulines humaines. Depuis la première description de cette approche en 1994 [119, 120], de nombreux progrès ont été faits, notamment l'insertion d'un nombre plus important de gènes V permettant ainsi d'avoir un répertoire d'anticorps humains plus vaste [113]. La production d'anticorps humains à partir de souris transgéniques est une méthode relativement simple consistant à immuniser les souris avec l'antigène puis à fusionner les splénocytes avec un myélome murin, d'une façon similaire à la technique classique de Köhler et Milstein employée pour générer des anticorps monoclonaux murins. Les anticorps humains produits par les souris transgéniques possèdent de fortes affinités, reflétant une réponse immune

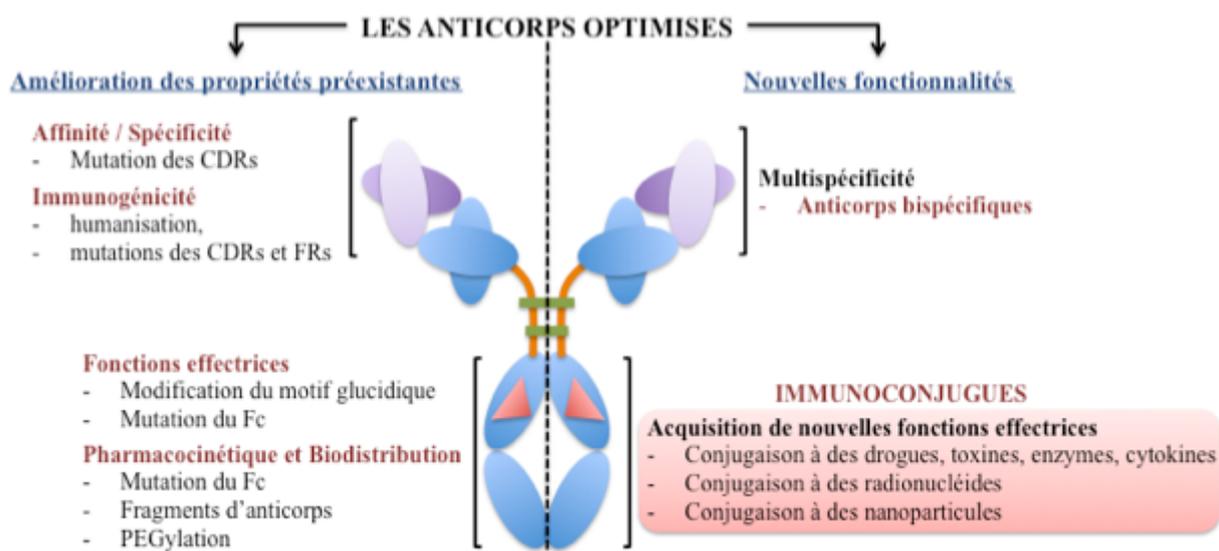
secondaire caractérisée par la maturation d'affinité des anticorps. Ainsi, il n'est en général pas nécessaire d'optimiser l'affinité *in vitro*. De plus, les anticorps étant directement produits sous forme d'immunoglobulines entières (à la différence de l'approche par phage display), ils peuvent être très rapidement sélectionnés en fonction de leurs activités effectrices. Par conséquent, les hybridomes sécrétant les anticorps monoclonaux humains peuvent directement servir à la production de lots utilisables pour des tests précliniques, voire cliniques. Néanmoins, la production en cellules recombinantes de type CHO, NS0 ou Sp2/O est souvent préférée afin d'obtenir des concentrations d'anticorps plus fortes [113]. Parmi les inconvénients de cette approche, on notera les réponses immunitaires généralement plus faibles chez les souris transgéniques par rapport aux souches classiquement utilisées pour produire les anticorps monoclonaux murins, ce qui implique un nombre d'immunisation plus important. Un autre défaut lié à l'utilisation de souris est la faible probabilité d'obtenir des anticorps présentant des réactions croisées avec l'antigène orthologue de souris ou de rat ; ceci peut se révéler très problématique pour réaliser les tests précliniques de toxicité et d'efficacité dans des modèles animaux de pathologies, majoritairement disponibles chez la souris et le rat. Enfin, l'utilisation d'immunogènes toxiques est aussi une limitation pour l'utilisation des souris transgéniques.

Malgré les limitations et les difficultés rencontrées avec chacune des techniques disponibles, les anticorps humains représentent une part importante des essais cliniques et pourraient devenir la classe prédominante d'anticorps sur le marché dans un futur proche [121].

#### **2.2.4. Les anticorps optimisés**

Une des préoccupations majeures avant les années 2000 était d'obtenir des anticorps monoclonaux thérapeutiques mieux tolérés chez l'homme. Ce défi a été relevé, au moins en partie, avec le développement des anticorps humanisés et humains qui sont généralement bien tolérés, même si on observe parfois de faibles réponses HAHA (Human anti-Human Antibodies) pour certains anticorps [122-124]. Depuis, les efforts ont porté sur l'optimisation des propriétés fonctionnelles et/ou biochimiques des anticorps afin d'améliorer leur efficacité et leur sûreté clinique [125]. Ces propriétés incluent l'affinité, la spécificité, les fonctions effectrices, la pharmacocinétique, la biodistribution, l'immunogénicité et la toxicité globale. Ces caractéristiques pharmacologiques peuvent être modulées à façon en jouant sur l'architecture moléculaire des anticorps : mutation des CDRs, changements d'isotype, ingénierie et glyco-ingénierie du fragment Fc, ingénierie de la région charnière, format de

l'anticorps (taille, multivalence, multispécificité, conjugaison à d'autres molécules ou particules). Ainsi, on assiste actuellement au développement d'anticorps dits « optimisés », combinant les avantages apportés par l'humanisation et ceux générés par l'ingénierie structurale des anticorps thérapeutiques. A la différence des anticorps de première génération, les anticorps optimisés sont développés rationnellement afin de s'adapter au mieux à la pathologie et à la stratégie thérapeutique envisagée. Certains anticorps monoclonaux que l'on peut qualifier « d'optimisés » sont déjà sur le marché (le brintuximab vedotin, un immunoconjugué ; l'éculizumab, un anticorps hybride IgG2/IgG4 ou le catumaxomab, un anticorps bispécifique), mais la plus grande partie est encore au stade de la recherche ou dans des phases cliniques précoces. Les différentes stratégies d'optimisation et les formats d'anticorps seront exposés dans la partie 2.4 (voir les revues [94,95, 125, 126]).



**Figure 16. Stratégies utilisées pour améliorer les propriétés pharmacologiques des anticorps.** Il existe deux approches pour optimiser les propriétés pharmacologiques des anticorps : modifier les propriétés préexistantes ou bien conférer de nouvelles propriétés. Dans le premier cas, les domaines constants et variables des anticorps peuvent être modifiés afin d'optimiser les caractéristiques pharmacologiques des anticorps. Des mutations peuvent être introduites dans les régions variables afin de décroître l'immunogénicité, d'améliorer la spécificité et l'affinité pour la cible. De la même manière, la région Fc qui assure les fonctions effectrices des anticorps peut être optimisée afin de moduler le potentiel cytotoxique des anticorps en fonction de la stratégie thérapeutique. Des mutations peuvent augmenter l'affinité du Fc pour les FcγRs activateurs ou le fragment C1q du complément et ainsi favoriser les processus d'ADCC, d'ADCP et/ou de CDC. Enfin, l'utilisation de fragments d'anticorps ou d'anticorps entiers possédant une portion Fc mutée permet de moduler la pharmacocinétique et la biodistribution. Dans le deuxième cas, des molécules ou particules étrangères peuvent être greffées au Fc, permettant ainsi de conférer aux anticorps de nouvelles fonctions pharmacologiques (greffage de toxines, de radioisotopes, d'enzymes, de cytokines...); ces anticorps sont nommés immunoconjugués. Pour finir, l'ingénierie de la partie Fab donne la possibilité de produire des anticorps bi ou multispécifiques, capables de cibler plusieurs antigènes pathologiques en même temps ou de rediriger des effecteurs cellulaires vers des cellules tumorales.

## 2.3. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques en 2011

### 2.3.1. Aspects économiques

Les anticorps monoclonaux thérapeutiques font partie des biomédicaments ou produits biopharmaceutiques. Ce type de médicament est en plein essor depuis la fin des années 70 grâce au développement des technologies permettant le clonage et l'expression de protéines humaines dans des microorganismes. Les biomédicaments les plus connus sont l'insuline, l'érythropoïétine, l'hormone de croissance et maintenant les anticorps monoclonaux. Depuis dix ans, la proportion des anticorps thérapeutiques dans le marché des biomédicaments ne cesse d'augmenter pour atteindre près de 50% en 2010 (Figure 17) [127]. Ils représentent un marché estimé à plus de 50 milliards de Dollars, ce qui correspond à environ 6% du marché total des produits pharmaceutiques en 2010 [128]. Parmi la quarantaine d'anticorps et dérivées (immunoadhésines, voir paragraphe suivant) approuvés pour un usage thérapeutique, 6 génèrent plus de 90% des ventes : l'étanercept-Enbrel™ (7,3 Md \$), le bevacizumab-Avastin™ (7 Md \$), le rituximab-Rituxan™ (6,9 Md \$), l'adalimumab-Humira™ (6,5 Md \$), l'infliximab-Rémicade™ (6,5 Md \$) et le trastuzumab-Herceptin™ (5,9 Md \$) [127]. Ces 6 biomolécules se situent d'ailleurs parmi les 15 produits pharmaceutiques les plus vendus en 2010 et correspondent aux meilleures ventes dans leurs indications respectives, à savoir l'oncologie et l'inflammation (Figure 18) [128]. Ces retombées économiques importantes générées par les anticorps thérapeutiques ont permis aux grands groupes pharmaceutiques d'investir dans la recherche et d'acquérir des compagnies de biotechnologie spécialisées dans le développement de nouveaux formats d'anticorps qui pourraient révolutionner le traitement de certaines pathologies, comme le cancer, dans les années à venir.

Ainsi, l'engouement pour les anticorps thérapeutiques et les biomédicaments ne semble pas prêt de s'arrêter : on estime que la moitié des 100 molécules les plus vendues en 2014 seront des biomolécules, dont une part importante sera constituée par les anticorps monoclonaux ou dérivés [129]. Ceci est corroboré par un nombre croissant de molécules entrant en essai clinique et par une probabilité globale de succès d'environ 20% [130, 131]. Depuis 2007, environ 40 nouveaux anticorps monoclonaux entrent chaque année en phase clinique et on compte actuellement près de 300 nouveaux anticorps et une vingtaine d'immunoadhésines en cours de phase I, II ou III [132]. Cette croissance est également favorisée par l'extension des indications thérapeutiques des anticorps déjà présents sur le marché et par le développement d'une nouvelle génération d'anticorps possédant des propriétés biologiques optimisées qui devraient nettement favoriser leur utilisation clinique.

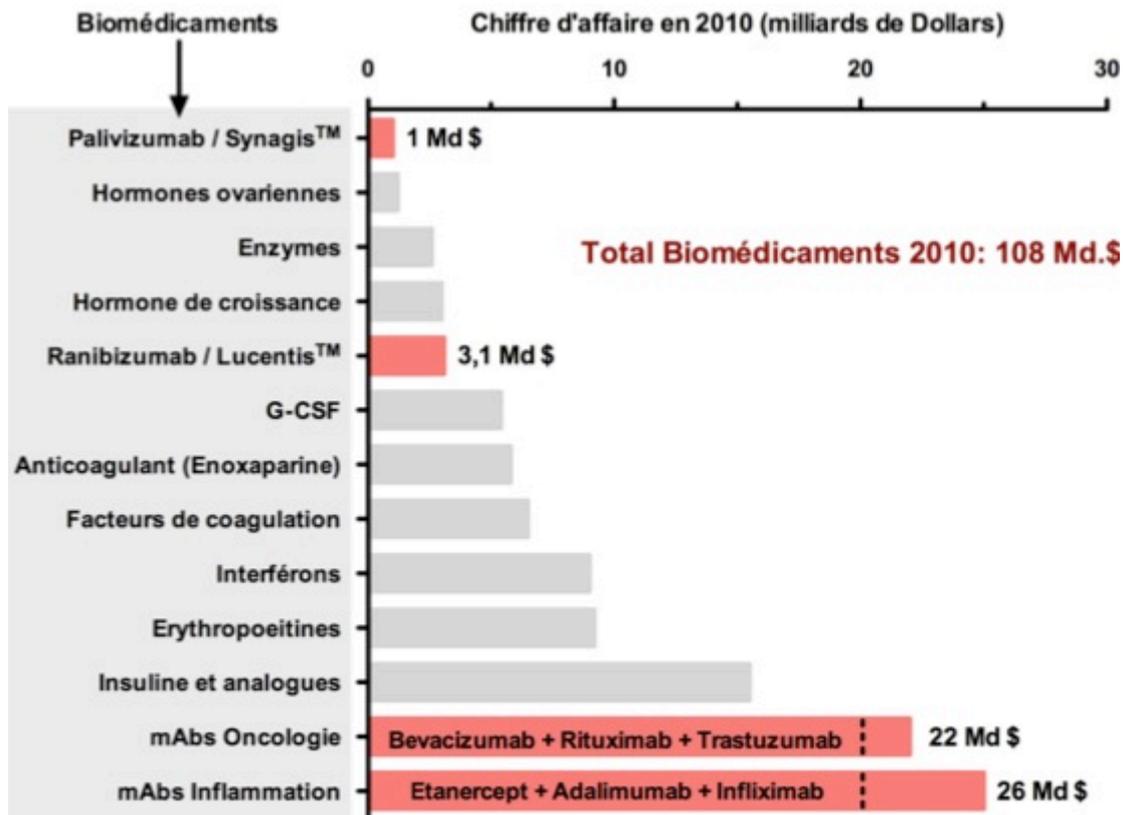


Figure 17. Chiffre d'affaire des 13 biomédicaments les plus vendus en 2010. Histogramme réalisé d'après les données publiées par: <http://www.pipelinereview.com>

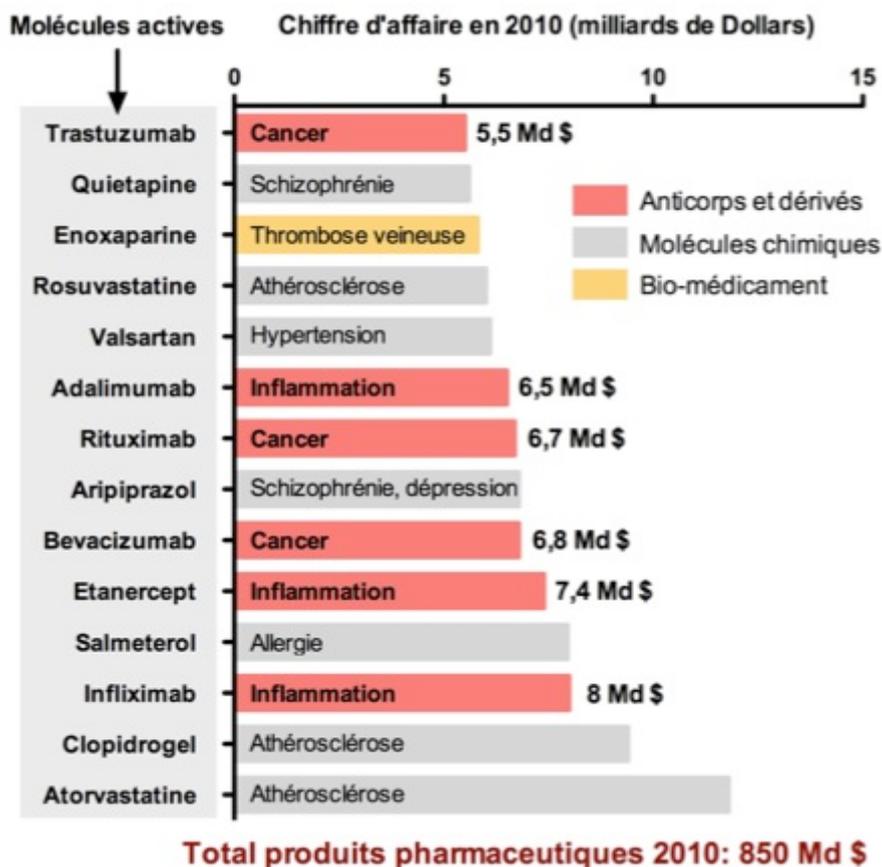


Figure 18. Chiffre d'affaire des 14 molécules pharmaceutiques les plus vendues en 2010. Histogramme réalisé d'après les données publiées par: <http://knol.google.com/k/krishan-maggon/top-ten-twenty-best-selling-drugs-2010/3fy5eowy8suq3/141#>

### 2.3.2. Aperçu des différents formats et indications thérapeutiques

Depuis 1986 et la mise sur le marché du muromonab, 35 anticorps monoclonaux thérapeutiques et 6 protéines de fusion-Fc (ou immunoadhésines) ont été approuvés pour un usage clinique, par une ou plusieurs agences mondiales de santé publique régulant la commercialisation des médicaments (la FDA pour Food and Drug Administration au USA ; l'EMA pour European Medicines Agency en Europe ; la SDFSA pour China's State Food and Drug Administration en Chine) [133-135]. L'ensemble des anticorps monoclonaux et dérivés approuvés depuis 1986 sont présentés dans le tableau 1 et ceux en cours de phase III sont listés dans le tableau 2. Les indications thérapeutiques se concentrent principalement dans les domaines de l'oncologie et de l'inflammation: 17 anticorps ont été approuvés (2 ont été retirés du marché) pour le traitement des cancers et 16 pour la thérapie des pathologies auto-immunes ou inflammatoires (1 retrait du marché : le Raptiva<sup>TM</sup> ou Efalizumab). Néanmoins, des anticorps thérapeutiques sont également disponibles pour la transplantation (Muromonab, Daclizumab, Belatacept), l'infectiologie (Palivizumab), la médecine cardiovasculaire (Abciximab) et l'ophtalmologie (Ranibizumab). En plus de leurs utilisations pour traiter des pathologies répandues, certains anticorps sont indiqués pour la thérapie de maladies rares, voire orphelines, pour lesquelles peu de traitements efficaces étaient disponibles. C'est le cas de l'Eculizumab, approuvé pour le traitement de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne, du Natalizumab pour la sclérose en plaque, du Romiplostim pour le purpura thrombopénique idiopathique et du Tocilizumab pour la maladie de Castelman. Concernant les anticorps en phase III, on retrouve toujours une majorité de molécules dédiées à la cancérologie ou aux pathologies inflammatoires. Cependant, deux nouvelles applications à fort potentiel économique émergent : le diabète de type I et la maladie d'Alzheimer, pour lesquelles 4 nouveaux anticorps sont en cours d'étude clinique de phase III (l'otélizumab et le téplizumab pour le diabète, le bapineuzumab et le solanézumab pour la maladie d'Alzheimer).

Si on s'intéresse aux différents formats d'anticorps sur le marché, on constate que la majorité correspond à des immunoglobulines entières de type IgG1. Néanmoins, il existe tout de même quelques IgG2 (Panitumumab, Denosumab), IgG4 (Natalizumab), 4 fragments Fab et 7 anticorps conjugués à des toxines, radionucléides ou à du polyéthylène glycol (PEG). On notera également la présence d'une IgG2 hybride rat/souris, le catumaxomab, qui présente la particularité d'être le seul anticorps bispécifique (anti-CD3 et anti-EpCAM) sur le marché. Ces différents formats ou isotypes ont un rôle important pour l'efficacité thérapeutique et/ou la sûreté clinique de ces anticorps. Ils permettent d'envisager des stratégies thérapeutiques

Nom de marque / DCI	AMM	Industries	Formats	Indications	Cibles	Modes d'action
<b>ANTICORPS MURINS</b>						
Orthoclone / <i>Muromonab</i> Panorex / <i>Edrecolomab</i> <sup>111</sup> In/ <sup>90</sup> Y-Zevalin/ <i>Ibritumomab</i> <sup>131</sup> I-Bexxar / <i>Tositumomab</i> <sup>131</sup> I-Licartin / <i>Métuximab</i> Removab / <i>Catumaxomab</i>	1986 # 1995† <sup>⊗</sup> 2002 2003 # 2005* 2009 £	Johnson & Johnson Centocor / GSK Biogen-Idec GSK Cheng Hoist Hitec Trion pharma	IgG2κ IgG2κ IgG1κ (IC) IgG2αλ (IC) F(ab') <sub>2</sub> (IC) IgG2 hybride	Transplantation Cancer colorectal LNH LNH Hépatocarcinome Ascite maligne	CD3 EpCAM CD20 CD20 CD147 EpCAM / CD3	B. R / Ago. Cytotox. Rad. Rad. / Cytotox. Rad. Cytotox. / Vacc.
<b>ANTICORPS CHIMERIQUES</b>						
Réopro / <i>Abciximab</i> Rituxan / <i>Rituximab</i> Rémicade / <i>Infliximab</i> Simulect / <i>Basiliximab</i> Vivatuxin / <sup>131</sup> I- <b>chTNT</b> Erbitux / <i>Cétuximab</i> Adecetris / <i>Brintuximab vedotin</i>	1994 # 1997 1998 1998 2003* 2004 2011 #	Centocor / Lilly Genentech / Biogen Centocor / Scherring Novartis Shanghai Med. Biot. ImClone / Merck-Serono Seattle Genetics	Fab IgG1κ IgG1κ IgG1κ IgG1κ (IC) IgG1κ IgG1κ (IC)	Angioplastie LNH et PR Crohn, Psoriasis Transplantation Cancer du poumon CC, CTC LH, LAGC	gpIIb / gpIIIa CD20 TNF-α CD25 ADN-Histone EGFR CD30	Blocage Récept. Cytotox. / Ago. Blocage Ligand Blocage Récept. Rad. B.R. / Cytotox. Toxine
<b>ANTICORPS HUMANISES</b>						
Zénapax / <i>Daclizumab</i> Herceptin / <i>Trastuzumab</i> Synagis / <i>Palivizumab</i> Mylotarg / <i>Gemtuzumab ozog.</i> MabCampath / <i>Alemtuzumab</i> Xolair / <i>Omalizumab</i> Raptiva / <i>Efalizumab</i> Avastin / <i>Bévacizumab</i> Tysabri / <i>Natalizumab</i> TheraCIM / <i>Nimotuzumab</i> Lucentis / <i>Ranibizumab</i> Soliris / <i>Eculizumab</i> Cimzia / <i>Certolizumab pegol</i> Roactaméra / <i>Tocilizumab</i> Numax / <i>Motavizumab</i>	1997 # 1998 1998 2000 <sup>⊗</sup> 2001 2003 2003 <sup>⊗</sup> 2004 2004 2005* 2006 2007 2008 2009 à venir	PDL / Roche Genentech MedImmune / AstraZen. Wyeth Millenium Genentech / Novartis Genentech / Serono Genentech / Roche Biogen-Idec / Elan YM Biosciences Genentech Alexion UCB Roche / Chugai MedImmune / AstraZen.	IgG1κ IgG1κ IgG1κ IgG4κ (IC) IgG1κ IgG1κ IgG1κ IgG4κ IgG1κ Fab IgG2/4κ Fab'-PEG IgG1κ IgG1κ	Transplantation Cancer du sein Infection VRS LAM LLC Allergie Psoriasis Cancers divers Sclérose en plaque CTC DMLA HPN PR, Crohn PR, Castelmann Infection VRS	CD25 HER-2 Protéine F CD33 CD52 IgE-Fc CD11a VEGF-A Intégrine α4 EGFR VEGF-A C5 TNF-α IL-6R Protéine F	Blocage Récept. B.R. / Cytotox. B.R. / Cytotox. Toxine Cytotox. / Ago. Blocage Ligand Blocage Récept. Blocage Ligand Blocage Récept. Blocage Ligand Blocage Ligand Blocage Ligand Blocage Récept. Cytotox. / B.R.
<b>ANTICORPS HUMAINS</b>						
Humira / <i>Adalimumab</i> (PD) Vectivix / <i>Panitumumab</i> (ST) Stélara / <i>Ustékinumab</i> (ST) Simponi / <i>Golimumab</i> (ST) Ilaris / <i>Canakinumab</i> (ST) Arzerra / <i>Ofatumumab</i> (ST) Prolia / <i>Denosumab</i> (ST) Benlysta / <i>Bélimumab</i> (PD) Yervoy / <i>Ipilimumab</i> (ST) ABthrax / <i>Raxibacumab</i> (PD)	2002 2006 2009 2009 2009 2009 2010 2011 2011 à venir	Abbott Amgen Centocor Centocor Novartis GSK / Genmab Amgen GSK / HGS BMS HGS	IgG1κ IgG2κ IgG1κ IgG1κ IgG1κ IgG1κ IgG2κ IgG1λ IgG1κ IgG1λ	PR Cancer colorectal Psoriasis PR SPAC LLC Ostéoporose Lupus Mel.Metas. Infection (Anthrax)	TNF-α EGFR IL12 / IL23 TNF-α IL-1β CD20 RANK-L BLys (BAFF) CTLA-4 Toxine PA	Blocage Ligand Blocage Récept. Blocage Ligand Blocage Ligand Blocage Ligand Cytotox. Blocage Ligand Blocage Ligand B.R. / Vacc. Blocage Ligand
<b>IMMUNOADHESINES</b>						
Enbrel / <i>Etanercept</i> Amevive / <i>Aléfacept</i> Orencia / <i>Abatacept</i> Arcalyst / <i>Rilonacept</i> Nulojix / <i>Bélatacept</i> Zaltrap / <i>Aflibercept</i> Nplate / <i>Romiplostim</i>	1998 2003 # 2005 2008 2011 à venir 2008	Amgen / Wyeth Astellas / Biogen-Idec BMS Regeneron BMS Regeneron Amgen	P75 TNFR-Fc LFA-3-Fc CTLA4-Fc IL-1R-Fc CTLA-4-Fc VEGFR-Fc Peptide-Fc	PR, Psoriasis, SA PR, Pso, Transplant. PR SPAC Transplantation NSCLC, CC, HRPC PTI	TNF-α CD2 CD80 / CD86 IL-1 CD80 / CD86 VEGFs / PIGF TPO-R	Blocage Ligand Blocage Récept. Blocage Récept. Blocage Ligand Blocage Récept. Blocage Ligand Ago.

**Tableau 1. Anticorps monoclonaux et dérivés approuvés pour un usage thérapeutique (FDA, EMA, SDA).** \* approuvé en Chine; # approuvé par la FDA seulement; £ approuvé par l'EMA seulement; † approuvé en Allemagne; <sup>⊗</sup> retiré du marché; DCI : Dénomination Commune Internationale; ozog. : ozogamicine; PD : Obtention par Phage Display; ST : obtention par souris transgéniques; IC : immunoconjugué; PEG : polyéthylène glycol; Transplant. : Transplantation; CC : Cancer colorectal; LNH : Lymphomes non Hodgkiniens; PR : Polyarthrite rhumatoïde; CTC : Cancers tête et cou; LH : Lymphomes Hodgkiniens; LAGC : Lymphomes Anaplasiques à Grandes Cellules; LAM : Leucémie Aiguë myéloïde; LLC : Leucémie lymphocytaire chronique; DMLA : Dégénérescence maculaire liée à l'âge; HPN : Hémoglobinurie paroxystique nocturne; SA : Spondylarthrite ankylosante; SPAC : Syndromes périodiques associés à la cryopyrine; Mel. Métas. : Mélanome métastatique; Pso : Psoriasis; NSCLC : Cancer du poumon non à petites cellules; HRPC : cancer prostatique résistant aux traitements hormonaux; PTI : Purpura thrombopénique idiopathique. TPO-R : récepteur à la thrombopoïétine; PIGF : facteur de croissance placentaire; VRS : Virus respiratoire syncytial. B.R: Blocage Récepteur; Ago. Agoniste; Rad.: radiothérapie; Vacc. : Effet vaccinant. Cytotox. inclut les phénomènes d'ADCC, de CDC et d'ADCP. Sources: [131-133].

rationnelles, adaptées à chaque pathologie, et constituent la base des nouvelles approches visant à développer des anticorps possédant des propriétés cliniques optimisées (ce point sera développé dans la partie 2.4). Enfin, depuis la fin des années 1990, un nouveau format dérivé des anticorps est apparu sur le marché, les immunoadhésines, et connaît un développement croissant. Les immunoadhésines sont des molécules chimériques combinant les domaines fonctionnels d'une protéine (site de liaison d'un récepteur, d'un ligand) avec le fragment Fc d'un anticorps [136]. Actuellement, 6 immunoadhésines sont approuvées pour un usage thérapeutique et 4 sont en phase III. Les autres anticorps en phase III sont majoritairement des IgG1 entières (à part 4 immunoconjugués dont 2 fragments, un Fab et un scFv) mais de plus en plus correspondent à des anticorps « optimisés », possédant des modifications au niveau du Fc pour moduler leurs propriétés pharmacologiques (tableau 1 et 2, anticorps notés en gras).

Comme on peut l'observer sur le tableau 1, les anticorps humanisés et totalement humains représentent la majorité des produits à base d'anticorps sur le marché (23/38) et ce à cause de leur bonne tolérance chez les patients. Dans les années à venir, on s'attend à voir augmenter fortement le nombre de ces anticorps (Figure 19) [137]. En effet, ils représentent les trois quarts des anticorps en cours de phase III (tableau 2). Si on considère un taux d'approbation de 75 % (ce qui correspond à la tendance actuelle pour les anticorps en phase III), le nombre d'anticorps sur le marché avoisinerait les 70 d'ici à 2015, avec 26 anticorps humanisés (2,2 fois plus qu'en 2011) et 18 anticorps humains (2 fois plus qu'en 2011).

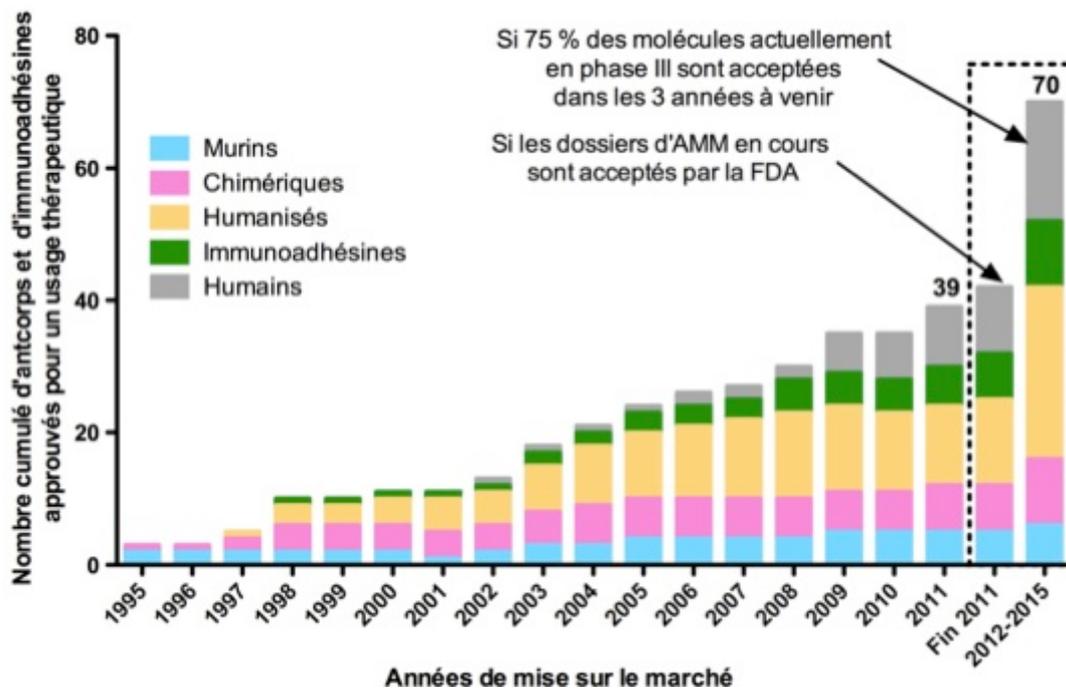


Figure 19. Cumuls des différents types d'anticorps monoclonaux thérapeutiques et immunoadhésines approuvés jusqu'en Août 2011, et prédictions pour la période 2012-2015.

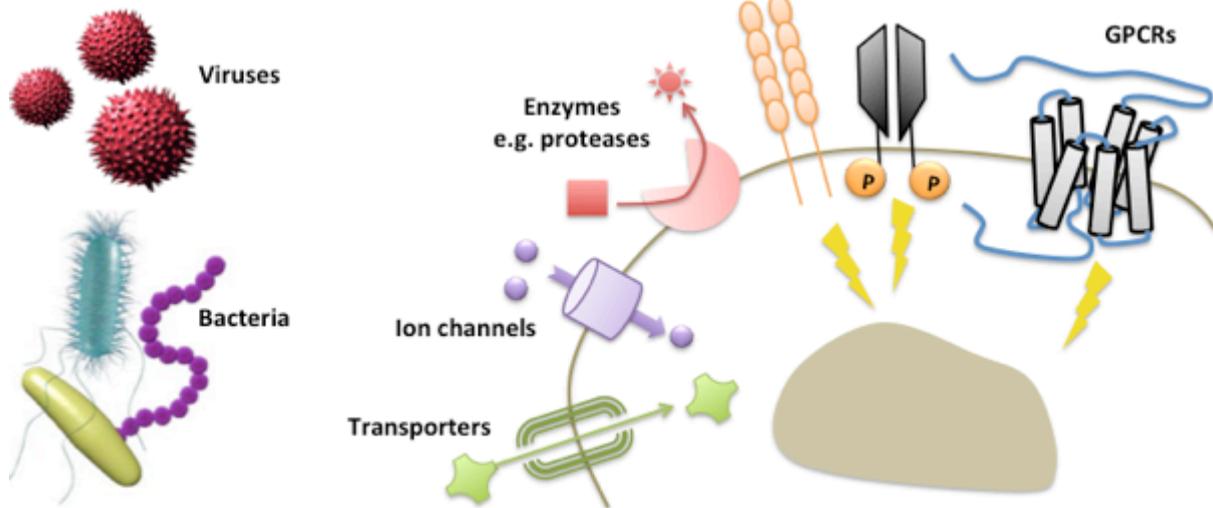


### 2.3.3. Les cibles des anticorps thérapeutiques

Deux tiers des molécules ciblées par les anticorps thérapeutiques sur le marché sont des protéines de surface (récepteurs, molécules d'adhésion, protéines d'enveloppe virale) alors que les 30 % restant correspondent à des molécules solubles (cytokines, facteurs de croissance). Cette tendance s'observe également pour les anticorps en phase III dont 71% sont dirigés contre des protéines membranaires (tableau 2). Par ailleurs, il existe une très forte compétition pour certaines cibles qui ont été validées cliniquement et qui rapportent beaucoup d'argent aux compagnies ayant réussi à produire et à commercialiser les premiers anticorps contre ces dernières [137]. C'est le cas des anticorps ciblant le TNF- $\alpha$ , le récepteur CD20 ou les récepteurs à l'EGF (EGFR, HER2), qui représentent 13 des 39 anticorps et dérivés actuellement sur le marché (tableau 1). De plus, de nouveaux anticorps en phase clinique se concentrent encore sur ces molécules : 2 anticorps anti-CD20 et 4 anticorps anti-HER2 ou anti-EGFR sont en phase III (tableau 2). L'analyse des anticorps en phase III permet également d'identifier les nouvelles cibles à fort potentiel, dont certaines ne sont pas encore exploitées sur le marché des anticorps. L'exemple le plus frappant concerne le récepteur IGF-1R, un récepteur à activité tyrosine kinase surexprimé dans de nombreux cancers. Ce récepteur n'est la cible d'aucun anticorps approuvé, mais on dénombre déjà 3 anticorps anti-IGF-1R en phase III et au moins 5 autres en phase I et II. D'autres protéines, déjà reconnues par des anticorps thérapeutiques approuvés, apparaissent également comme des cibles très compétitives. C'est le cas du système IL-6/IL-6R, CTLA4/CD80/CD86, du récepteur CD3 et du peptide- $\beta$  amyloïde (tableau 2). Enfin, il est intéressant de noter qu'aucun anticorps sur le marché ne cible de récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs), de transporteurs ou canaux ioniques, ni de protéases membranaires ou extracellulaires, qui sont pourtant les cibles de 80 % des médicaments utilisés actuellement (Figure 20) [138]. Cependant, cette tendance est peut être en train de changer. En effet, parmi les anticorps en phase III, un anticorps est dirigé contre une enzyme (l'anhydrase carbonique) et un autre permet de bloquer un transporteur (le transporteur de l'acide folique). Ces deux anticorps, le girentuximab et le farlétuzumab, sont évalués respectivement pour le traitement des cancers rénaux et ovariens. On notera également les 2 immunoadhésines, Facteur VIII et Facteur IX-Fc, dont les cibles sont des enzymes ou des précurseurs enzymatiques de la cascade de coagulation. Dans les années à venir, une meilleure compréhension des mécanismes pathologiques et des acteurs moléculaires impliqués permettra d'élargir le nombre de nouvelles cibles thérapeutiques pertinentes accessibles aux anticorps.

Therapeutic target classes	%	Accessible	Mabs
- <b>Receptors</b>	<b>47%</b>	A lot	27 (25)
- GPCRs	33%	YES	0 (0)
- Nuclear	7%	NO	0 (0)
- TKRs	2%	YES	4 (8)
- Other (adhesion)	5%	YES	23 (17)
- <b>Enzymes</b>	<b>22%</b>	Some	0 (3)
- Ion channels	16%	A lot	0 (0)
- Transporters	9%	A lot	0 (1)
- Ligands	1%	YES	14 (9)
- Others	5%	Some	1 (0)
- Pathogens, toxins	n.a	YES	1 (4)


 Ligands: peptides, hormones, cytokines, growth factors



**Figure 20. Cibles des anticorps thérapeutiques approuvés et en cours de phase III.** Les différentes classes de cibles thérapeutiques des médicaments sont listées dans le tableau. Les pourcentages de drogues ciblant les différentes catégories de cibles sont présentés (d'après [138]). L'accessibilité des différentes cibles pour les anticorps monoclonaux thérapeutiques est variable. Les nombres d'anticorps monoclonaux et dérivés, sur le marché et en phase III (nombre entre parenthèses), sont indiqués pour chaque classe de cibles. Le nombre total d'anticorps approuvés atteint 43 et non 42 car le catumaxomab (anticorps bispécifique) est compté deux fois.

### 2.3.4. Les modes d'action des anticorps thérapeutiques

A la différence des petites molécules chimiques, les anticorps thérapeutiques présentent des modes d'actions très variés et souvent multiples. Le mode d'action le plus commun correspond tout simplement à la fixation de l'anticorps sur sa cible pour bloquer son activité biologique et l'interaction avec d'autres partenaires. Ce mode d'action implique aussi bien des antigènes solubles (ligands, toxines) que des antigènes membranaires associés à des cellules (récepteurs, enzymes, antigènes viraux ou microbiens). Des exemples d'anticorps agissant sur des médiateurs solubles incluent l'adalimumab ou l'étanercept qui permettent de neutraliser les activités inflammatoires du TNF- $\alpha$ , le bevacizumab qui bloque l'action pro-angiogénique du VEGF, l'ustékinumab, le dénosumab et le canakinumab qui neutralisent des cytokines et chimiokines impliquées dans des pathologies inflammatoires. Des effets biologiques similaires peuvent être obtenus, non pas en bloquant les ligands, mais en agissant directement sur les récepteurs. De tels anticorps peuvent empêcher la fixation du ligand sur

son récepteur (activité antagoniste) et ainsi inhiber l'activation des voies de signalisation responsable de la pathologie. C'est le cas de certains anticorps anti-EGFR ou anti-IGF-1R, comme le cétuximab et le dalotuzumab qui, en empêchant la fixation des facteurs de croissance sur leurs récepteurs, permettent d'inhiber la croissance de diverses tumeurs [139, 140]. Ce raisonnement est bien sûr applicable à d'autres protéines membranaires (des canaux ioniques, des transporteurs, des enzymes ou des antigènes viraux ou microbiens), dont le blocage peut être bénéfique pour une pathologie. En effet, le farlétuzumab permet de réduire la croissance de tumeurs ovariennes en inhibant le transport de l'acide folique dans les cellules cancéreuses [141]. De même, le palivizumab empêche l'entrée du virus respiratoire syncytial (VRS) dans les cellules en se fixant sur la protéine F de l'enveloppe virale [142].

En plus de bloquer l'action des ligands, les anticorps anti-récepteurs ont souvent d'autres modes d'action. Ils peuvent par exemple empêcher des processus d'homodimérisation de récepteurs, ou même induire des voies de signalisation provoquant l'internalisation des récepteurs ou bien l'apoptose des cellules cibles. Par exemple, le trastuzumab, qui est indiqué dans le traitement des cancers du sein métastatiques, inhibe l'activation du récepteur HER2 en bloquant son homodimérisation [143]. Le pertuzumab, un autre anticorps anti-HER2 actuellement en phase III, est lui capable de bloquer tout type de dimérisation impliquant HER2 (homo et hétérodimérisation) [144]. Par ailleurs, ces deux anticorps, comme beaucoup d'autres anticorps anti-récepteurs, sont également capables d'induire l'internalisation de leurs récepteurs cibles, ce qui permet de désensibiliser les cellules à l'action d'un ligand favorisant la pathologie. Enfin, certains anticorps anti-récepteurs exercent leurs effets thérapeutiques grâce à une activité agoniste. C'est le cas des anticorps anti-CD3 utilisés pour la transplantation (muromonab) et en phase III pour le diabète de type I (otélixizumab et téplizumab). En se fixant sur le récepteur CD3, ces anticorps permettent d'induire le relargage de calcium intracellulaire et la production de cytokines à action tolérogène favorisant l'expansion de  $L_T$  CD8<sup>+</sup> régulateurs plutôt que celle de  $L_T$  cytotoxiques [145]. De même, certains anticorps antitumoraux ont été développés et sélectionnés pour leur activité agoniste pro-apoptotique. Le mapatumumab (HGS-ETR1) et l'anticorps HGS-ETR2 sont tous les deux capables d'induire l'apoptose en activant respectivement les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (ou DR-5) [146, 147], deux récepteurs spécialisés dans le déclenchement de la mort cellulaire par les ligands de la famille du TNF. La dichotomie anticorps antagonistes versus anticorps agonistes n'est en réalité pas si simple. En effet, la plupart des anticorps anti-récepteurs présentent à la fois des propriétés agonistes et

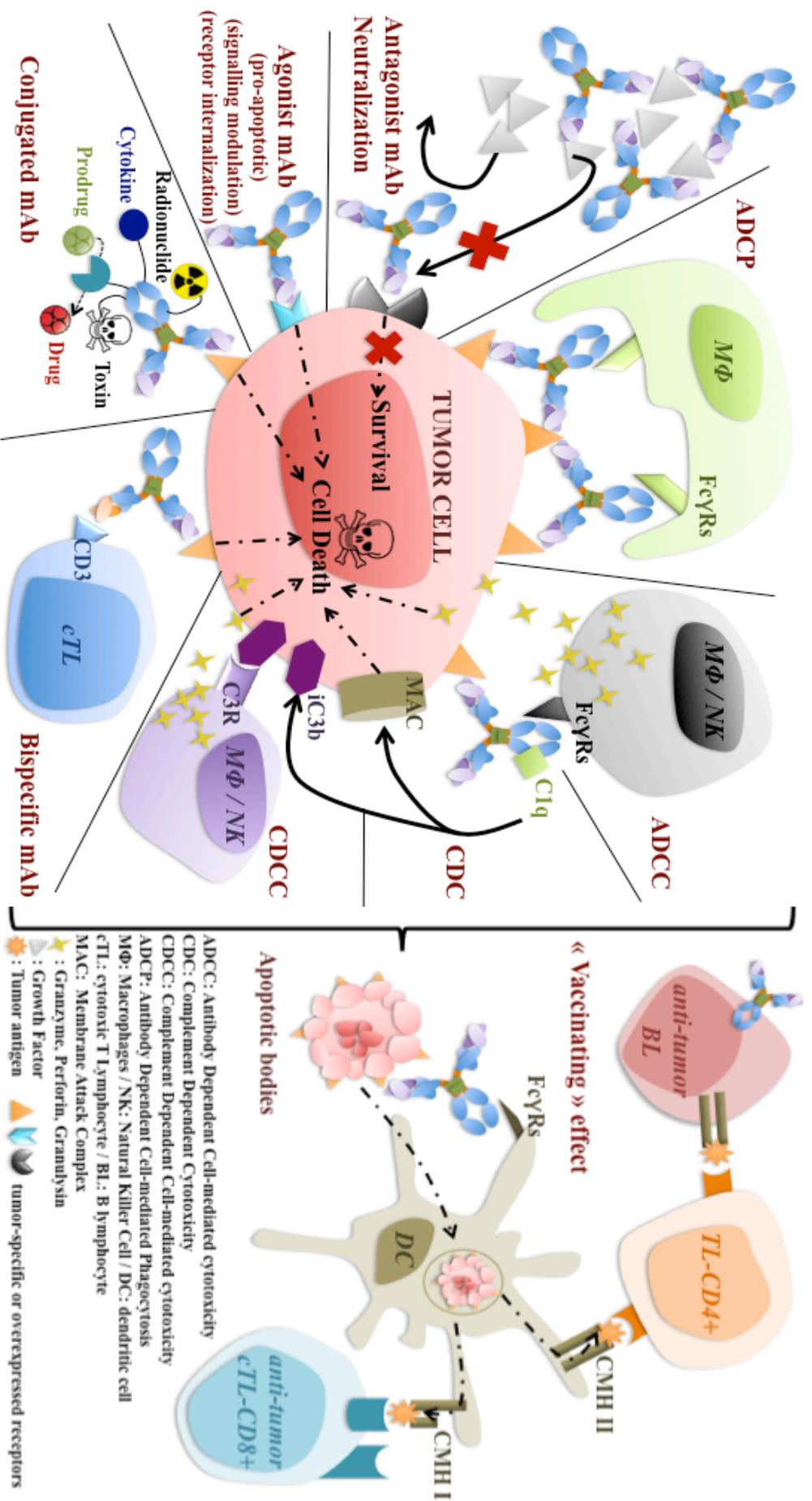
antagonistes. Tout dépend de la voie de signalisation que l'on considère : de nombreux anticorps inhibent la fixation d'un ligand tout en favorisant le déclenchement de l'internalisation des récepteurs et potentiellement d'autres voies de signalisation non identifiées. C'est en fait la combinaison de ces différentes activités qui permet d'expliquer le mode d'action des anticorps, à la fois responsable des effets thérapeutiques, mais aussi des effets toxiques.

La modulation de l'activité d'une protéine (récepteur, enzyme, transporteur) est un mécanisme d'action partagé entre les anticorps monoclonaux et les petites molécules chimiques. Cependant, à la différence des drogues classiques, les anticorps monoclonaux n'ont pas nécessairement besoin de posséder une activité pharmacologique sur leur cible pour être de puissants agents thérapeutiques. En effet, grâce à leur fragment Fc, les anticorps peuvent interagir avec le système immunitaire de l'hôte et déclencher l'élimination de l'antigène ciblé par différents mécanismes cytotoxiques : l'ADCC, l'ADCP et la CDC. Ces processus nécessitent l'interaction Fc/Fc $\gamma$ R (ADCC et ADCP) et Fc/C1q (CDC) (voir la partie 1.6). Ces trois modes d'action entraînent la destruction de l'antigène ou de la cellule cible, ce qui est bénéfique dans le cas d'anticorps antitumoraux ou pathogènes, mais qui peut au contraire être délétère dans d'autres situations. Ainsi, de plus en plus d'anticorps récemment approuvés ou en développement possèdent un Fc optimisé en fonction de la pathologie et de la stratégie thérapeutique, afin d'augmenter ou au contraire de réduire les fonctions effectrices (voir partie 2.4). Dans le cas des cancers, la destruction des cellules cibles par les phénomènes d'ADCC, d'ADCP et de CDC représente un mécanisme d'action important pour l'efficacité clinique [148]. De plus, des études récentes indiquent que la destruction des cellules tumorales par les anticorps peut potentiellement induire une immunité cellulaire dirigée contre des antigènes tumoraux. En effet, des débris de cellules tumorales peuvent être phagocytés par des cellules dendritiques qui vont ensuite pouvoir présenter des antigènes tumoraux aux lymphocytes T et induire une réponse immune adaptative cellulaire et humorale contre la tumeur [149]. Ce mécanisme de présentation est favorisé par les Fc $\gamma$ R exprimés par les cellules dendritiques qui peuvent activer l'ADCP de débris cellulaires encore liés aux anticorps [150].

Malgré leur potentiel thérapeutique important, en particulier dans le domaine de l'oncologie, l'efficacité clinique des anticorps antitumoraux actuellement sur marché n'est pas la hauteur des attentes, surtout dans le cas des tumeurs solides. En effet, mis à part quelques exceptions comme le rituximab, le trastuzumab ou le bevacizumab, les anticorps

antitumoraux présentent des taux de réponse relativement faibles lorsqu'ils sont utilisés en monothérapie (< à 10% pour le cétuximab) [151]. Par contre, de nombreux exemples montrent une association favorable de ces anticorps avec des traitements chimiothérapeutiques et/ou radiothérapeutiques [151, 152]. Les mécanismes exacts de cette synergie sont peu connus, mais il semble que les anticorps aient des effets chimiosensibilisants et/ou radiosensibilisants. Face à ce manque d'efficacité, de nouvelles stratégies ont été envisagées pour optimiser les fonctions effectrices du Fc mais également pour doter les anticorps de nouvelles fonctions permettant de détruire plus efficacement les cellules tumorales. Ces nouvelles fonctions impliquent le couplage des anticorps avec d'autres molécules ou particules, leur permettant ainsi d'exercer leur activité antitumorale par le biais de nouveaux modes d'action [153, 154]. Ces anticorps couplés sont appelés immunoconjugués et certains sont déjà sur le marché. C'est le cas des radio-immunoconjugués, comme le I-131 tositumomab et le Y-90 ibritumomab tiuxetan, ou des anticorps couplés à des drogues comme le brintuximab vedotin et le gemtuzumab ozogamicine. De plus, d'autres formats ont été développés et certains sont en cours d'évaluation clinique : ils mettent en jeu le couplage d'anticorps ou de fragments d'anticorps avec des toxines, des cytokines ou des enzymes [153, 154]. Grâce à ces différents couplages, les anticorps peuvent être utilisés comme des vecteurs pour réaliser de la radiothérapie ou de la chimiothérapie ciblée, évitant ainsi les effets secondaires associés à une administration des molécules conjuguées seules. Enfin, le développement d'anticorps multispécifiques a également permis de diversifier les modes d'action d'un même anticorps. Par exemple, le catumaxomab, un anticorps bispécifique anti-EpCAM et anti-CD3 est à la fois capable de cibler les cellules tumorales surexprimant EpCAM, de provoquer leur destruction par les lymphocytes T en activant le récepteur CD3 (un mode d'action non conventionnel pour les anticorps) et d'induire l'internalisation des débris tumoraux par des CPA grâce à l'interaction Fc/FcγRs [155]. Cet anticorps est le premier anticorps bispécifique et trifonctionnel à avoir atteint la commercialisation en 2009. Un autre anticorps trifonctionnel de même type, l'ertumaxomab, ciblant HER2 et CD3 est actuellement en phase II/III [156]. Les anticorps bispécifiques et les immunoconjugués sont deux formats d'anticorps très prometteurs qui permettent d'envisager de multiples modes d'action thérapeutiques dans le but d'augmenter l'efficacité des traitements à base d'anticorps.

L'ensemble des modes d'action présentés ci-dessus est regroupé dans la figure 21.



### 2.3.5. Les limitations des anticorps thérapeutiques

A leur début, une des principales limitations à l'utilisation clinique des anticorps thérapeutiques était leur forte immunogénicité. Ce problème a été quasiment résolu avec l'apparition des anticorps humanisés et totalement humains qui ont permis de valider et d'accroître l'utilisation des anticorps monoclonaux dans diverses pathologies. Des progrès cliniques impressionnants ont été réalisés dans le domaine de la cancérologie, notamment grâce à l'utilisation du rituximab en oncohématologie ou grâce au bevacizumab et au trastuzumab pour les tumeurs solides. Cependant, il existe toujours des limitations importantes qui freinent l'utilisation massive des anticorps en clinique, principalement le coût excessif des traitements, le manque d'efficacité (surtout en oncologie) et, dans des cas plus rares, la survenue d'effets indésirables graves.

#### *- Effets secondaires des anticorps thérapeutiques*

Les anticorps monoclonaux sont caractérisés par une très grande spécificité pour leur cible, une longue demi-vie et bonne tolérance générale chez l'homme, ce qui leur confère un rapport bénéfices /risques élevé. Ce constat est reflété par un taux d'approbation de 20 % par rapport à 5% pour les petites molécules chimiques [157]. Néanmoins, l'expérience clinique montre que les anticorps thérapeutiques ne sont pas dénués d'effets toxiques chez les patients traités, des effets qui peuvent parfois être très graves et difficiles à prévoir. L'ensemble des effets toxiques peuvent être regroupés en cinq catégories : les infections opportunistes, le syndrome cytokinique, les pathologies auto-immunes, la toxicité d'organe et l'immunogénicité [158].

L'augmentation du risque infectieux est particulièrement associée à certains anticorps ciblant des antigènes comme le CD52, le TNF- $\alpha$  ou l'intégrine VLA4 [159]. Le blocage de ces molécules et/ou la déplétion des cellules exprimant ces antigènes affectent grandement l'immunité anti-infectieuse, ce qui favorise l'apparition d'infections opportunistes parfois mortelles pour les patients. C'est notamment le cas pour le natalizumab (Tysabri<sup>TM</sup>), un anti-VLA4 utilisé dans le traitement de la sclérose en plaque. En effet, depuis sa commercialisation en 2004, environ 15 cas de leucoencéphalites multifocales progressives (LEMP) ont été rapportés [160]. La LEMP est une pathologie mortelle, liée à la réactivation d'un virus latent présent dans la majorité de la population, qui se déclare généralement chez des patients sévèrement immunodéprimés. Une étude clinique de 2006 sur plus de 3000 patients estime que le risque de développer une LEMP est de 1 pour 1000, à la suite d'un traitement de 18 mois avec du natalizumab [161]. Par conséquent, la commercialisation de cet

anticorps a été suspendue avant d'être reprise en 2008, compte tenu du bénéfice apporté, cependant avec des recommandations très strictes pour le prescripteur. Par ailleurs, plusieurs cas de LEMP ont conduit au retrait du marché de l'éfalizumab (Raptiva<sup>TM</sup>) [162], un anticorps ciblant la molécule CD11a qui est une sous-unité de l'intégrine LFA-1 intervenant dans la transmigration des leucocytes (tout comme l'intégrine VLA4). Des complications infectieuses ont également été rapportées avec la majorité des anticorps anti-TNF- $\alpha$  (infliximab, adalimumab, étanercept), notamment à cause de la réactivation de tuberculoses latentes chez les patients [163]. Suite à cette observation, des mesures préventives ont donc été mises en place, comme le dépistage systématique d'infections tuberculeuses latentes, avant de débiter le traitement. Enfin, l'apparition fréquente d'infections a été observée à la suite de traitements avec l'alemtuzumab (MabCampath<sup>TM</sup>), un anticorps anti-CD52 utilisé dans le traitement des lymphomes non Hodgkiniens et des leucémies lymphoïdes chroniques. Ceci est dû au mécanisme d'action de l'anticorps qui détruit les cellules CD52 +, tumorales ou saines, ce qui conduit à une lymphopénie B et T sévère favorisant l'émergence d'infections diverses [164, 165]. Ces infections multiples et fréquentes (observées dans 10 à 56 % des patients en fonction des études) peuvent parfois conduire à des septicémies et au décès des patients. Néanmoins, la balance bénéfices / risques favorable dans le cas des lymphomes et des leucémies justifie l'utilisation de cet anticorps dans ces pathologies. De plus, une surveillance sérologique ainsi que des traitements antiviraux ou antibactériens prophylactiques chez les sujets à risque permettent de réduire le risque infectieux [165, 166].

Malgré leurs propriétés immunosuppressives, les anticorps mentionnés ci-dessus peuvent également induire des pathologies auto-immunes. C'est le cas des anti-TNF $\alpha$  qui sont parfois associés à la production d'anticorps anti-ADN ou anti-noyau conduisant à des syndromes de type lupus [167]. L'alemtuzumab est, quant à lui, impliqué dans des pathologies auto-immunes ciblant la thyroïde via la production d'auto-anticorps contre le récepteur de la thyrotropine [168]. Par ailleurs, une augmentation de l'incidence de maladies auto-immunes comme l'uvéïte et le vitiligo a été rapportée suite à des traitements avec l'ipilimumab (Yervoy<sup>TM</sup>) [169], un anti-CTLA4 utilisé pour stimuler les fonctions antitumorales des lymphocytes T dans les mélanomes. Des études ont également montré que cet anticorps peut causer des entérocolites auto-immunes, nécessitant parfois une colectomie [170].

Le second type d'effet secondaire relativement fréquent avec l'utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux est le syndrome cytokinique. En effet, de nombreux

anticorps déclenchent le relargage de cytokines pro-inflammatoires (e.g. TNF- $\alpha$  et/ou IFN- $\gamma$ ) à la suite de la fixation sur leur cible ou en recrutant des effecteurs immunitaires grâce au Fc [171]. Les symptômes incluent une dyspnée, de la fièvre, des frissons et quelquefois une urticaire. Ces effets indésirables sont fréquemment observés avec des anticorps à actions cytotoxiques comme le rituximab (Rituxan<sup>TM</sup>) ou l'alemtuzumab, lors des premières injections et s'atténuent généralement au cours du traitement [172, 173]. Pour certains anticorps, comme le muromonab (anti-CD3) ou le TGN1412 (anti-CD28), la libération de cytokines est importante et brutale, on parle alors d'un choc cytokinique [174, 175]. Ce choc ou cette « tempête » cytokinique résulte d'une activation massive des lymphocytes T et induit une toxicité très sévère chez les sujets traités. Le 13 Mars 2006, la première étude de phase I du TGN1412 a provoqué des effets secondaires extrêmement graves chez 6 volontaires sains dans les heures suivant l'injection. Les volontaires ont rapidement développé une réponse inflammatoire systémique caractérisée par des céphalées, des myalgies, des nausées, des diarrhées, des érythèmes et une forte hypotension. Ce tableau clinique déjà chargé s'est ensuite aggravé dans les 12-24 h suivant l'injection avec l'apparition d'infiltrats pulmonaires, d'une coagulation intravasculaire disséminée et d'une insuffisance rénale aiguë [175]. De plus, les études précliniques effectuées chez le singe n'avaient pas permis de prévoir de telles complications chez l'homme. Suite à ces événements, le développement de cet anticorps a été stoppé et des recommandations ont été publiées afin de limiter les risques toxiques lors du passage des modèles précliniques vers les premiers essais cliniques chez l'homme [176-179].

La toxicité liée à certains anticorps provient du fait que l'antigène ciblé par l'anticorps est exprimé significativement dans des tissus sains. Par exemple, les atteintes dermatologiques (de type rash) consécutives à l'injection du cétuximab sont dues à l'expression du récepteur HER1 (EGFR) au niveau de la peau [180]. On retrouve cette dermatotoxicité chez 90 % des patients traités avec le cétuximab [181]. De même, la cardiotoxicité observée avec le trastuzumab est due à une expression du récepteur HER2 au niveau des cardiomyocytes [182]. Cette toxicité cardiaque inattendue a permis de décrire un nouveau rôle de HER2 dans la survie des cardiomyocytes [183].

Enfin, certaines toxicités sont totalement indépendantes de l'antigène cible mais résultent en fait du caractère immunogène des anticorps. Ce type de toxicité se retrouve surtout dans le cas des anticorps chimériques ou murins et peut parfois aboutir à des chocs anaphylactiques avec, par exemple, la production d'IgE anti-basiliximab ou anti-cétuximab [184, 185]. Le développement des anticorps humanisés et humains a grandement réduit le

problème de l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques. Néanmoins, la présence d'épitopes immunogènes sur les régions hypervariables (à cause de séquences murines pour les anticorps humanisés ou du phénomène d'hypermutation somatique pour les anticorps humains) ne permet pas d'éviter totalement les réponses HAHA qui peuvent réduire l'efficacité des traitements à base d'anticorps humanisés ou humains [186].

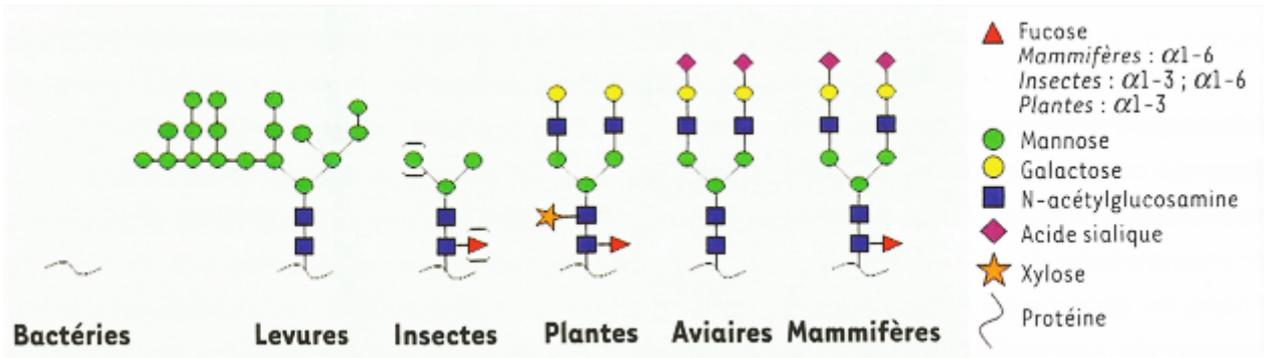
En résumé, l'expérience clinique montre que les anticorps monoclonaux thérapeutiques sont loin d'être des molécules sans risque pour l'homme. Cependant, les complications graves sont rares, limitées à des anticorps particuliers et parfois liées à des associations médicamenteuses, des doses ou des voies d'administration inappropriées. De plus, le bénéfice incontestable de certains anticorps dans des pathologies sévères et mortelles fait largement pencher la balance en faveur de leur utilisation, même en cas de risque toxique avéré. Une meilleure compréhension de la biologie des antigènes ciblés, des mécanismes d'action des anticorps ainsi que des facteurs de risque chez les patients, devrait permettre d'améliorer la sûreté clinique de ces molécules.

#### *- Production et coût des anticorps monoclonaux thérapeutiques*

Les anticorps sont des protéines multimériques complexes de 150 kDa possédant de multiples ponts disulfures et modifications post-traductionnelles comme des glycosylations. Par conséquent, leur production nécessite la présence d'une machinerie enzymatique eucaryote afin d'obtenir des molécules biologiquement actives. Ainsi, la majorité des anticorps thérapeutiques sont produits par des cellules mammaliennes de type CHO (issues d'ovaires de hamster chinois), NS0 ou SP2/0 (deux lignées de myélome murin) [187]. Des progrès considérables dans la conception des vecteurs d'expression, dans la formulation des milieux de culture et dans la maîtrise des procédés de production à grande échelle, ont abouti à des gains de productivité exceptionnels. Certaines lignées cellulaires optimisées sont ainsi capables de produire plusieurs grammes d'anticorps par litre de milieu de culture contre quelques milligrammes avant optimisation [187]. Cependant, ces procédés de production restent très onéreux (milieux de culture et suppléments, étapes de purification et de validation) : cela représente environ 200 millions d'euros d'investissement pour 200 kg d'anticorps par an [188]. De plus, les doses thérapeutiques à injecter aux patients pour obtenir un résultat clinique sont souvent importantes. Les patients traités avec du Rituximab reçoivent de 8 à 16 doses de  $375 \text{ mg/m}^2$ , ce qui correspond à 6 ou 12 g de Rituximab par patient [189]. Les traitements sont donc très coûteux eux aussi et s'élèvent généralement à plusieurs milliers d'euros (de 1000 à 5000) par mois et par patient [188]. Dans ce contexte, des systèmes de

production alternatifs aux cellules mammaliennes sont envisagés et pourraient permettre de diminuer les coûts de production tout en améliorant l'efficacité thérapeutique des anticorps monoclonaux. Ainsi, des anticorps monoclonaux fonctionnels ont été produits par des levures (*Pichia Pastoris*) [190], des champignons filamenteux (*Aspergillus niger*) [191], des cellules d'insectes [192], des cellules aviaires [193] et même par des organismes transgéniques végétaux (feuilles de tabac) [194] ou animaux (chèvres, poules) [195]. Ces différents systèmes sont très compétitifs en terme de productivité et de coût de production. Ils permettent aussi parfois de produire des anticorps présentant des fonctions cytotoxiques améliorées par rapport à leurs analogues synthétisés par des cellules CHO (souvent grâce à un faible taux de fucose ajouté au motif glucidique) [195]. Néanmoins, ces systèmes de production alternatifs génèrent également des modifications post-traductionnelles spécifiques (en particulier des glycosylations), potentiellement immunogènes pour l'homme et pouvant également affecter la fonctionnalité des anticorps (Figure 22). Ainsi, des stratégies d'humanisation des voies de biosynthèse des glycanes chez des hôtes comme la levure, les champignons, les cellules d'insecte et les cellules végétales sont en développement afin de combiner la forte productivité de ces systèmes avec l'optimisation fonctionnelle des anticorps [196-198]. Par ailleurs, le système bactérien (le moins coûteux) n'est pas adapté à la production d'anticorps entiers. Cependant la production de petits fragments d'anticorps de type scFv est possible [199]. De plus, la découverte des anticorps de camélidés, dont la partie variable n'est composée que d'une chaîne lourde, a relancé l'intérêt pour ce système de production [200]. En effet, ce petit fragment variable de 12 kDa, nommé sDAb (single domain antibody) ou VHH, est facilement produit en bactéries avec de très bons rendements. D'ailleurs, la société Ablynx produit et exploite commercialement ce type de fragments d'anticorps (les nanobodies), dont certains sont en cours d'évaluation clinique pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde ou du cancer.

La recherche dans le domaine de la production des protéines thérapeutiques est très active et de nombreux systèmes de production alternatifs aux cellules mammaliennes sont en cours d'étude. Dans un avenir proche, de nouvelles plateformes de production d'anticorps monoclonaux devraient être approuvées et permettre une baisse progressive des coûts tout en améliorant les propriétés cliniques de ces agents thérapeutiques [188]. De plus, l'émergence du concept d'anticorps « biosimilaires », à la manière des versions génériques des petites molécules chimiques, devrait également contribuer à la baisse du prix des traitements [201].



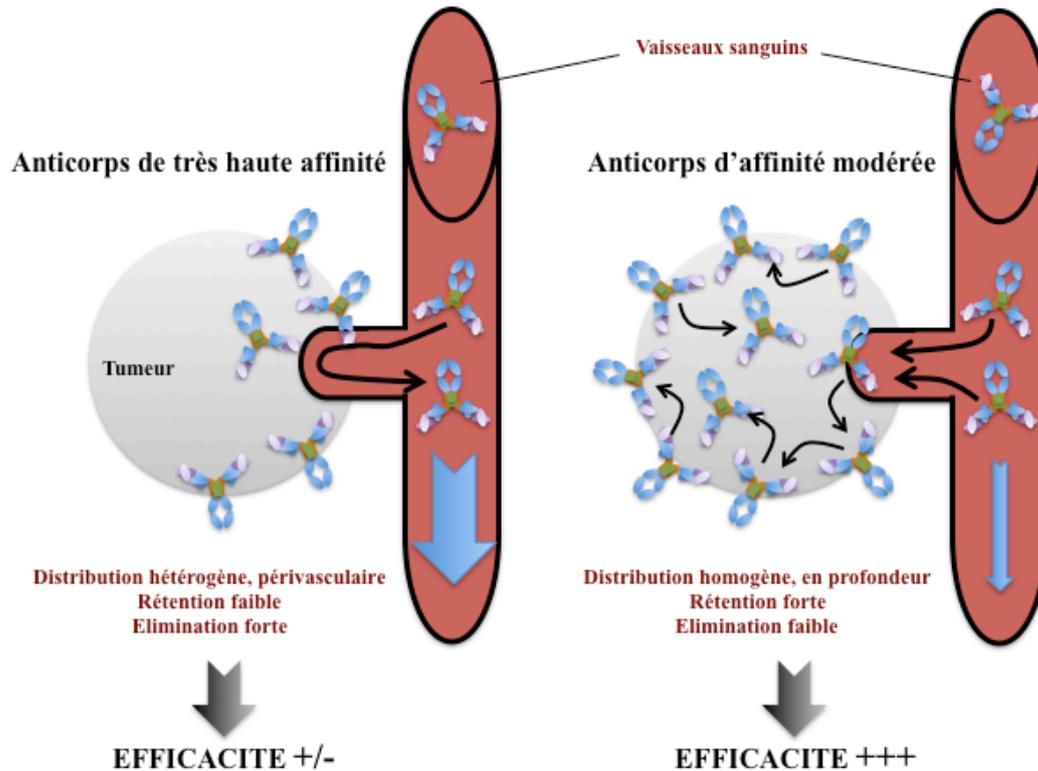
**Figure 22. Motifs oligosaccharidiques greffés sur les protéines recombinantes thérapeutiques en fonction des différents systèmes d'expression.** Certains motifs contenant de fortes proportions de mannose (Levure), des résidus fucose ajoutés en alpha 1,3 ou des résidus xylose sont potentiellement immunogènes chez l'homme. D'après [191].

### - Biodistribution et efficacité des anticorps thérapeutiques

Comme indiqué plus haut, l'efficacité clinique des anticorps monoclonaux thérapeutiques est globalement décevante, et ce surtout dans le traitement des tumeurs solides. En effet, lorsqu'ils sont utilisés en monothérapie, des anticorps comme le cétuximab, le trastuzumab ou le panitumumab ne sont efficaces que dans 5 à 30 % des patients [202]. De plus, les patients répondeurs ne présentent que très rarement des rémissions complètes. Le développement de ces anticorps est en fait dû à leur bonne tolérance (comparée aux molécules chimiques classiques) et à leur association synergique avec les agents cytotoxiques anticancéreux classiques. Concernant les tumeurs hématologiques, les succès cliniques sont plus nombreux. On observe des taux de réponse bien supérieurs et parfois des rémissions complètes [203]. Le rituximab, un anticorps anti-CD20, présente des taux de réponses partielles d'environ 50 % chez des patients atteints de lymphomes folliculaires ou de lymphomes diffus à grandes cellules B [204]. Son bénéfice thérapeutique est également établi dans les leucémies lymphoïdes chroniques pour lesquelles il permet d'augmenter significativement la survie sans progression de la maladie [189]. Néanmoins, comme pour les anticorps ciblant les tumeurs solides, le rituximab est systématiquement associé à des agents chimiothérapeutiques, une combinaison qui peut élever le taux de réponse à plus de 80 % des patients dans certaines études [205]. Au vu de ces résultats, il n'est pas étonnant que 40 % des anticorps anticancéreux sur le marché soient dirigés contre des tumeurs hématologiques plutôt que contre des tumeurs solides, qui représentent pourtant plus de 8 cancers sur 10. La principale raison expliquant cette grande différence d'efficacité repose sur l'accessibilité des cellules cancéreuses pour les anticorps thérapeutiques. En oncohématologie, les cellules tumorales sont majoritairement circulantes et donc directement accessibles aux anticorps

administrés en intraveineuse. Par contre, dans le cas de tumeurs solides, les cellules cancéreuses sont localisées dans les tissus et sont donc plus difficiles à atteindre. A titre d'exemple, des études *in vivo* chez la souris estiment que seulement 20 % des doses d'anticorps administrées se localisent effectivement au sein des masses tumorales, ce qui limite sévèrement l'efficacité thérapeutique [206]. Cette biodistribution tumorale défavorable est principalement due au poids moléculaire élevé des anticorps. En effet, la diffusion des molécules dans les tissus suit une loi inversement proportionnelle à la racine cubique du poids moléculaire. Par conséquent, de grosses molécules comme les anticorps pénètrent difficilement dans les tissus, et encore plus laborieusement au sein de tumeurs solides, caractérisées par une pression interstitielle élevée, un réseau vasculaire désorganisé et une forte viscosité sanguine [207]. De plus, le recyclage des anticorps vers la circulation grâce au récepteur FcRn (voir le paragraphe 1.7) peut aussi être un facteur limitant la pénétration des anticorps au sein des tissus malades. Enfin, des études ont également montré que l'affinité et l'avidité des anticorps sont des paramètres importants pour leur pénétration dans les tumeurs [208]. En effet, des études sur un ensemble de fragments scFv anti-HER2 ont révélé que l'affinité influence la localisation et la distribution des anticorps au sein des tumeurs. Les scFv de faible affinité ( $10^{-7}$ - $10^{-8}$  M) se distribuent d'une manière uniforme dans la masse tumorale alors que ceux de haute affinité se fixent préférentiellement sur les cellules tumorales périphériques, limitant ainsi leur efficacité thérapeutique [209, 210]. De plus, lorsque des fragments scFv anti-HER2 bivalents (appelés diabodies) sont utilisés, cette corrélation inverse entre affinité et répartition tumorale est accentuée [211]. En résumé, de trop fortes affinités peuvent être suboptimales pour l'efficacité thérapeutique d'anticorps ciblant des tumeurs solides. Cet effet, initialement identifié en 1989 par Weinstein et son équipe, est appelé « binding site barrier effect » (Figure 23) [212]. Il décrit le fait que des anticorps de trop haute affinité vont être piégés à la périphérie de la tumeur (lors de leur première rencontre avec l'antigène), alors que des anticorps moins affins ont la possibilité de se dissocier plus facilement du premier antigène rencontré, ce qui leur permet de pénétrer plus profondément dans la masse tumorale et d'améliorer leur rétention, leur distribution et, au final, leur efficacité thérapeutique. Prises ensemble, toutes ces données démontrent que la bonne pénétration des anticorps thérapeutiques dans les tissus et, qui plus est, dans les tumeurs solides, repose sur un équilibre subtil entre des caractéristiques inhérentes à l'anticorps (poids moléculaire, affinité, valence, demi-vie) et des propriétés propres à l'antigène ciblé (densité, internalisation,...).

La biodistribution des anticorps anticancéreux est par conséquent optimisable en trouvant un bon compromis entre affinité, poids moléculaire et demi-vie. Une bonne association de ces trois paramètres devrait permettre d'augmenter nettement l'efficacité des anticorps pour le traitement des tumeurs solides.



**Figure 23. Schématisation du phénomène de « binding site barrier effect ».** Les anticorps de trop haute affinité ne pénètrent pas efficacement au sein des tumeurs solides et sont « piégés » en périphérie à la suite de leur première rencontre avec l'antigène (panneau de gauche). Au contraire, les anticorps présentant des affinités plus modérées pour leur cible se dissocient plus facilement, et peuvent ainsi pénétrer au cœur de la masse tumorale, ce qui favorise leur rétention et leur action thérapeutique antitumorale.

- Limitations liées aux modes d'action des anticorps thérapeutiques

Les anticorps antitumoraux ont souvent plusieurs modes d'action qui combinent, par exemple, le blocage d'une molécule de surface avec le recrutement des effecteurs immunitaires (voir paragraphes 2.4.3). Ces mécanismes sont généralement bien caractérisés *in vivo* chez l'animal. En revanche, une fois injectés chez les patients, les événements permettant aux anticorps d'assurer leurs actions thérapeutiques ne sont pas toujours clairs. De plus en plus de preuves cliniques indiquent que les fonctions effectrices (notamment l'ADCC) médiées par le fragment Fc ont un rôle majeur dans l'efficacité des anticorps thérapeutiques [213]. Plusieurs groupes de recherche se sont intéressés au polymorphisme des FcγRs et à son impact sur l'efficacité clinique des anticorps. Des études avec le rituximab ont démontré que des polymorphismes du FcγRIIIa influencent l'efficacité du traitement chez des patients

atteints de lymphomes [214]. Environ 20% des patients européens possèdent une valine à la position 158 du FcγRIIIa, alors que les 80% restant ont une phénylalanine. Il a été montré que le variant allélique du récepteur V158 présente une affinité pour les IgG1 5 fois supérieure à celle du variant F158 [215]. Ceci se traduit *in vitro* par une capacité d'ADCC amplifiée, et en clinique par une augmentation significative de la survie des patients homozygotes pour la forme V158 par rapport aux hétérozygotes ou aux homozygotes F158. Cette étude est actuellement la preuve la plus forte de l'importance des fonctions effectrices médiées par le récepteur Fc dans l'efficacité thérapeutique des anticorps antitumoraux. D'autres récepteurs Fc d'importance, comme le FcγRIIa, possèdent des variants alléliques (R131 ou H131). Cependant, l'impact de ce polymorphisme sur l'efficacité des traitements est peu étudié et ne permet pas, à l'heure actuelle, de prouver l'importance de ce récepteur dans l'efficacité thérapeutique des anticorps [216].

Malheureusement, l'activation des fonctions effectrices des anticorps *in vivo* est entravée par plusieurs phénomènes. Premièrement, comme décrit ci-dessus, le fait que 80% de la population possèdent le variant de faible affinité du FcγRIIIa est un problème majeur qui limite le déclenchement de l'ADCC. Deuxièmement, la majorité des anticorps thérapeutiques sur le marché est largement fucosylée au niveau du Fc, une modification qui diminue significativement l'efficacité de l'ADCC [217, 218]. En effet, des études démontrent que des anticorps défucosylés ont une capacité à induire l'ADCC 100 fois supérieure à celle d'anticorps fucosylés [219, 11] (classiquement produits en cellules mammaliennes de type CHO). Troisièmement, une fois injectés dans la circulation, les anticorps thérapeutiques entrent en compétition avec une forte concentration d'IgG sériques, dont les deux tiers sont des IgG1 capables d'interagir avec le FcγRIIIa [220]. Quatrièmement, la co-expression du FcγRIIb et des FcγRs activateurs sur la plupart des cellules effectrices peut diminuer les fonctions cytotoxiques des anticorps [221]. Enfin, les cellules ciblées peuvent développer des mécanismes d'échappement aux activités cytotoxiques des anticorps. Ceci peut se traduire par : (i) une baisse d'expression de l'antigène membranaire ciblé, liée à l'internalisation induite par l'anticorps ou à « l'arrachage » des complexes Ag-Ac par des macrophages (phénomène de « shaving ») [222], (ii) la protéolyse limitée de certains ectodomaines extracellulaires par des métalloprotéases (phénomène de « shedding ») [223] ou (iii) l'expression de molécules inhibant les fonctions effectrices comme les protéines MCP (*Membrane Cofactor Protein* ou CD46) et DAF (*Decay Accelerating Factor* ou CD55, CD59) qui diminuent la CDC [224].

Toutes ces limitations diminuent grandement les fonctions effectrices des anticorps à activité antitumorale et expliquent donc leur manque d'efficacité clinique globale. Cependant, l'identification précise de ces obstacles permet actuellement d'envisager des stratégies pour les contourner, notamment en optimisant l'affinité du Fc pour les FcγRs activateurs par mutagenèse dirigée ou par l'ingénierie des glycosylations (voir paragraphe suivant).

#### *2.4. L'ingénierie des anticorps thérapeutiques : les anticorps optimisés*

Le but de l'ingénierie des anticorps est d'améliorer les propriétés pharmacologiques des anticorps thérapeutiques afin d'accroître leur efficacité et leur sécurité d'utilisation. Cette ingénierie se réalise de façon rationnelle en fonction de la pathologie à traiter et de la stratégie thérapeutique envisagée. Comme cela est indiqué sur la figure 16 (page 28), deux approches sont possibles : (1) optimiser les propriétés préexistantes ou (2) doter les anticorps de nouvelles fonctionnalités.

##### **2.4.1. Optimisation des propriétés de liaison à l'antigène**

La bonne interaction de l'anticorps avec son antigène cible est une des propriétés les plus importantes pour un anticorps thérapeutique. Grâce aux techniques de phage display et de mutagenèse, la maturation de l'affinité des anticorps *in vitro* est désormais relativement aisée. Des mutations localisées ou aléatoires sont effectuées au niveau des régions variables (CDRs ou FRs), puis sélectionnées par phage display en fonction de l'amélioration de l'affinité du paratope pour sa cible [112]. Ainsi, grâce à cette approche, des anticorps de haute affinité peuvent être sélectionnés. Ce fut le cas par exemple, pour des anticorps anti-gp120 ou anti-HER2, dont l'affinité a pu être améliorée d'un facteur 1000 grâce à l'insertion de mutations au niveau des CDRs [225, 226]. L'augmentation de l'affinité des anticorps grâce aux techniques apparentées au phage display, est très souvent liée à une réduction de la vitesse de dissociation ( $k_{off}$ ). Ceci se traduit généralement par une amélioration de l'efficacité thérapeutique, en particulier pour les anticorps ciblant des antigènes solubles ou circulants comme des toxines, des cytokines ou des virus [227]. Néanmoins, cette corrélation positive entre affinité et efficacité thérapeutique n'est pas toujours vérifiée, notamment dans le cas des anticorps thérapeutiques ciblant des tumeurs solides [208] (voir paragraphe 2.3.5). Au vu de cette complexité, il semblerait que seule une approche empirique (au cas par cas) soit en mesure de guider convenablement l'optimisation de l'affinité des anticorps afin d'obtenir la meilleure efficacité thérapeutique.

Outre le paramètre d'affinité, la liaison d'un anticorps à un antigène est également caractérisée par sa spécificité. Cet aspect est particulièrement important lorsque l'antigène possède plusieurs isoformes moléculaires ou appartient à une famille protéique caractérisée par des structures et séquences proches. Dans ce cas, il est possible que l'anticorps se fixe significativement à d'autres antigènes, ce qui peut être à l'origine d'effets indésirables toxiques. Pour pallier ce problème, les anticorps peuvent être sélectionnés en fonction des réactions croisées qu'ils présentent avec des cibles apparentées, et/ou éventuellement optimisés après sélection par mutagenèse des régions variables afin de limiter la fixation à d'autres antigènes [228]. De la même façon, certains anticorps thérapeutiques sont sélectionnés positivement en fonction des réactions croisées qu'ils possèdent avec l'antigène correspondant chez une autre espèce (souris, rat, singe). Les méthodes apparentées au phage display sont particulièrement bien adaptées pour la production d'anticorps présentant des réactions croisées inter-espèces, puisqu'aucun mécanisme de tolérance n'est présent [229-231]. La fixation des anticorps thérapeutiques sur leurs cibles orthologues chez la souris, le rat ou le singe est une caractéristique qui peut grandement faciliter les tests précliniques de toxicité et d'efficacité.

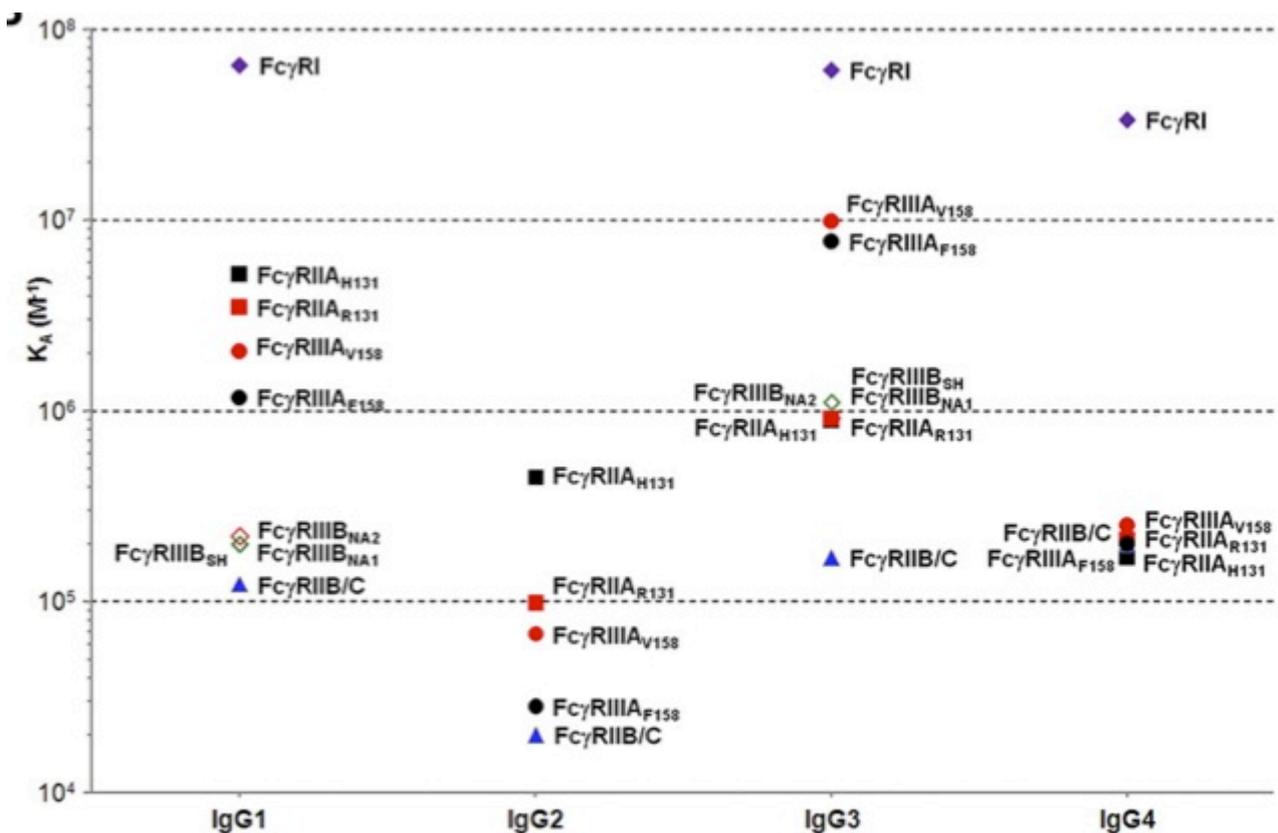
#### **2.4.2. Optimisation des fonctions effectrices**

Les fonctions effectrices des anticorps thérapeutiques sont portées par le fragment Fc. En effet, c'est grâce à cette région que les anticorps peuvent recruter des effecteurs moléculaires et cellulaires permettant l'élimination de l'antigène par des mécanismes de CDC d'ADCC ou d'ADCP (voir paragraphe 1.6, pages 11-12). En fonction de la pathologie à traiter, ces fonctions effectrices peuvent être requises car elles contribuent à l'efficacité thérapeutique (cancer), ou bien au contraire indésirables car elles sont responsables d'effets secondaires chez les patients. Ainsi, l'optimisation du « profil effecteur » des anticorps est un paramètre important pour leur efficacité et leur sûreté clinique, qui doit être guidé par la nature de l'antigène ciblé, la stratégie thérapeutique envisagée et le contexte clinique de la pathologie [94]. L'optimisation des fonctions effectrices peut s'effectuer de différentes façons : en changeant l'isotype de l'anticorps, en introduisant des mutations dans la portion Fc ou en modifiant le type de glycosylation.

##### *- Choix de l'isotype*

Les quatre isotypes d'IgG humaines possèdent des fonctions effectrices différentes à cause de leurs affinités respectives pour les récepteurs Fc activateurs et inhibiteurs ainsi que pour le fragment C1q du complément [46, 232]. En effet, Les IgG1 et les IgG3 se lient efficacement

aux récepteurs activateurs FcγRIIa et RIIIa et plus faiblement au récepteur inhibiteur FcγRIIb, alors que les IgG2 et surtout les IgG4 se fixent faiblement sur tous ces récepteurs (Figure 24). La forte affinité de tous les isotypes (sauf les IgG2) pour le récepteur activateur FcγRI, n'a en fait pas de répercussion sur les fonctions effectrices car ce récepteur (le seul à pouvoir fixer les IgG monomériques) est constamment saturé par les IgG sériques, ce qui limite fortement son implication dans les fonctions effectrices des anticorps thérapeutiques. Si on calcule les rapports A/I (affinité pour le récepteur activateur / affinité pour le FcγRIIb ; voir paragraphe 1.6) pour chacun des isotypes, on constate que les IgG1 et 3 sont les isotypes préférentiels pour déclencher des réponses effectrices cytotoxiques, principalement via les récepteurs FcγRIIa et IIIa (Figure 24). Ces récepteurs sont essentiellement exprimés par les cellules NK (FcγRIIIa), les macrophages, les cellules dendritiques et les polynucléaires neutrophiles. Par ailleurs, les IgG1 et 3 sont également les deux isotypes les plus affins pour le fragment C1q du complément, ce qui élargit leur répertoire d'activités cytotoxiques.



	FcγRIIa	FcγRIIc	FcγRIIIa	FcγRIIb
IgG1	40-50	1	10-20	2
IgG2	9-30	1	2-6	0
IgG3	9	1	70-90	9
IgG4	1	1	1	0

Figure 24. Affinité des différents FcγRs humains pour les quatre isotypes d'IgG. L'affinité de chaque sous-classe d'IgG pour les cinq FcγRs humains et leurs variants alléliques a été déterminée par résonance plasmonique de surface. D'après [46]. Le tableau présente les rapports A/I qui correspondent aux ratios entre les affinités de chaque isotype pour chacun des récepteurs activateurs avec celle pour le récepteur inhibiteur FcγRIIb.

Ainsi, la plupart des anticorps thérapeutiques approuvés pour la cancérologie sont des IgG1 (Rituximab, Trastuzumab, Panitumumab), afin de favoriser l'élimination des cellules tumorales par les effecteurs immunitaires. De même, pour des indications où l'élimination efficace de médiateurs solubles ou de cellules inflammatoires est requise (e.g. TNF- $\alpha$  et interleukines pour les maladies inflammatoires ou cellules T activées CD25<sup>+</sup> pour la transplantation), les IgG1 sont l'isotype de choix. Par contre, n'existe pas d'IgG3 sur le marché et ce, probablement à cause de leur courte demi-vie sérique. En revanche, on retrouve quelques IgG2 et IgG4 lorsque la stratégie thérapeutique ne vise qu'à neutraliser un antigène tout en limitant le déclenchement de réactions cytotoxiques. C'est le cas par exemple du natalizumab, une IgG4 ciblant l'intégrine  $\alpha$ 4 dans le traitement de la sclérose en plaque ou de l'éculizumab, une immunoglobuline hybride constituée des domaines C<sub>H1</sub> et charnière d'une IgG2 et des domaines C<sub>H2</sub> et C<sub>H3</sub> d'une IgG4. Pour ces anticorps, le but est de limiter leur liaison aux Fc $\gamma$ Rs et au complément afin de réduire une toxicité non spécifique potentielle.

#### - Ingénierie du fragment Fc

Les anticorps thérapeutiques peuvent être directement mutés au niveau de leur région Fc afin de moduler à façon leurs interactions avec les récepteurs Fc activateurs et inhibiteur. Une cartographie des résidus importants pour la fixation des IgG1 aux différents FcRs a été réalisée et s'est révélée efficace pour générer des anticorps thérapeutiques antitumoraux possédant des fonctions effectrices accrues [233]. Ainsi, des mutations au niveau des acides aminés 230-240 de la partie carboxy-terminale de la région charnière permettent d'augmenter d'un facteur 100 la liaison du trastuzumab et de l'alemtuzumab sur le récepteur activateur Fc $\gamma$ RIIIa, tout en maintenant une fixation modérée sur le récepteur inhibiteur Fc $\gamma$ RIIb [219]. Ceci se traduit par une très nette amélioration de l'ADCC médiée par les cellules NK et également une légère augmentation de l'ADCP effectuée par les macrophages. Par ailleurs, des mutations augmentant la liaison du Fc avec le fragment C1q ont également été réalisées [234]. Des variants de l'anticorps rituximab possédant une affinité améliorée pour le fragment C1q ont été obtenus et ont montré une toxicité dépendante du complément améliorée dans des tests *in vitro* [235]. Des mutations au niveau de la région charnière ou le remplacement de certains résidus du Fc d'une IgG1 par ceux d'une IgG3 sont également des stratégies qui se sont révélées concluantes pour augmenter la cytotoxicité dépendante du complément.

L'ingénierie du fragment Fc s'est principalement axée sur l'amélioration de l'affinité des IgG1 pour le récepteur Fc $\gamma$ RIIIa. Ce récepteur est généralement le seul à être exprimé par les cellules NK, qui sont donc particulièrement efficaces pour détruire des cellules cibles (e.g.

des cellules tumorales). De plus, des études cliniques avec le rituximab démontrent que des polymorphismes du Fc $\gamma$ RIIIa influencent l'efficacité du traitement chez des patients atteints de lymphomes [214] (voir page 49). Cependant, il existe un second récepteur Fc potentiellement intéressant pour la thérapie : le Fc $\gamma$ RIIa. Ce récepteur est exprimé principalement par les polynucléaires neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. L'interaction entre ce récepteur et un complexe immunitaire permet de déclencher le processus d'ADCP par les phagocytes et/ou d'induire l'apoptose de cellules cibles via le relargage de substances cytotoxiques (ADCC). Plus important encore, l'activation de cellules présentatrices de l'antigène professionnelles comme les macrophages ou les cellules dendritiques peut potentiellement permettre de présenter des antigènes tumoraux aux lymphocytes T [150]. Une fois activés, les L<sub>T</sub> cytotoxiques peuvent directement participer à l'éradication de la tumeur et également assurer une immunité à long terme, évitant ainsi les rechutes. Par conséquent, l'amélioration de l'affinité des anticorps pour le Fc $\gamma$ RIIa semble être une stratégie très pertinente, en particulier pour le traitement des cancers. Cependant, les cellules exprimant le Fc $\gamma$ RIIa possèdent également le Fc $\gamma$ RIIb qui présente de fortes similarités de séquence avec ce dernier. Ainsi, il est extrêmement difficile de développer des anticorps possédant un Fc se fixant fortement et sélectivement au Fc $\gamma$ RII activateur [236]. Néanmoins, une étude récente a montré que la mutation Gly236Ala améliore grandement l'affinité des IgG1 pour le Fc $\gamma$ RIIa, tout en maintenant une liaison faible sur le Fc $\gamma$ RIIb (la sélectivité est améliorée d'un facteur 15) [237]. Cette mutation augmente l'ADCP de cellules tumorales par des macrophages *in vitro* et se combine positivement avec d'autres mutations qui favorisent l'ADCC. Par ailleurs, certaines études cliniques semblent mettre en évidence l'implication du Fc $\gamma$ RIIa dans l'efficacité d'anticorps antitumoraux (le rituximab pour les lymphomes [151], une IgG3 anti-GD2 pour les neuroblastomes [238]), ce qui valide l'intérêt de l'approche consistant à améliorer l'affinité du Fc pour le Fc $\gamma$ RIIa.

La seconde stratégie utilisée pour moduler les fonctions effectrices des anticorps thérapeutiques via le Fc consiste à modifier la structure du motif oligosaccharidique greffé sur l'asparagine 297 du domaine CH2. Cette N-glycosylation est importante pour maintenir la conformation native du Fc et sa composition glucidique influence grandement les fonctions effectrices médiées par les Fc $\gamma$ R et le complément [239]. Des études ont démontré que la présence de fucose, à la base de la chaîne glucidique, engendre une forte baisse de l'ADCC [217, 218]. De même, des taux élevés d'acide sialique ou de N-acétylglucosamine (GlcNAc) terminaux ont respectivement un impact négatif sur l'ADCC ou la CDC [70, 240]. Au

contraire, l'augmentation du nombre de résidus transversaux de GlcNac favorise l'ADCC [241]. Ainsi, des lignées cellulaires capables de produire des anticorps défucosylés et/ou contenant de nombreux résidus GlcNac transversaux ont été développées. Par exemple, des lignées CHO délétées du gène FUT8 codant l' $\alpha$ -1,6-fucosyltransférase, ou transfectées pour surexprimer la  $\beta$ -1,4-N-acétylglucosaminetransférase III, ont permis de produire des anticorps possédant une meilleure fonction d'ADCC [242]. D'autres cellules hôtes ont également été développées pour générer des anticorps glyco-optimisés, notamment des levures génétiquement modifiées pour réaliser des glycosylations humaines [243]. L'absence de fucose semble être la modification glucidique la plus efficace pour augmenter l'ADCC : des variants défucosylés du rituximab et du trastuzumab possèdent une meilleure affinité pour le Fc $\gamma$ RIIIa et une activité d'ADCC augmentée d'un facteur 100 [244]. De plus, cette amélioration de l'ADCC liée à l'absence de fucose est indépendante du polymorphisme du Fc $\gamma$ RIIIa à la position 158 [245]. Il a également été démontré que les anticorps défucosylés sont moins sensibles à la compétition avec les IgG sériques pour la liaison sur le Fc $\gamma$ RIIIa [244], ce qui explique en partie leur meilleure efficacité *in vivo*.

A l'heure actuelle, il existe au moins une dizaine d'anticorps possédant des Fc optimisés en cours d'essai clinique. Par exemple, le GA-101 (Roche/Glycart), un anticorps monoclonal défucosylé et possédant des résidus N-acétylglucosamine, est en cours de phase II pour le traitement des lymphomes non Hodgkiniens [246]. Le Xmab2513 (Xencor), un anticorps anti-CD30 muté dans la région Fc pour optimiser l'ADCC, est également en phase d'étude clinique pour la thérapie des lymphomes. Ces modifications glucidiques ou mutations sont également mises à profit pour générer des anticorps sans activité cytotoxique [247]. C'est le cas pour le téplizumab (Macrogenics/Lilly) qui possède les mutations Leu234Ala et Leu235Ala réduisant la liaison au FcR , et pour l'otelixizumab (Tolerx) qui est muté au niveau de l'asparagine 297, ce qui empêche la N-glycosylation. Ces deux derniers anticorps ciblent le récepteur CD3 sans induire d'effet mitogène et de choc cytokinique (à la différence du muromonab). Ils sont actuellement en phase III pour le traitement du diabète de type I.

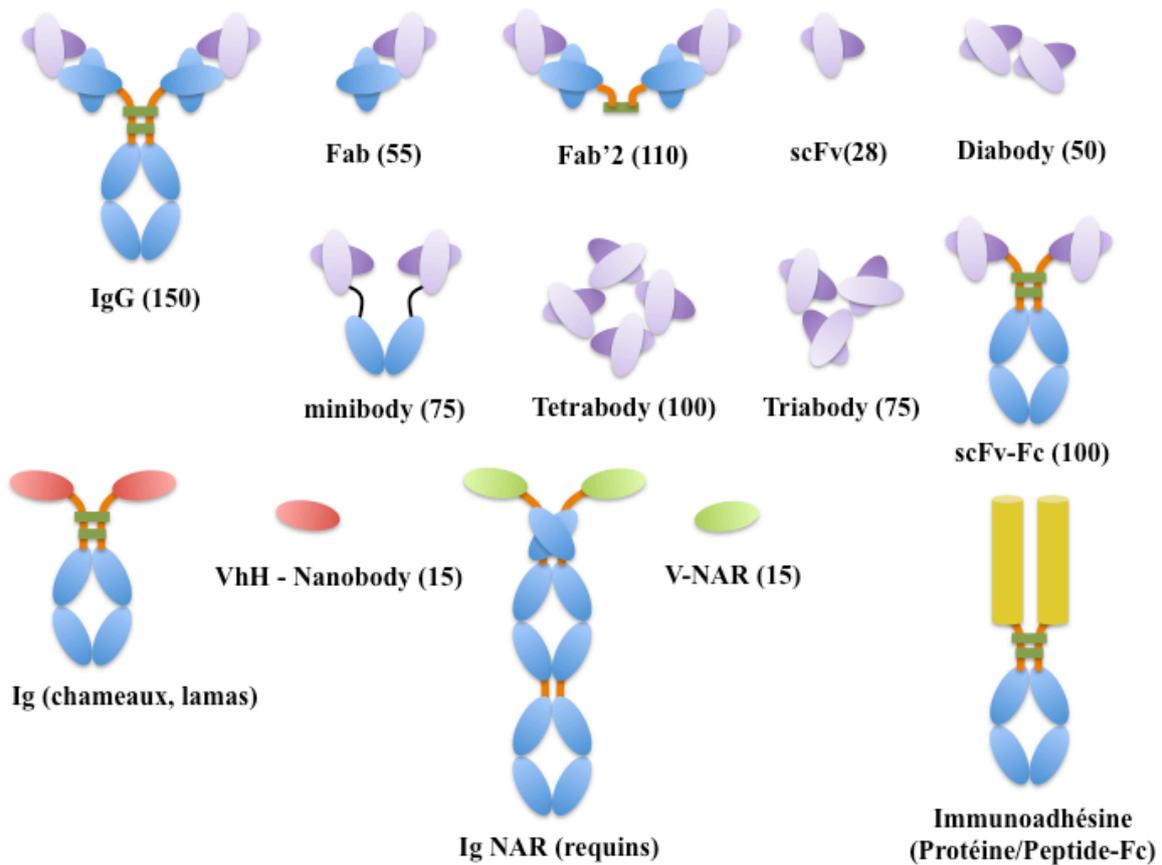
### **2.4.3. Optimisation des propriétés pharmacocinétiques et de biodistribution**

La demi-vie et la biodistribution des anticorps sont deux paramètres étroitement liés qui dépendent à la fois de l'anticorps (fragment, anticorps entier, murin, humanisé,...) et de l'antigène cible (densité, internalisation,...). Il est parfois souhaitable d'augmenter la demi-vie pour améliorer l'efficacité, pour diminuer les doses et la fréquence des injections, pour

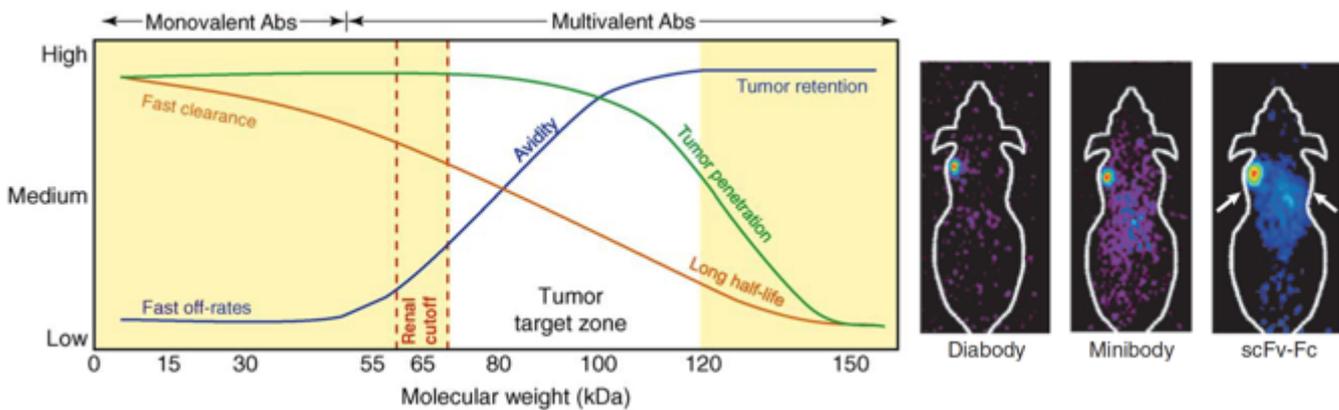
réduire les coûts ou pour optimiser la distribution et la rétention dans les tissus ciblés [126]. En revanche, dans d'autres cas, il est préférable de restreindre la demi-vie pour limiter les effets secondaires ou accroître la résolution lors d'une utilisation des anticorps en imagerie par exemple. Un moyen efficace pour moduler la pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques est de jouer sur l'interaction entre le fragment Fc et le récepteur FcRn. Pour rappel, le FcRn est le récepteur responsable du recyclage des IgG qui leur assure une demi-vie d'environ 20 jours chez l'homme (voir paragraphe 1.7, page 17). Grâce à la technique du phage display, des mutations augmentant ou au contraire diminuant la liaison du Fc au FcRn ont été identifiées. En particulier, des combinaisons de mutations renforçant l'interaction avec le FcRn à pH 6, mais sans influence à pH 7.4, ont été sélectionnées et ont permis de multiplier la demi-vie des anticorps d'un facteur 2 à 4 [248-250]. Cette forte augmentation a récemment été corrélée avec une amélioration de l'efficacité des anticorps dans des modèles animaux [251]. De plus, ces mutations permettant d'augmenter la demi-vie sont compatibles avec d'autres mutations utilisées pour optimiser l'ADCC [250]. Fort de ces résultats, des anticorps possédant de telles mutations, comme le MEDI-557 (MedImmune), sont en cours de phase I afin de valider les résultats obtenus avec les modèles animaux. Par ailleurs, des IgG mutées dans le but de fixer plus efficacement le FcRn à pH physiologique ont été obtenues et engendrent une chute rapide de la concentration des IgG circulantes [252]. Ces anticorps bloquant le FcRn, nommés « Abdegs » pour *antibodies that increase IgG degradation*, pourraient avoir un intérêt thérapeutique dans les maladies auto-immunes en favorisant l'élimination des IgG pathologiques du sérum [252].

Pour certaines applications, il est parfois bénéfique de limiter la demi-vie des anticorps. Cet effet est facilement atteint en utilisant des fragments d'anticorps dépourvus de leur portion Fc, évitant ainsi le recyclage via le FcRn et favorisant l'élimination rénale (dont la limite de filtration se situe à environ 60 kDa). Deux fragments Fab non modifiés sont d'ailleurs commercialisés : l'abciximab (Réopro<sup>TM</sup>) et le ranibizumab (Lucentis<sup>TM</sup>). Le premier est utilisé lors d'opérations d'angioplastie pour limiter les risques de thrombus et le second pour le traitement de la DMLA (Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age) via une injection intravitréenne. Dans certaines situations, il peut être intéressant de posséder des anticorps avec une demi-vie intermédiaire entre un anticorps entier et un fragment. Ceci peut être accompli grâce à des mutations au niveau du Fc d'anticorps entiers ou par le greffage de groupements de polyéthylène glycol sur des fragments Fab (PEGylation). En fonction de la taille, de l'arborescence et/ou du site de greffage du groupement PEG, des fragments

possédant une demi-vie allant de quelques heures à plusieurs jours peuvent être produits [253]. Il existe actuellement un fragment Fab PEGylé sur le marché, le certolizumab pegol (Cimzia™), qui présente un profil pharmacocinétique similaire à une IgG entière tout en évitant de potentiels effets secondaires associés au Fc. Outre les fragments Fab, de nombreux autres fragments d'anticorps ont été conçus. Grâce aux techniques d'ingénierie moléculaire, des fragments très variés possédant des tailles, des valences et des spécificités multiples ont été générés (pour une liste exhaustive voir les références [254, 255]). Parmi ces nouveaux formats, on trouve les scFv, les diabodies, les minibodies, les scFv-Fc, les tétrabodies, les nanobodies et encore beaucoup d'autres (Figure 25). Ces différents fragments, qui possèdent des masses moléculaires et des valences différentes, ont permis de mieux comprendre l'influence de ces deux paramètres sur la biodistribution des anticorps, notamment au sein des tumeurs solides. Des données expérimentales récentes ainsi que des travaux de modélisation suggèrent qu'il existe une fenêtre pharmacologique adaptée au ciblage tumoral ou « zone de ciblage tumoral » [256-258]. Comme on peut le voir sur la figure 26, pour se situer dans cette zone, il faut trouver le bon équilibre entre la taille, la valence et l'avidité de l'anticorps. Des anticorps bivalents ou trivalents de taille (entre 70 et 120 kDa) et d'avidité intermédiaires sont *a priori* des candidats idéaux pour parvenir à un ciblage tumoral optimisé. Au contraire, des fragments d'anticorps trop petits sont à proscrire car leur élimination est trop rapide et des anticorps trop gros sont également suboptimaux à cause de leur difficulté à diffuser au sein des tumeurs. Ainsi, en accord avec ces critères, mais également au vu de la littérature, des formats d'anticorps comme les minibodies, les scFv-Fc, les Fab'2 ou les diabodies apparaissent comme les meilleurs formats pour parvenir à un ciblage tumoral performant [254]. La distribution uniforme et en profondeur des anticorps antitumoraux est un point crucial pour la thérapie et l'imagerie des cancers. Des formats comme les diabodies permettent une pénétration tissulaire rapide, une bonne rétention mais également une bonne élimination rénale, ce qui aboutit à une fixation très spécifique sur les tumeurs. Par conséquent, ils sont très utilisés pour réaliser de l'imagerie *in vivo*, grâce au couplage avec des radionucléides (Figure 26, PET scan). Ces diabodies radiomarqués ont également un intérêt pour la thérapie car ils combinent une bonne pénétration tumorale avec une élimination rapide, ce qui permet de limiter l'exposition des tissus sains aux radiations (notamment le foie et la moelle osseuse). Des formats bivalents un peu plus gros, comme les Fab'2, les minibodies ou les scFv-Fc, s'accumulent généralement plus fortement dans les tumeurs ce qui les rend également intéressants pour la thérapie et l'imagerie des cancers [259, 260].



**Figure 25. Représentation schématique et non exhaustive des différents formats d'anticorps.** Différents fragments d'anticorps construits à partir d'une IgG sont présentés. Certains peuvent être produits par clivage enzymatique (Fab, Fab'2) alors que les autres formats, incluant les scFv, les scFv-Fc, les diabodies, minibodies, triabodies et les immunoadhésines sont issus de l'ingénierie moléculaire. Les VhH ou nanobodies ainsi que les V-NAR sont des fragments d'anticorps à domaine unique (sDAb) provenant respectivement d'immunoglobulines de camélidés et de requins. Les poids moléculaires (kDa) des différents anticorps sont indiqués entre parenthèses.



**Figure 26. Optimisation de la biodistribution intratumorale des anticorps.** Une zone de ciblage tumoral peut être définie en se basant sur les propriétés pharmacocinétiques, l'avidité et la valence des anticorps. Des anticorps monovalents de petite taille pénètrent efficacement dans les tumeurs, mais leur élimination rénale rapide et leur faible avidité ne permettent pas un ciblage tumoral efficace, compatible avec la thérapie ou l'imagerie. De même, des anticorps entiers bivalents sont eux trop gros pour pénétrer efficacement au sein des tumeurs. Un anticorps multivalent de taille intermédiaire (entre 70 et 120 kDa) semble être le format de choix pour réaliser un ciblage tumoral performant (D'après [255]). Cette observation est illustrée par les trois images de PET scan obtenues avec des diabodies, des minibodies ou des scFv-Fc anti-CEA couplés à de l'iode 124 (d'après [254]).

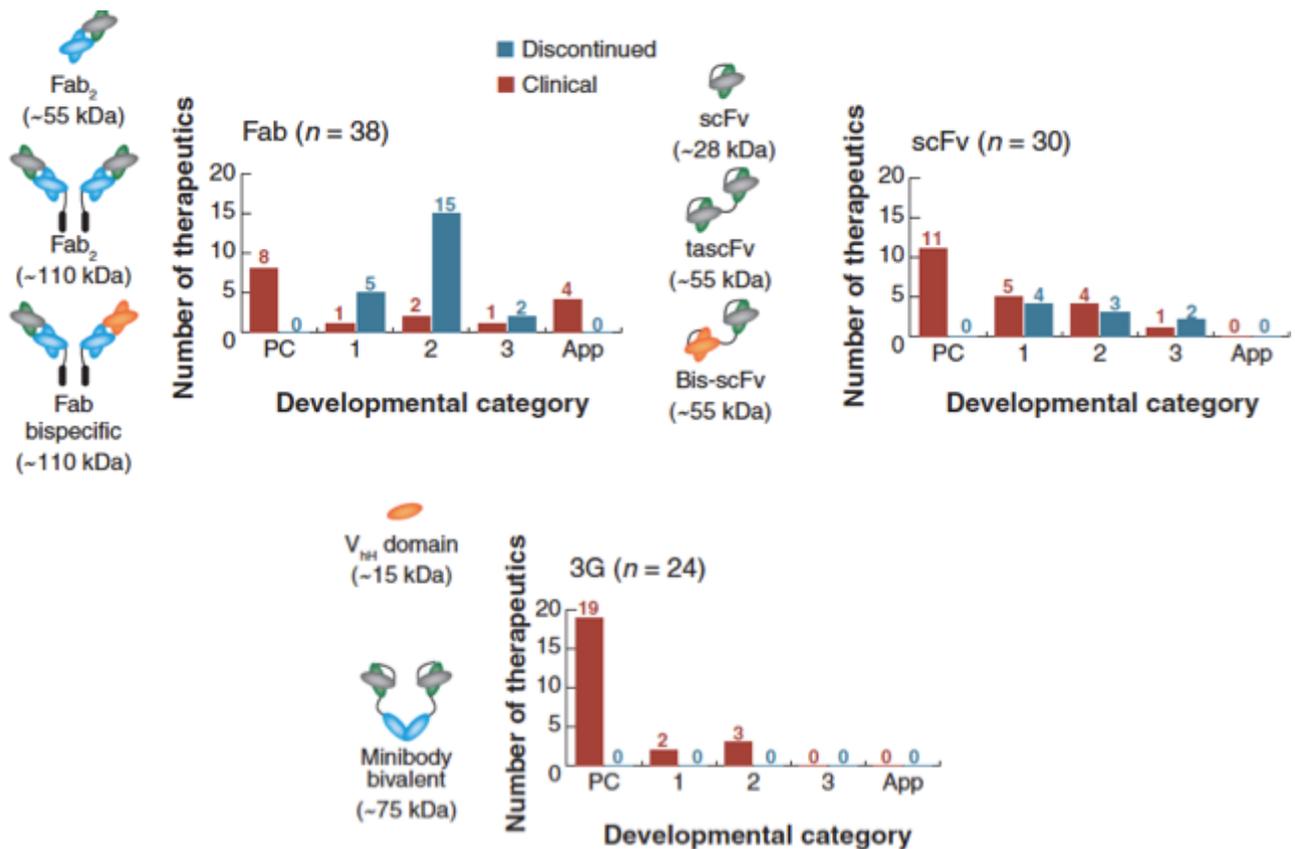
D'ailleurs, il existe actuellement un Fab'2 radiomarqué à l'iode 131, le <sup>131</sup>I-métuximab, approuvé pour le traitement des hépatocarcinomes. Par ailleurs, d'autres fragments Fab ou Fab'2 ont été développés et mis sur le marché pour le diagnostic de tumeurs solides. C'est le cas de l'arcitumomab (CEA-scan<sup>TM</sup>), du nofetumomab merpentan (Verluma<sup>TM</sup>) et de l'igovomab (Indimacis-125<sup>TM</sup>). Les anticorps et fragments d'anticorps ayant été approuvés pour un usage en imagerie clinique sont regroupés dans le tableau 3.

Enfin, certains fragments de faible poids moléculaire comme les anticorps à domaine unique (sDABs) peuvent comporter des propriétés intéressantes malgré leur demi-vie courte. Les nanobodies, en particulier, grâce à leur petite taille, sont capables de cibler des épitopes cryptiques [261], inaccessibles aux anticorps entiers, ce qui permettrait de cibler des antigènes « problématiques » comme les enzymes, les RCPGs ou certaines protéines virales. De plus, leur bonne solubilité et leur expression robuste permettent d'envisager des applications comme le ciblage intracellulaire, en exprimant les nanobodies directement dans le cytoplasme des cellules cibles (on parle alors d'intrabodies) [95]. Ceci permettrait d'éviter les problèmes de pénétration tumorale et/ou de pharmacocinétique et également de cibler de nouveaux antigènes pathologiques intracellulaires. Des essais *in vitro* prometteurs ont déjà été réalisés [262, 263] mais l'absence de technique capable de délivrer efficacement et spécifiquement le matériel génétique codant les intrabodies *in vivo*, limite pour le moment l'utilisation thérapeutique de ces derniers.

A l'heure actuelle, les seuls quatre fragments d'anticorps à avoir atteint le marché sont des Fab et leur intérêt par rapport à des anticorps entiers est parfois limité. L'émergence de nouveaux fragments issus de l'ingénierie moléculaire redonne un nouvel essor à cette classe d'anticorps thérapeutiques. En effet, parmi la soixantaine de fragments en cours de phase clinique, environ 80% sont des fragments de type scFv ou des fragments dits de troisième génération comme les nanobodies, les minibodies ou les diabodies, entre autres (Figure 27) [264]. De plus, les progrès parallèles des stratégies d'obtention des anticorps conjugués et/ou multispécifiques devraient permettre à ces nouveaux fragments de trouver rapidement leur place dans l'arsenal biothérapeutique.

Nom de marque / DCI	AMM	Industries	Formats	Indications	Cibles
<b>ANTICORPS ENTIERS</b>					
Oncoscint / <i>Satumomab pendetide</i>	1992 <sup>⊖</sup>	Cytogen	<sup>111</sup> In-IgG1	Cancers ovariens et colorectaux	TAG-72
Prostacint / <i>Capromab pendetide</i>	1996	Cytogen	<sup>111</sup> In-IgG1	Cancers de la prostate	PSMA
HumaSPEC / <i>Votumumab</i>	1998 <sup>⊖</sup>	Intracel	<sup>99m</sup> Tc-IgG3	Cancers du colon, du sein, de l'ovaire	Cytokeratine
Zevalin/ <i>Ibritumomab</i>	2000	Biogen-Idec	<sup>111</sup> In-IgG1	Lymphomes non Hodgkiniens	CD20
Bexxar / <i>Tositumomab</i>	2002	GSK	<sup>131</sup> I-IgG2a	Lymphomes non Hodgkiniens	CD20
Neutrospec / <i>Fanolesomab</i>	2004 <sup>⊖</sup>	Palatin Techn.	<sup>99m</sup> Tc-IgM	Appendicite	CD15
<b>FRAGMENTS D'ANTICORPS</b>					
CEA-scan / <i>Arcitumomab</i>	1996	Immunomedics	<sup>99m</sup> Tc-Fab	Cancers du colon, du sein, du poumon	CEA
Myoscint / <i>Imciromab pentetate</i>	1996 <sup>⊖</sup>	Centocor	<sup>111</sup> In-Fab	Nécroses du myocarde	Myosine
Verluma / <i>Nofetumomab merpentan</i>	1996	Boeingerher	<sup>99m</sup> Tc-Fab	Cancers du poumon	EGP40
Lymphoscan / <i>Bectumomab</i>		Immunomedics	<sup>99m</sup> Tc-Fab	Lymphomes non Hodgkiniens	CD22
Indimacis-125 / <i>Igovomab</i>	1996 <sup>⊖</sup>	CIS-Bio	<sup>111</sup> In-Fab'2	Cancers ovariens	CA-125
Leukoscan / <i>Sulesomab</i>	1997	Immunomedics	<sup>99m</sup> Tc-Fab	Ostéomyélite, Appendicite	NCA-90
<b>IMMUNOADHESINES</b>					
Lymphoseek / <i>Tilmanocept</i>	A venir	Neoprobes	<sup>99m</sup> Tc-Fc	Métastases ganglionnaires	CD206

**Tableau 3. Anticorps ayant atteint la commercialisation pour un usage en imagerie.** In : indium ; I : iode ; <sup>m</sup>Tc : technetium ; TAG-72 : Tumor Associated Glycoprotein 72 ; PSMA : Prostate Specific Membrane Antigen ; CEA : carcinoembryonic antigen ; EGP40 : Epithelial Glycoprotein 40 ; CA-125 : Cancer Antigen ou Carbohydrate Antigen 125 ; NCA-90 : CD66c. <sup>⊖</sup>: retiré du marché.



**Figure 27. Différents types de fragments en cours de phase clinique ou préclinique.** Les fragments sont repartis en trois catégories : les Fab, les scFv et les fragments de troisième génération (3G). PC : préclinique ; 1, 2, 3 : phase clinique 1, 2 ou 3 ; App : approuvé. D'après [264].

#### 2.4.4. Optimisation de l'immunogénicité

L'immunogénicité des anticorps thérapeutiques n'est pas toujours facile à prévoir. En effet, elle dépend à la fois de facteurs liés au produit (séquence primaire, glycosylations, agrégation, impuretés) mais aussi de facteurs inhérents aux patients et/ou à la pathologie (polymorphisme du CMH, âge des patients, maladies auto-immunes, associations médicamenteuses, mode et fréquence d'administration) [265]. De plus, certains anticorps humains, initialement développés pour limiter l'immunogénicité chez l'homme, induisent toujours un taux élevé de réponses immunitaires (tableau 4) [96, 265]. Par conséquent, différentes méthodes ont été imaginées afin de prévoir et de réduire le risque d'immunogénicité

La majorité des anticorps humains sur le marché sont produits grâce aux souris transgéniques et ont donc l'avantage d'avoir de hautes affinités grâce au processus d'hypermutation somatique réalisé *in vivo*. Néanmoins, ce processus de maturation d'affinité implique l'introduction de mutations au niveau des régions variables des chaînes lourdes et légères, mutations parfois non nécessaires pour l'affinité et pouvant être immunogènes même sur des anticorps totalement humains [266]. La technique de super-humanisation ou germinalisation (germline humanization) consiste à éliminer les mutations introduites dans les régions charpentes (FR) pour rapprocher la séquence des fragments variables de l'anticorps de celle présente dans la lignée cellulaire germinale, avant le processus d'hypermutation somatique (ce qui correspond au stade lymphocyte B mature IgM<sup>+</sup>, voir paragraphe 1.5 sur la maturation des L<sub>B</sub> – page 7) [267]. Ces corrections, réalisées par mutagenèse dirigée, permettent une meilleure tolérance des anticorps thérapeutiques chez l'homme. Les mutations effectuées sur les régions FR1 et 4 sont généralement sans conséquence ; par contre, celles introduites au niveau des régions FR2 et FR3 peuvent avoir un impact négatif sur l'interaction antigène / anticorps et nécessitent des étapes de modélisation moléculaire *in silico* et de vérification de l'activité de l'anticorps *in vitro* ou *in vivo* [268]. La technique de super-humanisation a été utilisée avec succès pour améliorer l'humanisation d'anticorps de souris et réduire le potentiel immunogénique des régions charpentes murines résiduelles [267]. Des mutations ont même été introduites au niveau des CDRs pour leur donner un profil humain. Plus récemment, cette approche a été mise en oeuvre pour « humaniser » ou plutôt « germinaliser » un anticorps anti-*Bacillus Anthraxis* produit chez le singe, qui présente donc déjà des séquences très similaires à celles des immunoglobulines humaines [268]. Grâce à cette importante homologie de séquence, les gènes germinaux humains les plus proches ont

été facilement identifiés (grâce à la base de donnée IMGT), et les 22 différences identifiées sur les 178 résidus composant les huit régions FR ont été réduites à 4 sans altérer les capacités de neutralisation de l'anticorps. Par ailleurs, l'utilisation de singes dans le but de produire des anticorps monoclonaux peu immunogènes a également été mise en oeuvre par la société Biogen-Idec. Cette compagnie possède un anticorps chimérique primate/humain (ou « primatisé »), le galiximab, actuellement en phase III pour le traitement des lymphomes.

D'autres techniques ont également été mises en place afin de prévoir et, si possible, d'éliminer les séquences immunogènes des anticorps thérapeutiques. Ces méthodes incluent l'analyse *in silico* d'épitopes immunogènes putatifs grâce à la modélisation moléculaire ou l'utilisation de tests *in vitro* d'activation de lymphocytes T [265, 269]. Les séquences identifiées comme immunogènes sont ensuite remplacées ou modifiées par mutagenèse dirigée.

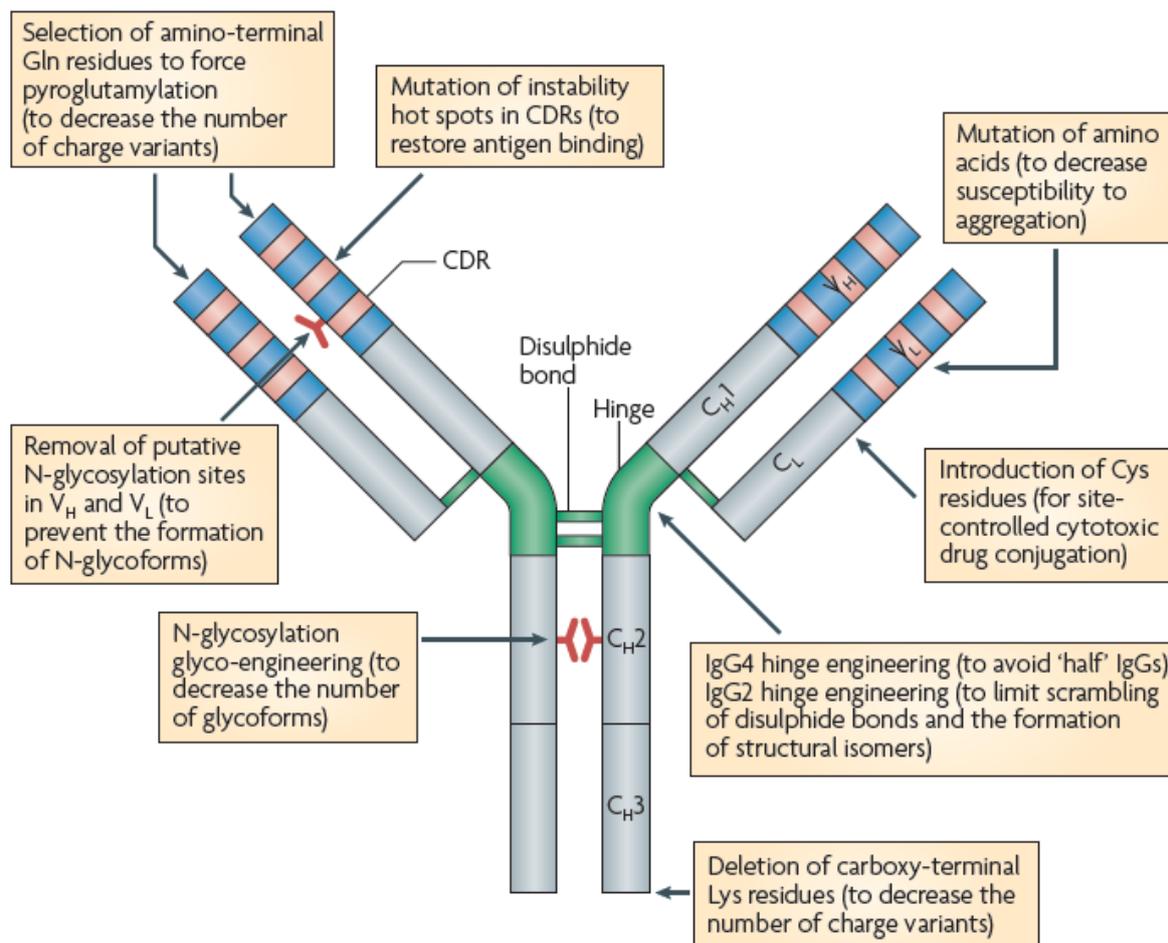
Nom de marque / DCI	Format	Cible	Immunogénicité (%)
<b>ANTICORPS MURINS</b>			
Bexxar / Tositumomab	IgG murine (IC)	CD20	9
Zevalin / Ibritumomab-tiuxétan	IgG murine (IC)	CD20	3
OKT3 / muromonab	IgG murine	CD3	54
<b>ANTICORPS CHIMERIQUES</b>			
Rituxan / rituximab	IgG chimérique	CD20	0-65
Erbitux / cétuximab	“	EGFR	5
Réopro / abciximab	“	GPIIb / IIa	4-21
Simulect / basiliximab	“	IL2R	< 2
Rémicade / infliximab	“	TNF- $\alpha$	6-61
<b>ANTICORPS HUMANISES</b>			
Tysabri / natalizumab	IgG humanisé	Intégrine $\alpha$ 4	7
Zénapax / daclizumab	“	IL2R	8-34
Synagis / palivizumab	“	RSV	< 2
Avastin / bévacizumab	“	VEGF	< 2
Soliris / eculizumab	“	C5	< 2
Raptiva / éfalizumab	“	CD11a	2-6
Mylotarg / Gentuzumab ozogamicin	IgG humanisé (IC)	CD33	< 2
Campath / alemtuzumab	“	CD52	10-75
Herceptin / trastuzumab	“	HER2	< 2
Xolair / omalizumab	“	IgE	< 2
<b>ANTICORPS HUMAINS</b>			
Humira / adalimumab	IgG humaine	TNF- $\alpha$	1-87

**Tableau 4. Immunogénicité de quelques anticorps thérapeutiques sur le marché.** Les chiffres présentés dans la colonne de droite représentent le pourcentage de patients ayant développé une réaction immunitaire suite à l'administration de l'anticorps. Ce pourcentage est variable en fonction des études. D'après [265] (le tableau n'est pas complet).

### 2.4.5. Optimisation des propriétés biophysiques

Les anticorps thérapeutiques sont des produits biopharmaceutiques complexes. Le développement de techniques analytiques fines a permis une meilleure caractérisation de ces protéines et a mis en lumière la présence de multiples microvariants dont l'impact sur l'efficacité et la sécurité du produit est encore peu étudié [125]. Certains microvariants de charge ou de structure sont liés à une dégradation physique ou chimique des anticorps et peuvent avoir une influence importante sur la stabilité, la pharmacocinétique, l'immunogénicité et l'activité biologique du produit [270]. Des dégradations physico-chimiques classiquement retrouvées pour les anticorps incluent la dénaturation, l'agrégation, l'hydrolyse, la déamidation et l'oxydation [270, 271]. L'agrégation constitue une des voies majeures de dégradation des anticorps. Elle est associée à une perte de fonctionnalité mais également au déclenchement de réactions immunitaires. Des zones potentiellement propices à l'agrégation peuvent être identifiées au niveau des régions variables. Par ailleurs, la déamidation est également un phénomène bien caractérisé qui touche les résidus glutamines et asparagines. Ces acides aminés sont transformés en glutamate et aspartate générant ainsi des modifications de charges qui peuvent altérer la conformation et la pharmacocinétique de l'anticorps. Certains motifs particulièrement sensibles à la déamidation ont été identifiés. Afin de limiter l'apparition de tels phénomènes, il est possible d'intervenir à deux niveaux. Soit directement au stade de la production en modifiant, par ingénierie génétique, les séquences responsables de l'agrégation ou de la formation de variants de charge [125] (Figure 28). Soit au niveau du développement galénique en sélectionnant les bons excipients/ stabilisants, les bonnes conditions de stockage et de conditionnement pour garantir la stabilité et l'homogénéité du produit au cours de son utilisation [270]. Enfin, des mutations peuvent être introduites dans la séquence des anticorps afin d'optimiser leur solubilité, leur biosynthèse ou bien d'éliminer des variants structuraux dus à une instabilité des ponts disulfures au niveau des régions charnières (surtout pour les IgG2 ou IgG4) ou à l'ajout de glycosylations. Un exemple concret illustrant ces propos est l'abatcept, une immunoadhésine comportant cinq mutations dont certaines permettent d'améliorer la production ou d'empêcher la formation de ponts disulfures inter-chaînes [272].

Pour conclure, l'optimisation des propriétés physicochimiques des anticorps via l'ingénierie génétique et/ou le développement galénique devrait permettre de faciliter les étapes de production, de purification et de caractérisation et ainsi de diminuer le coût des traitements à base d'anticorps.



**Figure 28. Modifications permettant d'améliorer l'homogénéité et les propriétés biophysiques des anticorps.** Grâce à des techniques d'analyse hautement résolutive, des microvariants d'anticorps, associés à des différences de charges, de motifs glucidiques ou de structure, ont été identifiés. La compréhension de l'influence de ces microvariants sur la stabilité, la pharmacocinétique et l'activité biologique des anticorps permet de guider la production d'anticorps optimisés, plus homogènes, plus stables et donc plus efficaces. D'après [125].

#### 2.4.6. Les immunoconjugués

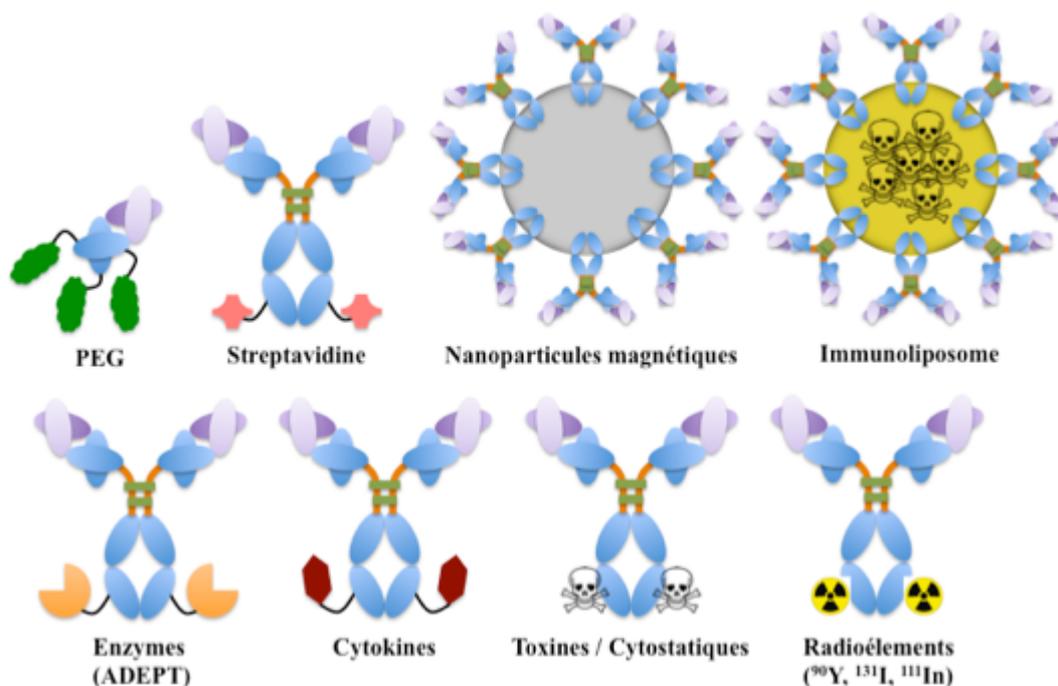
Comme nous l'avons vu plus haut, les fonctions effectrices des anticorps associées au Fc, très importantes pour l'efficacité des anticorps antitumoraux, sont difficiles à activer efficacement *in vivo*. Deux grandes approches ont donc été développées afin d'améliorer les fonctions effectrices des anticorps : (1) l'ingénierie et la glyco-ingénierie du Fc afin d'optimiser les fonctions effectrices d'ADCC, d'ADCP ou de CDC, et (2) la conjugaison des anticorps avec des molécules ou particules effectrices afin de combiner les propriétés de ciblage des anticorps avec de nouvelles fonctions effectrices plus puissantes [273, 274]. En accord avec cette dernière approche, des anticorps ou fragments d'anticorps ont été conjugués à de multiples molécules effectrices comme des radionucléides, des agents toxiques (drogues anticancéreuses ou toxines), des enzymes, des superantigènes, des cytokines, mais aussi à des

particules incluant des liposomes ou des nanoparticules métalliques (Figure 29) [275-281]. A l'heure actuelle, seuls des anticorps couplés à des radioéléments (RIC pour radio-immunoconjugués) ou à des drogues (ADC pour *Antibody Drug Conjugate*) ont atteint le marché. Jusqu'à aujourd'hui seulement 4 RIC et 2 ADC ont été approuvés, tous pour le traitement des cancers (voir tableau 1). Ce faible taux d'approbation est principalement dû au manque d'efficacité (ADC) et/ou aux effets secondaires importants induits par ces composés. Par exemple, l'utilisation des RIC (Zevalin<sup>TM</sup> et Bexxar<sup>TM</sup>) dans le traitement des lymphomes est très efficace, mais les doses employées nécessitent parfois des greffes de moelle osseuse chez les patients [282]. De plus, les radioéléments classiquement utilisés comme l'Iode 131 ou l'Yttrium 90 (des émetteurs  $\beta$  qui ont un rayonnement assez pénétrant de plusieurs mm) ne sont pas forcément optimaux pour irradier efficacement des cellules tumorales. Ainsi, de nouveaux radioéléments émettant des rayonnements  $\alpha$  de forte énergie sur une distance faible (inférieure au mm), comme le Bismuth 213 ou l'Astate 211, ont été employés avec succès pour le traitement de tumeurs solides ou hématologiques [283]. Par ailleurs, une approche consistant à réaliser un préciblage de la tumeur avec un anticorps non radiomarqué mais couplé avec de l'avidine, puis à injecter plus tard (après élimination de l'excès d'anticorps) un radioélément biotinylé, a nettement amélioré le ciblage tumoral, diminué les effets secondaires et permis d'augmenter la survie globale de patients atteints de cancers thyroïdiens [284]. Ces avancées devraient permettre aux RIC de trouver un nouvel essor en oncologie.

Concernant les ADC, leur faible nombre sur le marché s'explique par le manque d'efficacité de la première génération de ces molécules, qui possédaient des drogues conjuguées instables, pas assez toxiques et des agents de liaison (ou linker) non optimisés. Depuis une dizaine d'années, l'utilisation de drogues 100 à 1000 fois plus toxiques, l'amélioration des techniques de couplage et l'optimisation des caractéristiques physicochimiques des linkers, ont permis de produire une seconde génération d'ADC beaucoup plus stables et efficaces [276, 285]. Une de ces molécules, le brintuximab vedotin, a été acceptée par la FDA cet été pour le traitement des lymphomes. Grâce à ces progrès, de nombreux autres ADC sont en phase clinique (2 en phase III) et devraient prochainement atteindre la commercialisation. Les résultats précliniques et cliniques impressionnants de ces nouveaux ADC devraient permettre de traiter efficacement des tumeurs hématologiques ou solides actuellement réfractaires aux thérapies à base d'anticorps. Outre le couplage à des agents chimiques cytotoxiques, des anticorps ont également été associés à des toxines d'origine animale ou végétale. Ces immunotoxines (ImTox) incluent classiquement le

couplage d'anticorps ou de fragments d'anticorps avec la toxine diphtérique (DT), l'exotoxine A de *Pseudomonas* (PE) ou la chaîne A de la ricine [277]. Les ImTox incluent également le couplage entre une interleukine et une toxine. D'ailleurs, la seule ImTox actuellement sur le marché est une protéine de fusion entre l'IL-2 et la DT, appelée Dénileukin diftitox (Ontak<sup>TM</sup>), utilisée pour le traitement des lymphomes. Plusieurs ImTox impliquant des anticorps ou des fragments d'anticorps sont en développement préclinique ou clinique pour la thérapie des cancers ; elles mettent surtout en jeu des fragments de type scFv ou Fv couplés avec des toxines dérivées de la PE ou de la ricine.

D'autres stratégies visant à délivrer des composés cytotoxiques par le biais des anticorps ont été envisagées. C'est le cas des immunoliposomes ou des immunoparticules chargées avec des agents cytotoxiques, et des anticorps couplés à des enzymes. Par exemple, des fragments d'anticorps fusionnés à la surface de liposome PEGylés ont permis d'améliorer nettement le ciblage tumoral et le relargage localisé de composés cytotoxiques [280]. De même, des scFv ou des nanobodies associés à des enzymes (carboxypeptidase,  $\beta$ -lactamase) [286, 287] ont été utilisés pour catalyser la transformation d'une pro-drogue en un composé cytotoxique au voisinage de cellules tumorales. Cette approche séquentielle, qui consiste à réaliser un préciblage de la tumeur avec l'anticorps conjugué puis à injecter une pro-drogue, est nommée ADEPT pour *Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy*.



**Figure 29. Les différents types d'immunoconjugés.** Les anticorps ou fragments d'anticorps peuvent être conjugués à différentes molécules ou particules afin d'acquérir de nouvelles fonctions effectrices. La conjugaison à des toxines, des agents anticancéreux ou des radionucléides permet de rediriger ces molécules très toxiques spécifiquement vers les antigènes cibles. Les anticorps conjugués aux cytokines ont pour but d'activer localement le système immunitaire afin de détruire les tumeurs.

Certains immunoconjugués ont pour but d'activer le système immunitaire afin de détruire les cellules tumorales. C'est le cas des immunocytokines ou des anticorps conjugués à des superantigènes. L'utilisation de cytokines (IL-2, IL-12, GM-CSF), en combinaison avec un traitement à base d'anticorps, s'est révélée efficace pour améliorer le traitement de certains cancers. Néanmoins, l'injection systémique de cytokines provoque des effets secondaires importants. Par conséquent, des anticorps couplés à des cytokines ont été générés et ont montré des effets antitumoraux significatifs et une réduction des effets secondaires [279]. Certaines des ces immunocytokines, comme le L19-IL-2 ou le HuBC1-IL-12, sont en cours d'essai clinique pour le traitement des mélanomes métastatiques ou des cancers rénaux [273]. Par ailleurs, une autre approche favorisant l'activation locale d'une réponse immunitaire consiste à fusionner un anticorps avec un superantigène T ou B, comme l'entérotoxine A de *Staphylococcus aureus* (SEA) ou la protéine L de *Peptostreptococcus magnus* (PpL). Un fragment Fab conjugué à la SEA et ciblant l'antigène tumoral 5T4, le naptumomab estafenatox, a montré des résultats prometteurs dans des cas de NSCLC et de cancers du rein [288]. Cette molécule est actuellement en cours de phase III.

Enfin, l'essor parallèle des nanotechnologies et de l'ingénierie moléculaire des anticorps a permis l'émergence de nanoparticules fonctionnalisées avec des anticorps ou des fragments d'anticorps. Ces nanoparticules peuvent renfermer des molécules actives (comme les immunoliposomes cités plus haut) ou simplement se composer d'atomes métalliques. Grâce aux anticorps greffés à leur surface, les nanoparticules peuvent être injectées et redirigées efficacement vers les tissus cibles, en particulier les tumeurs. Une fois localisées au sein des tumeurs, les nanoparticules métalliques peuvent servir à réaliser de l'imagerie (e.g. l'IRM, une technique qui peut permettre de détecter précocement les cancers) mais aussi de la thérapie hyperthermique (par oscillation magnétique ou rayonnement infra rouge) [289, 290].

La diversité des immunoconjugués est importante et va certainement encore s'élargir dans les années à venir. Les progrès réalisés dans les techniques de couplage et l'ingénierie des « linkers » permettent aujourd'hui d'élaborer des immunoconjugués plus stables, plus efficaces et avec moins d'effets indésirables. De plus, la combinaison des nouveaux mécanismes d'action apportés par les conjugués avec le ciblage précis des anticorps améliore, dans la majorité des cas, l'efficacité clinique par rapport à celle d'un anticorps « nu ». Ainsi, les immunoconjugués devraient continuer à se développer et leur utilisation pour le traitement des cancers devrait se révéler très utile.

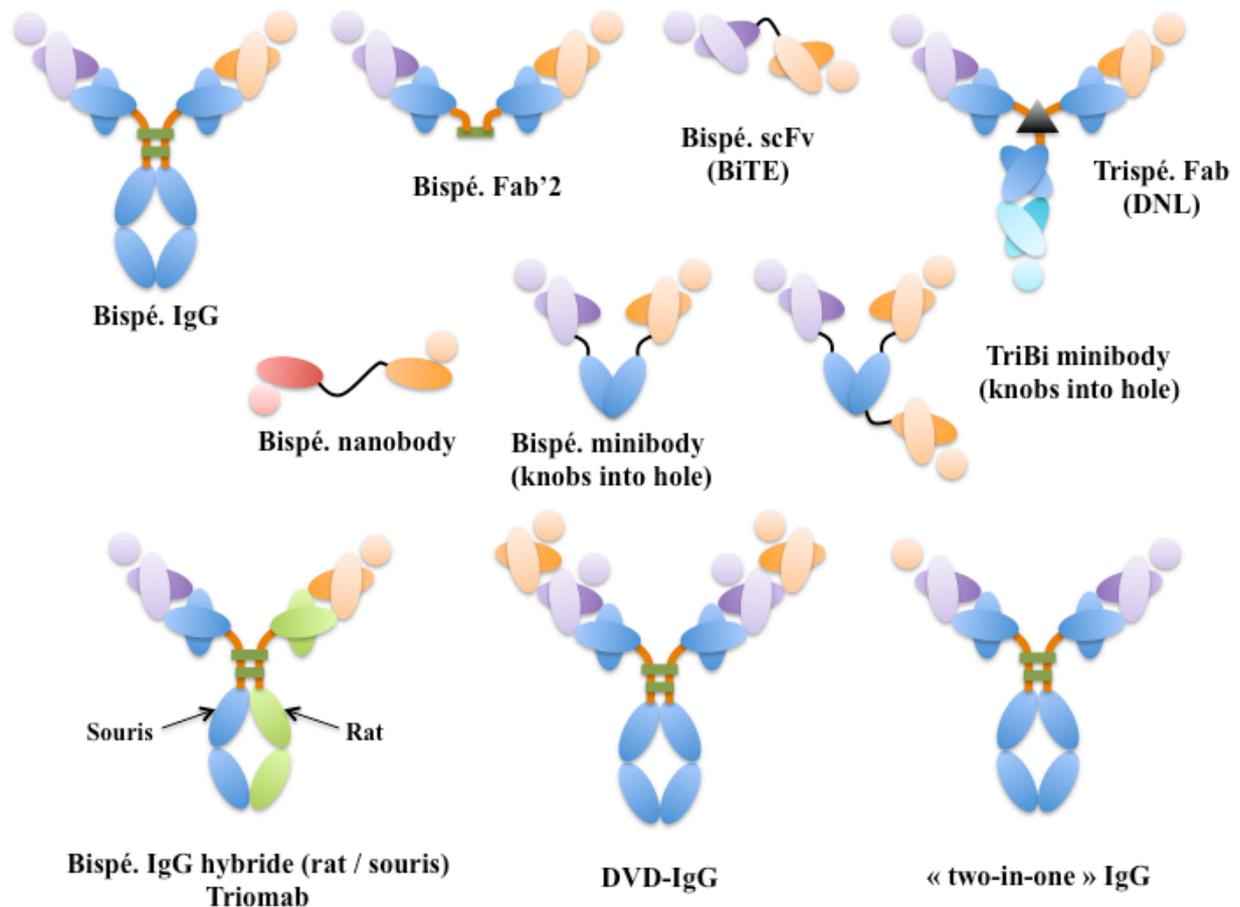
#### 2.4.7. Les anticorps bispécifiques et multispécifiques

Comme leur nom l'indique, les anticorps bispécifiques possèdent deux paratopes différents sur une même molécule d'anticorps et ainsi une double spécificité. Ces anticorps peuvent être conçus dans le but de fixer deux épitopes différents sur un même antigène ou dans l'objectif de lier deux antigènes distincts, ouvrant ainsi le champ à de nombreuses applications et nouvelles fonctions comme le recrutement localisé d'effecteurs cellulaires ou moléculaires (toxines, radionucléides, drogues cytotoxiques). La production des anticorps bispécifiques est complexe et a longtemps constitué un obstacle majeur à leur développement clinique, notamment à cause de l'appariement aléatoire des chaînes lourdes et légères pouvant aboutir à la formation d'une forte proportion d'anticorps mal assemblés et donc inactifs. Cependant, grâce aux avancées de l'ingénierie moléculaire, la production de ces anticorps en quantité et qualité suffisantes est désormais possible (voir les revues [291, 292]).

Actuellement, les résultats cliniques les plus impressionnants ont été obtenus dans le domaine de l'oncologie avec des anticorps bispécifiques capables de rediriger et d'activer des lymphocytes T cytotoxiques pour détruire les cellules tumorales (un mécanisme non réalisable avec le Fc des anticorps) [293]. Plusieurs formats d'anticorps bispécifiques, ciblant d'une part un antigène tumoral, et d'autre part le récepteur CD3 des lymphocytes T, ont été évalués cliniquement dans le traitement de tumeurs solides et hématologiques. Le format le plus prometteur est un scFv bispécifique (ou scFv tandem) aussi appelé « BiTE » pour *Bispecific T-cell Engager* (Figure 30) [294]. Le blinatumomab (MT103, Micromet/Medimmune), un BiTE ciblant spécifiquement les récepteurs CD3 et CD19, a permis d'obtenir de forts taux de réponses thérapeutiques, partielles ou complètes, chez des patients atteints de LNH [295]. De plus, les doses thérapeutiques nécessaires pour obtenir des effets cliniques sont 10 000 fois inférieures ( $0,15\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{jour}$ ) à celles utilisées avec des anticorps classiques [295]. Cependant, à cause de leur petite taille, les BiTE sont administrés en continu grâce à une mini-pompe portative, ce qui peut être contraignant pour les patients mais également avantageux pour ajuster précisément les doses. D'autres BiTE, comme le MT110 (anti EpCAM /CD3) ou le MT111 (anti CEA/CD3) sont en cours d'étude et montrent des résultats précliniques très prometteurs pour la thérapie de tumeurs solides ovariennes et colorectales [296, 297]. La propriété la plus impressionnante de ces BiTE est leur capacité à activer fortement les lymphocytes T cytotoxiques en l'absence de facteurs de co-stimulation (e.g. l'interaction CD28/B7) et à des concentrations très faibles. Ce mécanisme d'action cytotoxique extrêmement puissant n'est pas totalement élucidé, mais il semblerait que grâce à

leur petite taille, les BiTE soient capables de reconstituer des synapses cytolytiques entre les cellules cibles et les lymphocytes T [298].

Les BiTE sont des formats très prometteurs mais aucun n'a, pour le moment, atteint le marché. En revanche, les « triomabs » comptent une molécule sur le marché, le catumaxomab, et une autre en phase II/III (l'ertumaxomab). Les triomabs constituent l'un des succès les plus remarquables et les plus inattendus dans le domaine des anticorps bispécifiques. En effet, ces anticorps sont synthétisés par des cellules résultant de la fusion entre deux hybridomes (des quadromes) produisant des anticorps de spécificités et d'espèces différentes (une Ig2a de souris et une IgG2b de rat). Grâce à cette différence d'espèce, l'appariement des chaînes lourdes et légères dans le quadrome se réalise préférentiellement entre chaînes de même espèce, ce qui permet d'obtenir un taux important d'anticorps bispécifiques fonctionnels (voir Figure 30). De plus, le Fc hybride rat/souris permet une élution spécifique du format voulu par gradient de pH, après fixation sur colonne de protéine A [299]. Enfin, le Fc hybride présente également l'avantage de lier efficacement les récepteurs Fc activateurs humains sans interagir avec le récepteur inhibiteur FcγRIIb. Ainsi, grâce à cette technologie, des anticorps bispécifiques ont été produits dans le but de rediriger des lymphocytes T vers des cellules tumorales surexprimant EpCAM (le catumaxomab) ou HER2 (l'ertumaxomab). Ces anticorps sont appelés triomabs car ils sont trifonctionnels. Ils peuvent cibler efficacement les cellules tumorales, induire leur destruction en activant les L<sub>T</sub> et également recruter des cellules de l'immunité innée (macrophages, cellules NK, cellules dendritiques) [300] via le Fc dans le but de potentialiser l'action des L<sub>T</sub> mais aussi de détruire les cellules cibles par d'autres mécanismes tels que l'ADCC ou l'ADCP, ce dernier pouvant aboutir au déclenchement d'une immunité antitumorale chez l'hôte [301]. Des essais cliniques avec le catumaxomab et l'ertumaxomab ont donné des résultats très satisfaisants chez des patients atteints de cancers très avancés comportant des ascites malignes. En particulier, une étude de phase III sur 258 patients a montré que des doses de 200 µg de catumaxomab augmentent la survie des patients sans ponction d'ascite d'un facteur 4 par rapport aux patients non traités [302]. De plus, les effets secondaires observés sont modérés et transitoires. Au vu du bénéfice apporté, l'EMA a autorisé la commercialisation du catumaxomab pour le traitement des ascites malignes associées à des cancers exprimant EpCAM en Avril 2009. L'ertumaxomab est, quant à lui, toujours en cours d'étude clinique, tout comme le Bi20, un triomab anti-CD20/anti-CD3 qui se destine à la thérapie de cancers hématologiques.



**Figure 30. Différents formats d'anticorps bispécifiques ou trispécifiques.** A leurs débuts, les anticorps bispécifiques étaient difficiles à produire notamment à cause du réappariement aléatoire des chaînes lourdes et légères. Avec le développement de la biologie moléculaire et l'ingénierie des fragments d'anticorps, les anticorps bispécifiques sont maintenant produits efficacement sous forme de protéines de fusion à partir de briques élémentaires comme les scFv ou les Fab. L'utilisation de domaines d'oligomérisation d'autres protéines a permis de faciliter l'association des différentes briques élémentaires pour former des anticorps multimériques et multispécifiques. La méthode DNL met en jeu les domaines d'oligomérisation de la PKA et l'approche « knobs into holes » se base sur l'ingénierie des chaînes CH3 pour orienter la formation d'un dimère.

Par ailleurs, le recrutement et l'activation de lymphocytes T cytotoxiques ont également été réalisés avec un scFv tandem ciblant le CD28 d'une part et un protéoglycane associé aux mélanomes (NG2) d'autre part [303]. Ce scFv bispécifique est actuellement en phase I/II et son développement sera très certainement très surveillé à cause des événements dramatiques survenus avec l'utilisation du TGN1412, un autre superagoniste du récepteur CD28.

Outre le recrutement de lymphocytes T, certaines approches consistent à produire des anticorps bispécifiques capables de mobiliser les cellules NK. Les cellules NK ne représentent que 10% des lymphocytes et leur capacité à infiltrer les tumeurs est plus faible que celle des  $L_T$  [304]. Cependant, ces cellules ne nécessitent pas de co-stimulation pour être activées entièrement et médier leur action cytotoxique. Une simple activation par l'intermédiaire du

récepteur FcγRIIIa (CD16) est suffisante pour déclencher le processus d'ADCC. Ainsi, des anticorps bispécifiques possédant un bras agoniste du récepteur FcγRIIIa et un autre bras liant un antigène tumoral, pourraient être des agents thérapeutiques efficaces pour traiter les cancers. Des résultats cliniques intéressants ont été obtenus en 1997 avec un anticorps bispécifique murin anti CD16 /anti-CD30. Cependant, les effets secondaires dus à la production d'anticorps « HAMA » n'ont pas permis de poursuivre les essais [305]. L'intérêt thérapeutique du recrutement des cellules NK par des anticorps bispécifiques reste donc à démontrer.

La pathogenèse de nombreuses maladies implique souvent de multiples médiateurs qui présentent des fonctions redondantes et/ou synergiques. Ainsi, des stratégies visant à combiner plusieurs agents thérapeutiques, ciblant les mêmes voies pathologiques ou des voies complémentaires, peuvent potentiellement améliorer l'efficacité thérapeutique des traitements et diminuer les risques de résistance. Les anticorps humanisés ou humains, en raison de leur bonne tolérance chez l'homme, sont des molécules particulièrement bien adaptées pour les multithérapies. Cependant, les coûts importants des traitements à base d'anticorps limitent grandement cette approche. Un moyen de pallier ce problème consiste à utiliser des anticorps bispécifiques afin de bloquer simultanément plusieurs voies pathologiques avec une seule molécule [292]. Ce blocage simultané de plusieurs antigènes a été exploré en oncologie avec le développement de diabodies bispécifiques ciblant 2 sous-types de récepteurs du VEGF ou ciblant l'EGFR et l'IGF-1R [306, 307]. Plus récemment, un variant du trastuzumab, un anticorps reconnaissant HER2, a été sélectionné par phage display sur la base de sa capacité à lier à la fois HER2 et le VEGF. Après maturation d'affinité, cet anticorps « deux en un » a montré une bonne efficacité *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de tumeurs [308]. Par ailleurs, cette approche de blocage combiné a également été testée dans le cas des maladies inflammatoires, dans lesquelles plusieurs cytokines peuvent jouer des rôles redondants ou complémentaires dans la pathologie. Ainsi, un nouveau format d'anticorps bispécifique et tétravalent, appelé DVD-IgG pour *Dual Variable Domain IgG*, a été généré dans le but de neutraliser efficacement des paires de cytokines comme l'IL-1α et l'IL-1β ou l'IL-12 et l'IL-18 [309]. Ce format particulier, qui comprend deux domaines variables différents sur chaque bras de l'anticorps (voir figure 30), présente des caractéristiques proches de celles d'une IgG classique et semble largement applicable à différents types d'antigènes solubles. D'autres formats bispécifiques, à base de scFv, ont démontré leur intérêt pharmacologique pour bloquer simultanément l'IL-17 et l'IL-23 dans des pathologies allergiques [310].

Enfin, grâce aux techniques de biologie moléculaire, de multiples formats d'anticorps bispécifiques ou multispécifiques ont pu être produits. Certaines techniques sont particulièrement élégantes et utilisent des domaines d'oligomérisation d'autres protéines pour former des anticorps multispécifiques ou multivalents à partir de scFv ou de Fab [255]. C'est le cas de la méthode DNL (Dock and Lock) qui utilise l'interaction entre les deux sous unités régulatrices de la PKA (Protéine Kinase A) et l'ancrage d'un troisième domaine issu d'une protéine de type AKAP (*A Kinase Anchor Protein*), pour former des trimères [311]. Cette technique peut donc être utilisée pour réaliser des anticorps trispécifiques ou trivalents. Pour le moment, elle a été essentiellement utilisée pour générer des (Fab)<sub>3</sub> bispécifiques trivalents qui ont montré un grand intérêt dans des approches de préciblage en radioimmunothérapie [312]. D'autres domaines d'oligomérisation issus de protéines comme p53, le TNF- $\alpha$ , la streptavidine ou le collagène ont permis d'assembler des anticorps tri ou tétramériques à partir de briques élémentaires comme les scFv [255].

Après des débuts difficiles dans les années 80, les anticorps bispécifiques ou multispécifiques sont aujourd'hui en plein essor. Les données cliniques obtenues en oncologie avec des anticorps comme les BiTE ou les triomabs sont impressionnantes, tant du point de vue de l'efficacité que des doses administrées (1000 à 10 000 inférieures à celles des anticorps classiques). L'approche consistant à rediriger et à activer les cellules effectrices au sein des tumeurs grâce à ce type d'anticorps laisse pour la première fois entrevoir des espoirs de guérison du cancer grâce aux anticorps. De plus, au vu de la multiplicité des formats et des stratégies thérapeutiques associées, des améliorations sont encore possibles et l'intérêt des anticorps bispécifiques dans d'autres domaines que l'oncologie va probablement émerger. Les anticorps multispécifiques relancent également l'intérêt de la multithérapie à base d'anticorps et même l'intérêt potentiel d'utiliser des anticorps polyclonaux ou oligoclonaux dirigés contre un même ou différents antigènes pathologiques. Ce concept est d'ailleurs mis à profit par la société Symphogen dont le but est de développer des cocktails d'anticorps monoclonaux recombinants, contre une même cible ou des cibles différentes, afin d'obtenir une efficacité optimale [313]. Le Symph001 ou rozrolimupab (un cocktail de 25 anticorps ciblant le RhD) et le Symph004 (une combinaison de deux anticorps anti EGFR) sont actuellement en phase II. Ces cocktails d'anticorps sont produits dans le même bioréacteur et co-purifiés ce qui permet de conserver des coûts de production similaires à ceux des anticorps monoclonaux.

## 2.5. Les anticorps anti-RCPGs

Les RCPGs constituent une des familles protéiques les plus importantes pour l'industrie pharmaceutique. On estime qu'environ 30% des médicaments actuellement sur le marché ont pour cibles des RCPGs [314]. Cette famille comprend environ 900 membres et plus du tiers (environ 370) représentent des cibles thérapeutiques potentielles [315, 316]. Parmi ces 370 candidats, seulement une cinquantaine est efficacement ciblée par des agents chimiques ou des analogues des ligands naturels, et ce malgré une recrudescence des publications scientifiques mettant en lumière le rôle de ces récepteurs dans diverses pathologies. En fait, depuis une dizaine d'années, la découverte de molécules actives contre de nouveaux RCPGs stagne et certaines sous-familles de RCPGs semblent totalement réfractaires aux méthodes classiques utilisées pour la découverte de nouveaux médicaments [317]. En effet, certains RCPGs sont les récepteurs de ligands protéiques complexes dont les pharmacophores ne sont pas définis, ce qui empêche l'application des stratégies basées sur le criblage *in silico* ou sur la chimie combinatoire, deux approches très utilisées par l'industrie pharmaceutique pour trouver de nouveaux composés actifs. Par conséquent, de nouvelles approches comme le ciblage des RCPGs avec des anticorps monoclonaux sont en train d'émerger [318]. A la différence des petites molécules chimiques, les anticorps monoclonaux présentent l'avantage de cibler de nouveaux épitopes, éloignés des sites orthostériques et inaccessibles aux analogues chimiques des ligands naturels, ce qui permet d'envisager de nouvelles propriétés pharmacologiques incluant la modulation allostérique des fonctions du récepteur. Les anticorps offrent également la possibilité de cibler des épitopes conformationnels étendus, ce qui les rend plus à même d'interférer efficacement avec la liaison de ligands protéiques complexes et leur confère une grande spécificité même s'il existe plusieurs sous-types du RCPG ciblé [318]. Enfin, les anticorps pourraient aussi être mis à profit pour cibler sélectivement des RCPGs homo ou hétérodimériques [319]. L'oligomérisation des RCPGs est un axe de recherche émergeant dans lequel les anticorps seraient des outils très précieux pour mieux comprendre la pharmacologie et l'intérêt thérapeutique de ces oligomères qui jouent probablement un rôle dans diverses pathologies [320]. Ainsi, les anticorps semblent être des molécules de choix pour développer de nouveaux agents thérapeutiques originaux contre les RCPGs. Cependant, la production d'anticorps contre de tels récepteurs reste, à l'heure actuelle, un véritable défi technique. En effet, à cause de leurs 7 passages transmembranaires, les RCPGs sont des molécules très difficiles à manipuler *in vitro*. Une fois sortis de leur contexte membranaire, ces récepteurs sont instables,

majoritairement non fonctionnels et leur production en quantité et qualité suffisantes pour réaliser des immunisations est souvent laborieuse [321]. De plus, les approches alternatives consistant à immuniser avec des fragments de séquences extracellulaires recombinantes, plus faciles à produire que le récepteur complet, se révèlent souvent infructueuses car les anticorps générés sont, la plupart du temps, incapables de reconnaître le récepteur dans son environnement physiologique à la surface cellulaire [322]. De même, l'immunisation avec des RCPGs entiers, stabilisés et renaturés grâce à des détergents, est envisageable mais les probabilités de succès sont faibles et les conditions expérimentales mises au point pour un récepteur sont rarement généralisables à d'autres RCPGs. Par conséquent, d'autres stratégies d'immunisation ont été envisagées afin de favoriser l'obtention d'anticorps reconnaissant la conformation native des RCPGs. Parmi les plus prometteuses, on trouve l'immunisation génique. Cette technique consiste à immuniser les animaux avec l'ADNc codant l'antigène (contenu dans un plasmide), qui est ainsi directement produit *in vivo*, dans un contexte physiologique. Différentes voies d'administration sont possibles : (i) par voie cutanée, en propulsant des particules métalliques complexées à l'ADN grâce à un « pistolet à gène » ou « gene gun », (ii) par injection intramusculaire, couplée ou non à des agents chimiques ou à l'électroporation pour augmenter la transfection *in vivo*, (iii) par injection intraveineuse, en réalisant un choc hémodynamique entraînant une transfection massive au niveau hépatique (technique d'hydroporation) [323]. Appliquée aux RCPGs, l'immunisation génique permet d'éviter les étapes complexes, sans garantie, et chronophages, relatives à la production et à la renaturation *in vitro* des RCPGs. De plus, elle favorise la présentation d'un récepteur fonctionnel au système immunitaire de l'hôte, ce qui augmente les probabilités d'obtenir des anticorps reconnaissant la conformation native des RCPGs et possédant des activités pharmacologiques [324-326]. Par ailleurs, cette technique présente également l'avantage d'être simple et potentiellement généralisable à n'importe quel RCPG, sous réserve d'une expression *in vivo* suffisante pour induire une réponse immune.

Toutes ces difficultés techniques, liées à la nature transmembranaire des RCPGs et à l'importance de leur conformation tridimensionnelle dans leur fonctionnalité, ont pour le moment limité le développement des anticorps monoclonaux anti-RCPGs. Ceci est d'ailleurs corroboré par le fait qu'il n'existe aucun anticorps anti-RCPGs, ni parmi les 39 anticorps monoclonaux thérapeutiques (et dérivés) sur le marché, ni dans la quarantaine d'anticorps actuellement en phase III. Malgré cela, la modulation pharmacologique de ces récepteurs devient une option de plus en plus attractive dans divers domaines et particulièrement en

oncologie. En effet, depuis une dizaine d'années, les preuves décrivant l'implication des RCPGs dans les phénomènes tumoraux s'accumulent [327-329]. Les RCPGs semblent notamment importants pour les interactions hôte/tumeur et sont impliqués dans les processus de dissémination métastatique, d'angiogenèse, d'inflammation et d'immunoévasion [327-329]. Ils sont également souvent impliqués dans la progression des tumeurs neuroendocrines, qui sécrètent fréquemment des neuropeptides mitogéniques dont les récepteurs sont des RCPGs. Parmi les RCPGs les plus pertinents pour l'oncologie, souvent cités dans la littérature et dont certains inhibiteurs sont en phase clinique avancée, on trouve les deux sous-types de récepteurs des endothélines ETAR et ETBR, et les récepteurs de chimiokines comme CXCR4 ou CXCR2 [327] (voir tableau 5). Dans le cas de CXCR4 et d'ETBR, des anticorps monoclonaux à activité antitumorale ont été décrits récemment [330, 331].

Au vu de ce dernier paragraphe et de toutes les observations mentionnées plus haut, l'approche développée dans cette thèse, qui consiste à générer des anticorps anti-ETBR pour le traitement des cancers via la méthode d'immunisation génique, semble tout à fait pertinente.

Dans la dernière partie introductive qui suit, une synthèse des connaissances sur les endothélines et leurs récepteurs et plus particulièrement sur leur implication dans les processus tumoraux est présentée. Ces données permettront d'apprécier plus en détail la validité de ce modèle en tant que cible thérapeutique pour le traitement des cancers.

RCPGs	Agents Chimiques		Anticorps monoclonaux	
	Phase clinique	Exemples	Phase clinique	Exemples
<b>ETAR</b>	II / III	Zibotentan, Atrasentan	–	–
<b>ETBR</b>	II	Bosentan	préclinique	5E9 (Genentech)
<b>CXCR4</b>	I / II	BKT140, AMD 3100,...	I	ALX0651, AT009, MDX1338
<b>CXCR2</b>	II	AZD5122, SB265610	–	–
<b>Smoothed</b>	I / II	IPI-926, BMS-833923,...	–	–
<b>GnRHR</b>	I / II Approuvé	Abarelix, teverelix, ... Leuprolide, Goserelin	–	–
<b>CCK2</b>	II	Z-360	–	–
<b>LGR5</b>	–	–	préclinique	KM4056
<b>SSTR</b>	Approuvé	Octéotride	–	–

**Tableau 5. RCPGs ciblés par des anticorps monoclonaux ou des agents chimiques en phase clinique pour le traitement des cancers.** GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone ; SSTR : récepteurs de la somatostatine  
Sources : [318, 328]

### **3. L'axe endothéline et son implication dans la physiopathologie cardiovasculaire et les cancers**

Dans les années 80, plusieurs équipes de recherche ont démontré que les cellules endothéliales pouvaient sécréter des substances capables de moduler le tonus vasculaire [332-334]. Après l'identification, en 1987, du monoxyde d'azote (NO) et de son pouvoir vasodilatateur [335, 336], une substance vasoconstrictrice peptidique de 21 acides aminés nommée endothéline-1 (ET-1) est finalement isolée et séquencée par Yanagisawa et ses collègues en 1988 [337]. Peu de temps après, deux autres gènes codant pour des peptides très similaires à l'ET-1 sont identifiés [338]. Cet ensemble de trois peptides constitue « les endothélines » et les trois isoformes sont appelées : ET-1, ET-2 et ET-3. En 1990, deux sous-types de récepteurs responsables des effets physiologiques des endothélines sont clonés [339, 340]. Ces récepteurs appartiennent à la super famille des RCPGs et sont nommés : ETAR et ETBR. Enfin, une autre découverte d'importance, en 1994, confirma la présence d'une enzyme de conversion de l'endothéline (ECE-1) [341] permettant de générer les endothélines actives à partir de pro-peptides (les BIG-ETs). Depuis, 3 isoformes différentes ont été caractérisées : ECE-1, ECE-2 et ECE-3 [342, 343].

Cet ensemble complexe composé de ligands, de récepteurs et d'enzymes de conversion est couramment dénommé « axe endothéline » ou « système endothéline ». Depuis sa découverte, l'axe endothéline a suscité un grand intérêt, particulièrement dans le domaine des pathologies cardiovasculaires avec le développement (seulement 4 ans après l'identification des séquences peptidiques des ETs) d'inhibiteurs actuellement utilisés en clinique. La dérégulation du système endothéline a également été mise en évidence dans de nombreux autres processus physiopathologiques dont le cancer. En effet, dans de multiples tumeurs, l'expression des endothélines et de leurs récepteurs est modifiée, favorisant ainsi la plupart des étapes de la progression tumorale. Depuis une dizaine d'années, plus de 500 publications et revues scientifiques ont permis de valider cliniquement et expérimentalement l'implication de l'axe endothéline dans la progression de nombreux cancers. Ainsi, les différents acteurs moléculaires du système endothéline apparaissent aujourd'hui comme des cibles thérapeutiques pertinentes pour le développement de nouveaux traitements contre les cancers.

### 3.1. Généralités sur le système endothéline

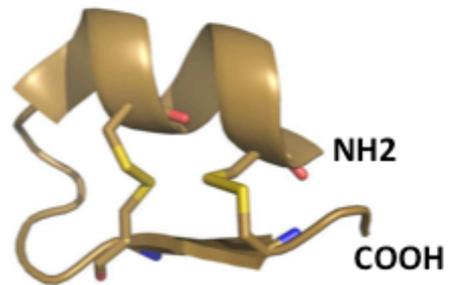
#### 3.1.1. Structure des endothélines

Les endothélines (ETs) comprennent trois peptides de 21 a.a comportant chacun deux ponts disulfures, et présentant des séquences très similaires à celles d'autres peptides cardiotoxiques retrouvés dans le venin du serpent *Atractaspis engaddensis*, les sarafotoxines (STXs). L'alignement des séquences des différents peptides montre une forte identité, avec 10 résidus totalement conservés dont 4 cystéines en position 1, 3, 11 et 15 (Figure 31). Ces cystéines sont responsables de la formation des deux ponts disulfures 1-11 et 3-15 qui donnent une structure compacte à ces peptides. Les structures cristallographiques de l'ET-1 et de la sarafotoxine 6b (S6b) ont été résolues [344, 345] et confirment que ces petits peptides de 21 a.a sont très structurés avec un fragment d'hélice  $\alpha$  en N-terminal et un bout de brin  $\beta$  du côté C-terminal. Cette structure particulière est essentielle pour la fonctionnalité des ETs et, il est admis que la partie N-terminale serait liée à la forte affinité et à la sélectivité des ETs pour leurs récepteurs, alors que la partie C-terminale interviendrait dans la reconnaissance « primaire » du récepteur et la transduction du signal [346-348].

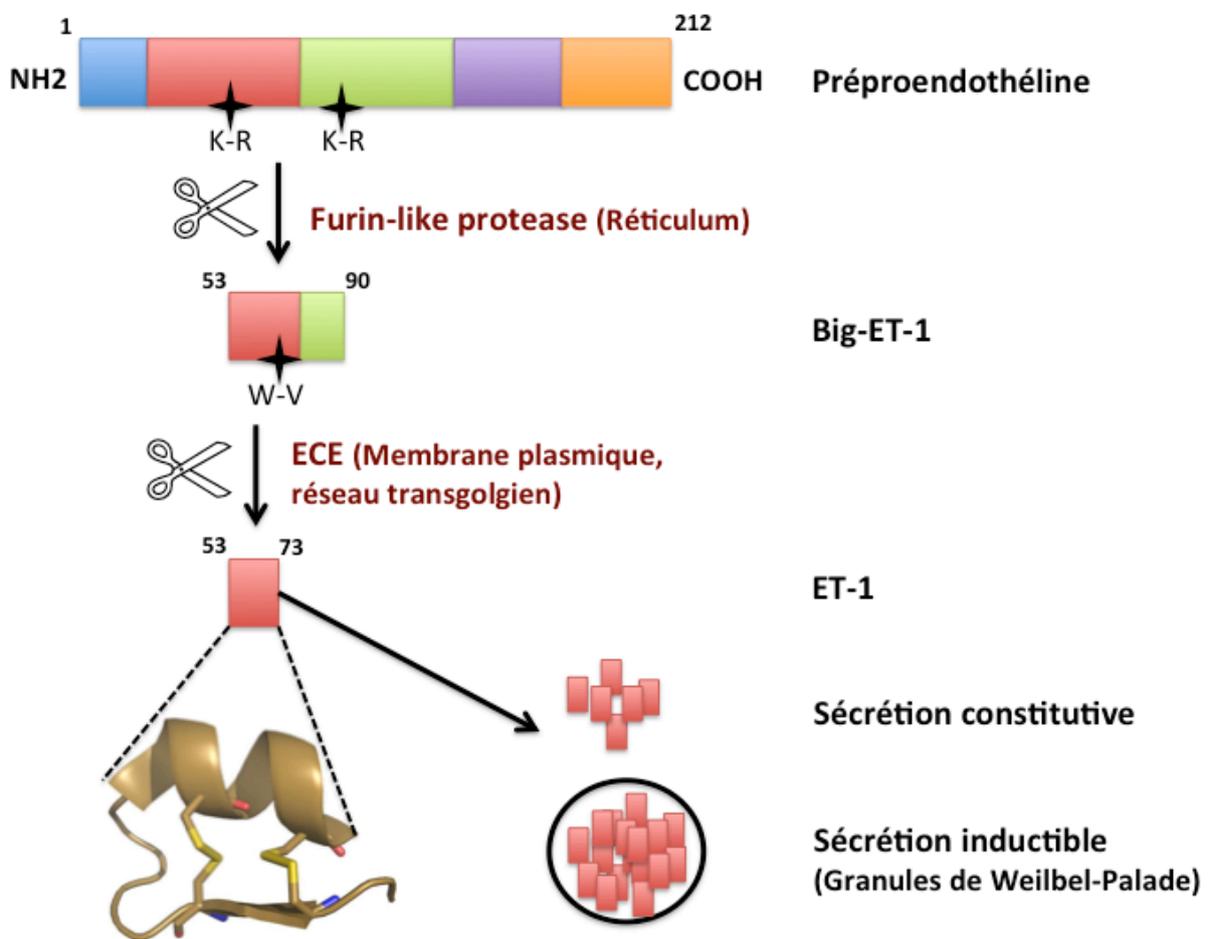
#### 3.1.2. Biosynthèse des endothélines

Les endothélines matures sont synthétisées à la suite de plusieurs étapes complexes de protéolyse (Figure 32). Au départ, la transcription des gènes codant les ETs produit des polypeptides d'environ 200 a.a nommés prépro-endothélines. Les prépro-endothélines sont ensuite clivées au niveau de sites dibasiques par des endopeptidases de type furine. Cette première protéolyse produit des peptides de 37 à 41 a.a, biologiquement inactifs, appelés big-endothélines (Big-ET). Les endothélines matures sont ensuite générées grâce au clivage des liaisons W-V de la Big-ET-1 et Big-ET-2 ou W-I de la Big-ET-3, par le biais de métalloprotéases membranaires à zinc appartenant à la famille des néprilysines. Ces enzymes, nommées enzymes de conversion de l'endothéline (ECE), assurent la production des peptides biologiquement actifs de 21 a.a. [341]. Plusieurs isoformes d'ECE ont été identifiées : ECE 1, 2 et 3 [342, 343]. L'ECE 1 et l'ECE 2 sont les deux isoformes les plus largement exprimées dans les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales. L'ECE-1 est principalement localisée à la membrane plasmique alors que l'ECE-2 se trouve au niveau du réseau trans-Golgien [341, 342]. Ainsi, les ETs matures sont produites à la fois dans le cytoplasme et à la surface cellulaire. A la suite de leur biosynthèse, les ETs sont sécrétées suivant deux mécanismes : une sécrétion inductible par l'intermédiaire de vésicules de stockage appelées

ET-1	CSCSSLMDKECVYFCHLDIIW
ET-2	CSCSSWLDKECVYFCHLDIIW
ET-3	CTCFYKDKKECVYYCHLDIIW
STX-a	CCKDMTDKECLNFCHQDVIW
STX-b	CCKDMTDKECLYFCHQDVIW
STX-c	CSCNDMTDEECLNFCHQDVIW



**Figure 31. Séquences des endothélines (ET) et des sarafotoxines (STX).** Structure tridimensionnelle de l'ET-1 (Protein Data Bank, 1T7H).



**Figure 32. Biosynthèse de l'endothéline-1.** Les endothélines biologiquement actives sont issues du clivage enzymatique de pro-peptides, les Big-endothélines. Une fois produites, les endothélines sont sécrétées d'une manière inductible ou constitutive. ECE : Endothelin Converting Enzyme.

granules de Weibel-Palade [349] et une sécrétion constitutive [350].

Les endothélines sont produites par une très grande variété de cellules au sein de multiples tissus (voir la référence [351] et le tableau 6). L'ET-1 est majoritairement synthétisée par les cellules de l'endothélium vasculaire et lymphatique, mais aussi par les macrophages, les fibroblastes, les cardiomyocytes et les neurones. L'ET-2 est exprimée par les cellules de l'épithélium intestinal, rénal et les cellules folliculaires de la granulosa. L'ET-3 est produite au niveau du système nerveux central (neurones) et périphérique ainsi que par des cellules endométriales. *In vivo*, l'ET-1 est l'isoforme la plus représentée, et sa synthèse implique principalement les cellules de l'endothélium vasculaire. L'ET-1 est relarguée majoritairement du côté basolatéral de l'endothélium pour exercer son action sur les cellules musculaires lisses sous-jacentes [352]. Par conséquent, le niveau plasmatique d'ET-1 est généralement faible (1-10 pmol/L, [353]), d'autant plus que sa demi-vie dans le sang est courte (environ 2min) à cause de son élimination rapide au niveau pulmonaire [354] et de sa dégradation par des endopeptidases localisées dans les tubules rénaux [355]. L'élimination pulmonaire met en jeu la séquestration de l'ET-1 par les récepteurs ETB de l'endothélium qui sont ensuite internalisés et détruits, alors que l'élimination rénale implique l'inactivation de l'ET-1 par des métalloenzymes comme la néprilysine 24.11 (NEP). A cause de sa sécrétion orientée et de sa courte demi-vie, l'ET-1 constitue donc un médiateur chimique local, exerçant des effets paracrines et/ou autocrines.

### 3.1.3. Régulation de la biosynthèse des endothélines

Les gènes codant pour les ETs (ET-1, ET-2 et ET-3) se trouvent respectivement sur les chromosomes 6, 1 et 20. L'expression de l'ET-1 est essentiellement régulée au niveau transcriptionnel par une région promotrice localisée en amont du gène de la préproendothéline-1 [356] (Figure 33). Cette région contient à la fois des éléments cis régulateurs communs (boîte TATA et CAAT) mais également des séquences consensus pour des facteurs de transcription tissu-spécifiques (e.g. Vascular endothelial zinc finger 1, Vezf1) et inductibles (e.g. HIF). Parmi les éléments du promoteur, le site de reconnaissance AP-1 est essentiel dans la régulation de la production d'ET-1. En effet, le facteur de transcription AP-1, composé des sous unités Fos et Jun, intervient à la fois dans la transcription basale et induite de l'ET-1 [357, 358]. De nombreux médiateurs solubles, tels que la thrombine, l'angiotensine II, les LDL, l'insuline, la leptine et l'érythropoïétine, sont capables de stimuler la transcription du gène de la prépro-endothéline via le recrutement d'AP-1 [356].

	ET-1	ET-2	ET-3	ETRs
Endothélium vasculaire	+			ETBR
Endothélium lymphatique	+			ETBR
Cellules musculaires lisses vasculaires	+		+	ETAR>>ETBR
Coeur	+	+	+	ETAR>>ETBR
Poumon	+		+	ETAR-ETBR
Intestin/Côlon	+			ETAR-ETBR
Pancréas	+			ETAR-ETBR
Rein	+	+	+	ETBR>ETAR
Surrénales	+		+	ETAR-ETBR
Foie	+			ETAR-ETBR
Thyroïde	+			ETAR-ETBR
Follicule Ovarien: - granulosa	+	+		ETAR
Utérus: - endomètre	+	+	+	ETAR-ETBR
- myomètre	+			ETAR>ETBR
Placenta	+			ETAR-ETBR
Testicules	+			ETAR>ETBR
Epididyme	+			ETAR-ETBR
Pénis (corps caverneux)	+			ETAR>ETBR
Prostate	+			ETAR-ETBR
Cerveau (neurones, astrocytes)	+		+	ETAR-ETBR
Système nerveux périphérique	+	+	+	ETAR-ETBR
Peau (mélanocytes, kératinocytes)	+			ETBR
Macrophages, Granulocytes	+		+	ETBR, ETAR
Tissu adipeux	+			ETAR, ETBR
Os				ETAR-ETBR

Tableau 6. Expression des endothélines et de leurs récepteurs dans différents tissus ou cellules humains.

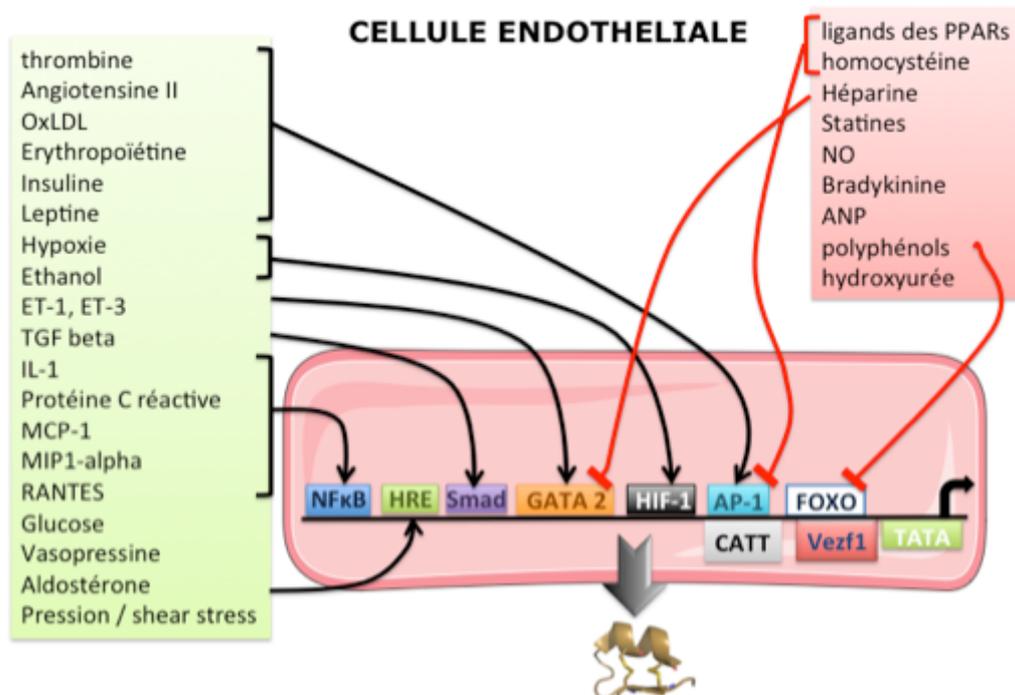


Figure 33. Régulation transcriptionnelle de la production d'ET-1 dans l'endothélium.

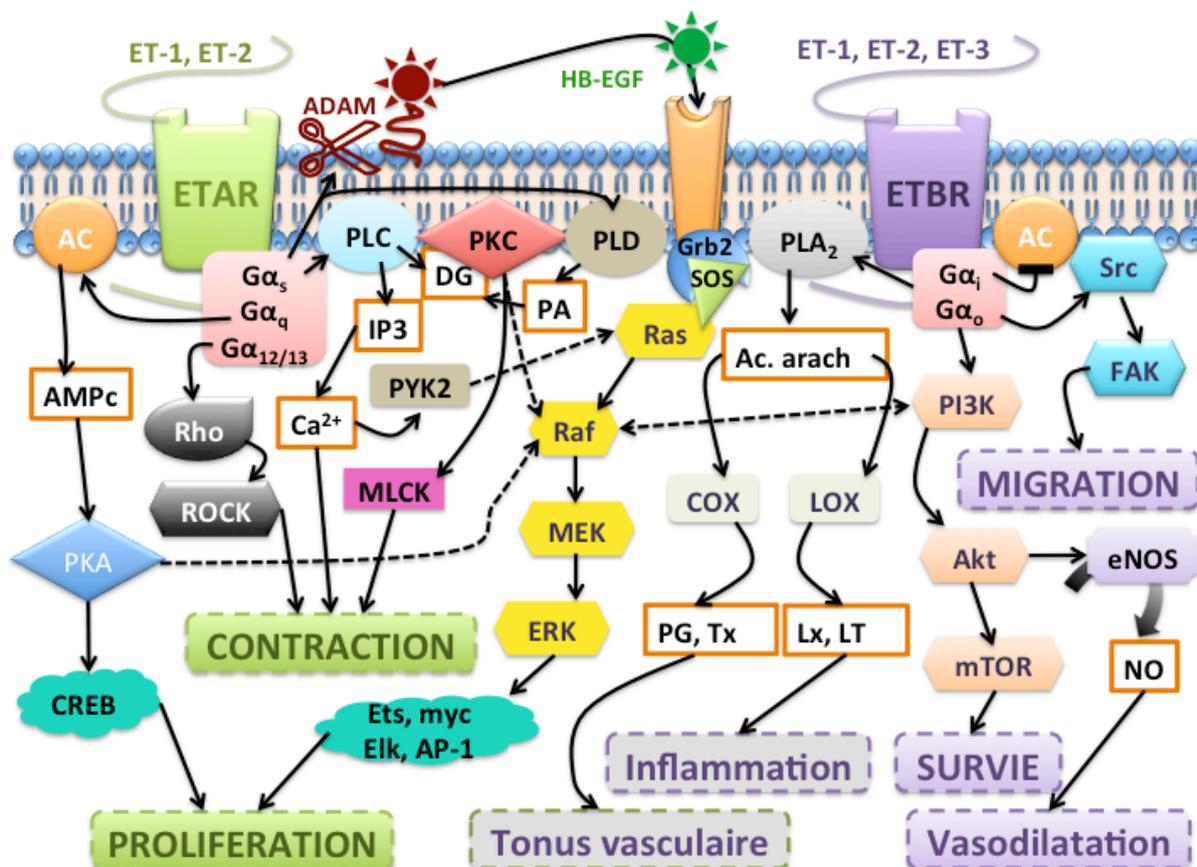
TGF: Transforming Growth Factor; MCP: Monocyte Chemotactic Protein; MIP: Macrophage Inflammatory Protein; RANTES: Regulated upon Activation, normal T-cell Expressed and Secreted; NFκB: Nuclear Factor kappa B; HRE: Hormone response Element; HIF: Hypoxia Inducible Factor; FOXO: Forkhead box. PPAR: Peroxisome Proliferator Activator Receptor. ANP: Atrial natriuretic peptide; NO: Nitric oxide; Vezf: Vascular endothelial zinc finger; OxLDL: Oxidized Low Density Lipoprotein. (Voir la revue [356])

Certains autres agents solubles ont, au contraire, un effet inhibiteur sur la transcription du gène codant l'ET-1. C'est le cas du NO, de l'héparine, des fibrates et des polyphénols pour n'en citer que quelques uns. Le promoteur du gène est également extrêmement sensible à l'hypoxie et, il a été démontré que la biosynthèse de l'ET-1 en réponse à l'hypoxie implique un complexe protéique composé d'AP-1, de HIF1 et de GATA2 [359]. Enfin, en raison de ses effets vasoactifs, la sécrétion d'ET-1 est étroitement régulée par des paramètres « mécaniques » tels que la tension vasculaire et les forces de cisaillement du flux sanguin ou « shear stress » [360].

#### 3.1.4. Récepteurs des endothélines et voies de signalisation associées

Les endothélines exercent leurs actions physiologiques par l'intermédiaire de deux sous-types de récepteur connus, le récepteur ETA (ETAR) et le récepteur ETB (ETBR) [339, 340]. Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des RCPGs caractérisée par la présence de 7 segments transmembranaires. ETAR et ETBR sont exprimés d'une façon quasi-ubiquitaire (voir tableau 6). Cependant, ETBR est exprimé de façon prédominante sur les cellules de l'endothélium vasculaire alors qu'ETAR se trouve en abondance sur les cellules musculaires lisses et les cardiomyocytes. D'un point de vue pharmacologique, ces récepteurs se distinguent par leur sélectivité vis à vis des endothélines : ETBR fixe les endothélines d'une manière équivalente alors qu'ETAR reconnaît l'ET-1 et l'ET-2 avec une affinité environ 100 fois supérieure à celle d'ET-3 [361]. Les voies de signalisation associées aux récepteurs ETA et ETB sont nombreuses et complexes (Figure 34). Le récepteur ETA est plutôt couplé à des protéines G de type G $\alpha$ s ou  $\alpha$ q qui médient des effets vasoconstricteurs et mitogènes au niveau des cellules musculaires lisses et des fibroblastes de l'endothélium vasculaire [362]. La vasoconstriction implique le relargage de calcium intracellulaire via la voie phospholipase C (PLC)/ inositol triphosphate (IP3), mais également l'activation de multiples kinases (PKC, ROCK) intervenant dans la régulation de la phosphorylation de la *Myosin Light Chain Kinase* (MLCK), une protéine directement liée au processus de contraction [362]. Par ailleurs, l'effet mitogène dû à l'activation d'ETAR met principalement en jeu la voie Adénylate Cyclase / AMPc / PKA qui aboutit à la stimulation de facteurs de transcription régulant le cycle cellulaire. Le rôle prolifératif médié par ETAR peut également résulter de la transactivation entre différentes voies de signalisation mitogènes. En effet, la PKA et la PKC peuvent directement phosphoryler la protéine Raf et ainsi activer la puissante voie mitogénique des MAPK [362]. Il a également été démontré que le récepteur ETAR

pouvaient déclencher la transactivation du récepteur à l'EGF, et donc activer la voie des MAPK, par l'intermédiaire de métalloprotéases libérant des facteurs de croissance associés aux protéoglycanes de la matrice extracellulaire comme l'HB-EGF [363, 364], ou par l'activation de la kinase Src [364]. Concernant le récepteur ETB, les protéines G impliquées dans sa signalisation sont majoritairement de type Gi ou Go. Les effets biologiques principaux, bien décrits au niveau des cellules endothéliales, comprennent un effet vasodilatateur indirect via la production de NO [365, 366], un effet antiapoptotique [367] par la voie Akt/mTOR et un effet positif sur la migration cellulaire par le biais des kinases d'adhésion focale (FAK) [368]. En fonction du contexte biologique et du type cellulaire, ETBR peut également avoir des actions mitogènes, vasoconstrictrices et immunomodulatrices.



**Figure 34. Voies de signalisation majoritaires déclenchées par les ETRs au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses.** AC: Adénylate Cyclase; ADAM: A Disintegrin And Metalloproteinase; AMPc: Adenosine Monophosphate cyclique; PK: Protéine Kinase; PL: phospholipase; IP3: Inositol triphosphate; PA: phosphatidic acid; PG: Prostaglandines; Tx: Thromboxanes; Lx: Lipoxines; LT: Leucotriènes; NO: nitric oxide; Ac arach: Acide arachidonique; COX: cyclooxygénase; LOX: lipooxygénase; eNOS: endothelial Nitric Oxide Synthase; MLCK: Myosin Light Chain Kinase; HB-EGF: Heparin-Binding Epidermal Growth Factor; FAK: Focal Adhesion Kinase; PI3K: Phosphatidylinositol 3 kinase; mTOR: mammalian Target Of Rapamycin. ROCK: Rho associated Protein Kinase; ERK: Extracellular signal regulated Kinase; CREB: cAMP Response Element Binding protein; PYK2: Protein tyrosine Kinase 2; SOS: Son Of Sevenless; GRB2: Growth factor Receptor Bound protein 2. Sources: [362, 369]

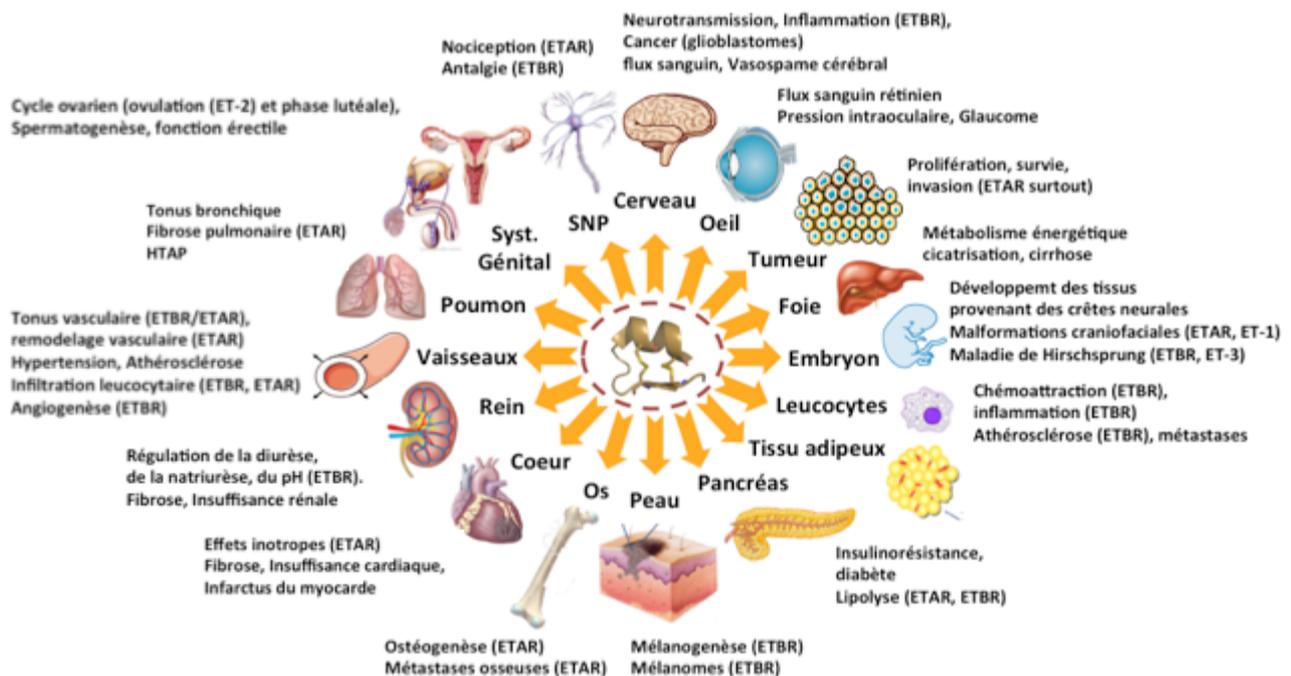
### 3.2. Principaux rôles physiopathologiques de l'axe endothéline

Etant donné son expression quasi-ubiquitaire, le système endothéline intervient dans un nombre très important de processus physiopathologiques au sein de multiples organes (Figure 35) [358, 369-371]. Les rôles physiologiques les plus étudiés sont ceux concernant l'homéostasie du système cardiovasculaire (incluant la régulation du tonus vasculaire et de la fonction cardiaque) et la modulation de la fonction rénale. Dans ces deux domaines, la dérégulation de l'axe endothéline est corrélée à des pathologies de première importance comme l'hypertension, l'athérosclérose, l'insuffisance cardiaque ou l'insuffisance rénale chronique. Par ailleurs, les endothélines et leurs récepteurs sont également impliqués dans d'autres fonctions physiopathologiques allant de l'embryogenèse au contrôle du cycle ovarien, en passant la modulation de la nociception. Dans ce paragraphe, nous allons faire un tour d'horizon des principales fonctions physiologiques régulées par l'axe endothéline et des mécanismes pathologiques associés. Le rôle du système endothéline dans le développement des cancers sera abordé en détail dans la partie suivante.

#### 3.2.1. L'axe endothéline dans le développement embryonnaire

L'importance des endothélines et de leurs récepteurs dans l'embryogenèse a été mise en évidence grâce au développement des souris « Knock out » (KO). Des souris KO pour ET-1 ou ETAR meurent à la naissance à cause de malformations sévères de la tête et du cou entraînant une asphyxie mécanique [372]. Cette mortalité est encore plus précoce pour des souris déficientes en ECE-1 puisque la plupart des animaux décèdent *in utero* [373]. On observe également des malformations artérielles chez ces souris, incluant l'absence d'artère sous-clavière, une orientation de la crosse aortique vers la droite et parfois des interruptions de l'aorte. L'ET-1 et le récepteur ETAR sont indispensables pour assurer la prolifération et la migration des cellules embryonnaires issues des crêtes neurales. Ces cellules sont ensuite responsables de la formation des artères et des os du crâne et de la face expliquant ainsi les phénotypes obtenus avec les souris KO pour ETAR, ET-1 ou ECE-1. A la différence de ces dernières, des souris KO pour ETBR ou ET-3 sont viables après la naissance et ne meurent que 3 à 6 semaines plus tard. D'un point de vue phénotypique, ces souris sont noires avec des taches blanches à cause d'une absence de mélanocytes épidermiques. De plus, elles présentent des malformations colorectales (mégacôlon) liées à l'absence de système nerveux entérique, ce qui provoque leur mort après quelques semaines [374, 375]. Ce phénotype illustre le rôle essentiel de l'activation d'ETBR par ET-3 lors de la différenciation des cellules de la crête

neurale en mélanocytes et en neurones entériques. Chez l'homme, la maladie de Hirschsprung, ou maladie du mégacôlon congénitale, est due à des mutations au niveau des gènes codant ET-3 et ETBR [376, 377].



**Figure 35. Rôles physiopathologiques principaux du système endothéline.** Les endothélines et leurs récepteurs ont un rôle physiologique dans de nombreux organes. HTAP : Hypertension Artérielle Pulmonaire. Schéma inspiré de celui présent dans la référence [356].

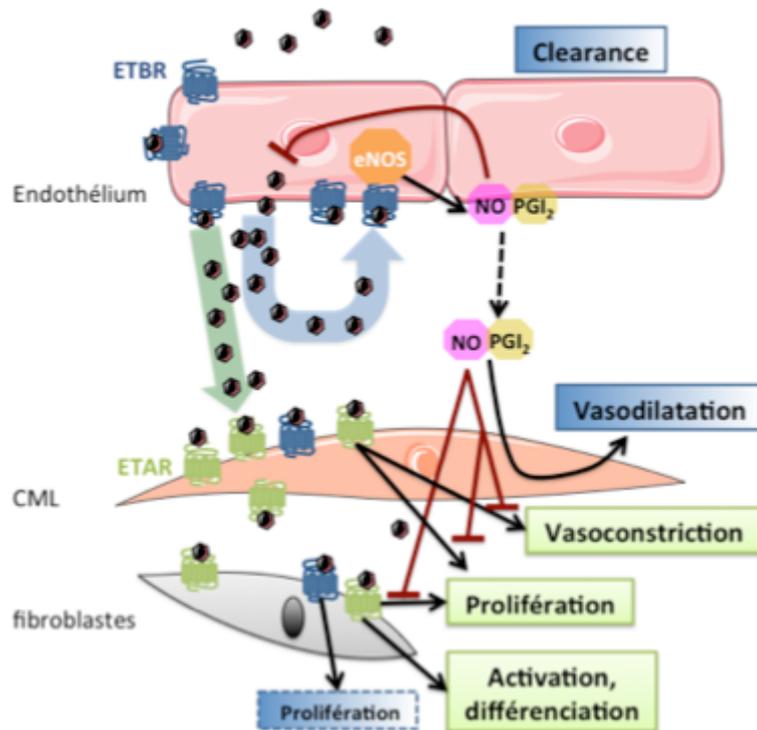
### 3.2.2. L'axe endothéline dans les vaisseaux sanguins

En 1988, l'ET-1 a été découverte à cause de ses propriétés vasoconstrictrices uniques, 10 fois plus puissantes que l'adrénaline ou l'angiotensine. Depuis, le rôle de l'axe endothéline dans le maintien de l'homéostasie du tonus vasculaire a été largement étudié et de nouvelles fonctions physiopathologiques associées aux vaisseaux ont été découvertes. L'ET-1 est abondamment sécrétée par les cellules de l'endothélium vasculaire et, en situation inflammatoire, par les cellules musculaires lisses [378]. Du fait de sa sécrétion basolatérale, la concentration en ET-1 dans la paroi vasculaire est 100 fois supérieure à celle retrouvée dans le plasma [352, 379]. L'ET-1 interagit avec les récepteurs ETA présents sur les cellules musculaires lisses (CML) et avec les récepteurs ETB présents à la fois sur les cellules endothéliales et les CML. En fonction du type de vaisseau, le ratio ETA/ETB sur les CML est variable ; il est généralement plus faible sur les veines que sur les artères [380]. L'action de l'ET-1 sur les vaisseaux se compose de deux phases : une vasodilatation transitoire (quelques minutes) puis une vasoconstriction forte et prolongée (jusqu'à 1h) [381]. Cet effet biphasique est lié à la présence des deux sous-types de récepteur ETA et ETB et à leur expression

différente sur les cellules endothéliales et les CML. La première phase de vasodilatation est due à l'action autocrine de l'ET-1 sur les cellules endothéliales via le récepteur ETB [382]. La fixation de l'ET-1 sur ETBR induit le relargage de NO et de prostacyclines (PGI-2) qui vont permettre la relaxation des CML sous-jacentes. La deuxième phase vasoconstrictrice implique l'activation des récepteurs ETA localisés sur les CMLs et le déclenchement d'une voie de signalisation calcique aboutissant une contraction forte et persistante. De manière surprenante, l'administration d'inhibiteurs spécifiques du récepteur ETA a un effet relativement modeste sur la pression artérielle d'individus sains [383]. En revanche, le blocage du récepteur ETB déclenche une augmentation importante de la pression artérielle, à cause de la suractivation des récepteurs ETA, de l'inhibition de la vasodilatation indirecte par le biais du NO et du blocage de l'élimination pulmonaire de l'ET-1 via ETBR. Ainsi, parmi les deux récepteurs, ETBR constitue le principal régulateur du tonus vasculaire basal et permet de limiter les effets vasoconstricteurs de l'ET-1 suite à l'activation d'ETAR (Figure 36) [383].

En plus de ses actions sur la pression sanguine, l'axe endothéline joue aussi un rôle important dans les phénomènes de remodelage vasculaire [384]. Le récepteur ETA est associé à la prolifération des CMLs mais aussi à l'activation et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes [385], des cellules productrices de matrice extracellulaire intervenant dans le processus de cicatrisation. L'ET-1 a également un rôle immunomodulateur par ses actions chimiotactiques sur les monocytes liées à la régulation de l'expression de certaines molécules d'adhésion nécessaires à l'infiltration leucocytaire [386, 387].

L'identification des propriétés vasoconstrictrices des endothélines a suscité beaucoup d'études concernant le rôle potentiel de l'axe endothéline dans l'hypertension artérielle. Chez des patients atteints d'hypertension artérielle systémique, les taux plasmatiques d'ET-1 sont généralement normaux [388]. En revanche, dans des cas particuliers d'hypertensions liées aux régimes alimentaires salés, à une insuffisance rénale, ou à une pathologie vasculaire, les taux plasmatiques d'ET-1 peuvent être augmentés d'un facteur 10 par rapport aux taux normaux et servir de biomarqueur pronostique. Quoi qu'il en soit, la plupart des individus hypertendus, possédant un taux plasmatique d'ET-1 élevé ou non, présentent des concentrations d'ET-1 excessives au niveau des parois vasculaires [389]. Ceci entraîne une inflammation du tissu vasculaire caractérisée par le recrutement de leucocytes et la production de cytokines par les CMLs et les cellules endothéliales [390]. L'ET-1 favorise également la prolifération des CMLs et la synthèse de matrice extracellulaire par les fibroblastes, ce qui aboutit à une rigidification et à un épaississement de la paroi vasculaire.



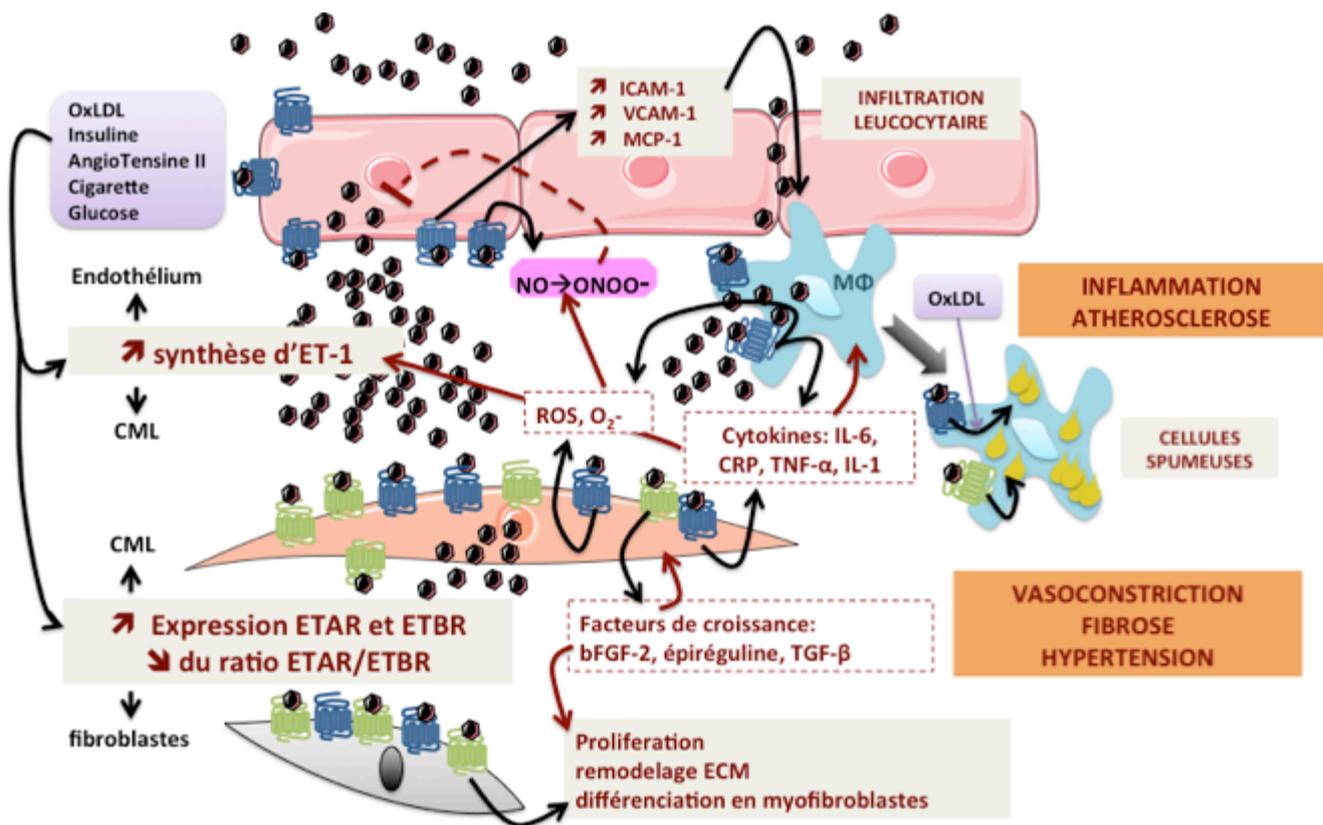
**Figure 36. Régulation du tonus vasculaire par le système endothéline.** Les récepteurs ETB situés sur l'endothélium vasculaire ont un effet vasodilatateur et permettent de contrebalancer les actions vasoconstrictrices et mitogènes des récepteurs ETA majoritairement exprimés par les cellules musculaire lisses.

Tous ces phénomènes ne sont pas seulement dus à une surproduction d'ET-1 mais également à une dérégulation des niveaux et des profils d'expression des ETRs dans la paroi vasculaire. En effet, dans un contexte d'hypertension, les ETRs sont surexprimés par les CML et les fibroblastes et la proportion de récepteurs ETB sur ces mêmes cellules est augmentée par rapport à celle observée dans une situation non pathologique [391]. Ainsi, toutes ces dérégulations de l'axe endothéline participent fortement au maintien de l'hypertension artérielle et au déclenchement de complications fréquemment associées à l'hypertension telles que l'athérosclérose, l'hypertrophie du ventricule gauche et l'insuffisance rénale.

Le bénéfice de l'administration d'inhibiteurs des ETRs dans des cas d'hypertension systémique a été démontré cliniquement. En effet, l'administration de bosentan (un inhibiteur mixte ETAR/ETBR) ou plus récemment de darusentan (un inhibiteur sélectif d'ETAR) chez des patients hypertendus, a permis de diminuer significativement la pression artérielle chez ces derniers [392, 393]. Cependant, aucun bénéfice significatif par rapport aux autres traitements antihypertensifs n'a pour le moment été rapporté, et l'incidence plus importante d'effets secondaires justifie la non utilisation des inhibiteurs d'ETRs pour l'hypertension artérielle systémique. D'autres études cliniques, portant sur des groupes de patients plus susceptibles de répondre aux traitements, comme des individus atteints d'hypertension résistante ou d'hypertension liée au diabète, devraient permettre de mieux évaluer l'intérêt du

blocage des ETRs dans ces cas particuliers d'hypertension. Il existe tout de même un type d'hypertension particulier pour lequel les inhibiteurs des ETRs ont prouvé leur intérêt : l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) [394]. L'HTAP est caractérisée par une forte augmentation de la pression artérielle pulmonaire et donc une résistance vasculaire augmentée, ce qui conduit à la défaillance rapide du ventricule droit. Les individus atteints de formes sévères d'HTAP présentent une moyenne de survie de 2 à 3 ans sans traitement. Chez ces individus, ainsi que dans des modèles animaux de HTAP, les taux plasmatiques d'ET-1 sont élevés et sont corrélés à la sévérité de la pathologie [395]. Il a été montré que cette surproduction d'ET-1 est principalement due à une biosynthèse excessive au niveau de l'endothélium vasculaire pulmonaire. Parallèlement, une augmentation de l'expression des ETRs au sein des parois vasculaires pulmonaires a également été observée [396] et contribue probablement à la réponse vasoconstrictrice excessive à la stimulation par l'ET-1. L'influence de l'axe endothéline dans l'HTAP a été confirmée avec l'utilisation d'inhibiteurs mixtes ou spécifiques d'ETAR dans différents modèles animaux. Par ailleurs, des essais cliniques chez l'homme ont également eu lieu et se sont révélés très concluants. En effet, une étude de phase III avec le bosentan a permis d'améliorer significativement le taux de survie à trois ans (de 48% à 86%) chez des individus atteints de HTAP [397]. Ainsi, à l'heure actuelle, deux molécules ciblant les ETRs sont utilisées pour le traitement de l'HTAP : le Bosentan (Tracleer™) et l'ambrisentan (Letairis™).

Comme indiqué plus haut, l'endothéline est impliquée dans le remodelage vasculaire, un processus dont la dérégulation peut aboutir à la formation de plaques d'athérome, notamment chez les individus hypertendus, diabétiques ou présentant une hypercholestérolémie. Il a été montré que l'ET-1 et l'ECE-1 sont surexprimées dans les plaques d'athérome [398] et que l'administration d'antagonistes des ETRs permet de diminuer les lésions athéromateuses [399]. De même, l'expression d'ETBR est également plus élevée à proximité des plaques d'athérome [400]. L'implication de l'ET-1 dans l'athérosclérose est due au fait que son expression est augmentée par des taux élevés de cholestérol. En effet, les LDL oxydés sont capables de stimuler la production d'ET-1 par les cellules endothéliales et les macrophages [401, 402], ce qui induit une inflammation de la paroi vasculaire et un remodelage de la matrice extracellulaire (Figure 37). L'ET-1 surexprimée dans la paroi vasculaire va ensuite déclencher la prolifération des CML et des fibroblastes, le relargage de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance, ainsi que l'infiltration de nouvelles cellules inflammatoires [390].



**Figure 37. Dérégulation de l'axe endothéline au niveau vasculaire et complications associées.** La dérégulation de l'axe endothéline participe à la pathogenèse de nombreuses maladies vasculaires comme l'hypertension ou l'athérosclérose. L'augmentation de l'expression des composants de l'axe endothéline dans la paroi vasculaire contribue à l'instauration d'un état inflammatoire, à la prolifération des CMLs et au remodelage de la matrice extracellulaire par le biais des fibroblastes. Tous ces phénomènes sont associés au développement de plaques d'athérome et à l'installation d'une hypertension artérielle. LDL : *Low Density Lipoprotein* ; oxLDL : LDL oxydé ; ROS : *Reactive Oxygen Species*; CRP : *C reactive protein* ; ECM : *extracellular matrix*.

Le récepteur ETB semble jouer un rôle important dans certains de ces phénomènes pro-athérogéniques. Par exemple, il a été montré que l'activation d'ETBR sur les monocytes/macrophages infiltrant les vaisseaux, favorise l'accumulation de LDL dans ces cellules et leur transformation en cellules spumeuses [403]. Par ailleurs, ETBR semble également impliqué dans l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire. Sur le long terme, tous ces processus vont aboutir à la dégénérescence de la paroi vasculaire : les fibroblastes activés vont sécréter du collagène et induire une fibrose du tissu vasculaire, les CMLs vont se multiplier et s'hypertrophier, des cellules inflammatoires gorgées de lipides vont s'infiltrer et tous ces éléments vont s'agglomérer pour former un amas fibro-lipidique instable ou plaque d'athérome.

Enfin, l'ET-1 a également été impliquée dans d'autres pathologies vasculaires ciblant les coronaires ou les vaisseaux cérébraux. Des taux élevés d'ET-1 sont retrouvés chez des individus ayant subi des infarctus du myocarde [404] ou des accidents vasculaires cérébraux [405]. La concentration plasmatique d'ET-1 est même corrélée avec la survie des patients

après la survenue de l'infarctus [406]. Dans ces deux pathologies, l'administration d'inhibiteurs des ETRs a permis d'augmenter la survie et de limiter les lésions tissulaires dans des modèles animaux [407, 408]. Une élévation de la concentration plasmatique en ET-1 est également observée chez des individus atteints de diabète de type II et semble liée aux complications vasculaires de la maladie [409, 410]. Des résultats cliniques prometteurs ont été obtenus avec des antagonistes du récepteur ETA qui ont permis une amélioration de la microcirculation cutanée et de la perfusion vasculaire périphérique chez des patients diabétiques [411, 412].

### **3.2.3. L'axe endothéline dans le muscle cardiaque**

Les ETRs sont présents d'une façon hétérogène au niveau du coeur. Le sous-type prédominant est le récepteur ETA qui est abondamment exprimé par les cardiomyocytes et les fibroblastes [413]. Par ailleurs, l'ET-1 est l'endothéline majoritairement retrouvée au niveau cardiaque et sa biosynthèse implique les cardiomyocytes, les fibroblastes et l'endothélium vasculaire coronarien. En se fixant sur les cardiomyocytes, l'ET-1 engendre un effet inotrope positif sur un coeur sain, mais inotrope négatif sur un coeur défaillant [414]. Il a également été rapporté, dans certains modèles expérimentaux, que l'ET-1 pouvait avoir un effet chronotrope positif. Ainsi, l'ET-1, principalement via ETAR, joue un rôle dans la contractilité du muscle cardiaque, surtout au niveau du ventricule gauche. Dans des situations pathologiques comme l'insuffisance cardiaque, il a été montré que l'axe endothéline est dérégulé. Cette dérégulation implique une augmentation du taux plasmatique d'ET-1 ainsi qu'une surexpression du récepteur ETAR dans le ventricule gauche [415, 416]. La surproduction d'ET-1 est à la fois causée par une biosynthèse accrue au niveau des cardiomyocytes et de l'endothélium pulmonaire, mais aussi par un défaut d'élimination de l'ET-1. Chez les patients, les niveaux plasmatiques d'ET-1 sont corrélés avec la sévérité de la pathologie et avec le pronostic vital [417]. De plus, la surexpression du récepteur ETA et de l'ET-1 dans le ventricule gauche favorise l'hypertrophie des cardiomyocytes et le remodelage de la matrice extracellulaire par les fibroblastes [418]. L'ET-1 permet également de créer un état inflammatoire en stimulant la production de cytokines et en favorisant l'infiltration leucocytaire. Tous ces phénomènes participent à l'hypertrophie et à la fibrose du ventricule gauche et donc à l'installation d'une insuffisance cardiaque, qui est par ailleurs aggravée par une augmentation de la résistance vasculaire périphérique induite par des niveaux plasmatiques élevés d'ET-1. Par conséquent, l'utilisation d'antagonistes des ETRs semble être

une stratégie pertinente pour le traitement de l'insuffisance cardiaque. Cependant, malgré des effets bénéfiques observés dans différents modèles animaux, les essais cliniques chez l'homme se sont, pour le moment, révélés non concluants [419].

#### **3.2.4. L'axe endothéline dans les poumons**

Le système endothéline est largement retrouvé dans le réseau vasculaire pulmonaire ainsi que dans les bronches. Les ETRs sont exprimés au niveau des cellules musculaires lisses des bronches et participent à la régulation du tonus bronchique sous l'action de l'ET-1 sécrétée par l'épithélium et l'endothélium vasculaire pulmonaire [420]. Concernant les vaisseaux, le profil d'expression des ETRs est complexe et dépend de la localisation, proximale ou distale, des artères. Le récepteur ETB de l'endothélium vasculaire pulmonaire est très abondant et assure l'élimination de l'ET-1 de la circulation [354]. Des dérégulations de l'axe endothéline au niveau pulmonaire sont associées à certaines pathologies cardiovasculaires (HTAP, insuffisance cardiaque) mais aussi à des maladies pulmonaires interstitielles comme l'asthme ou divers types de fibroses [421, 422]. Ces dernières mettent en jeu les propriétés inflammatoires et fibrogéniques de l'ET-1 via ETAR, mais aussi via ETBR que l'on retrouve fortement exprimé au niveau des monocytes/macrophages infiltrant les lésions [423].

#### **3.2.5. L'axe endothéline dans les reins**

L'endothéline et ses récepteurs participent activement à la physiologie rénale. L'axe endothéline est exprimé dans la plupart des zones qui composent les néphrons et le récepteur ETB constitue entre 60 à 80% des ETRs retrouvés au niveau du rein [424]. D'un point de vue physiologique, le système endothéline intervient dans le contrôle du débit sanguin rénal, dans la réabsorption de l'eau et du sodium et dans l'équilibre acido-basique du sang [425]. Au niveau des glomérules, l'ET-1 module le tonus vasculaire et permet donc de réguler la filtration glomérulaire. Par exemple, une augmentation plasmatique de l'ET-1 réduit le flux sanguin rénal et diminue la filtration glomérulaire, ce qui limite la diurèse. En revanche, au niveau des tubules rénaux, l'ET-1 favorise la diurèse et la natriurèse par son action sur les récepteurs ETB exprimés par les cellules épithéliales. En activant ETBR, l'ET-1 assure l'inhibition de divers transporteurs ioniques responsables de la réabsorption du sodium et antagonise les effets antidiurétiques de la vasopressine.

Le réseau vasculaire rénal est très sensible à l'ET-1 et, dans certaines pathologies rénales, une inhibition des ETRs s'est révélée bénéfique. Chez des individus atteints

d'insuffisance rénale chronique, le blocage spécifique du récepteur ETA a permis d'améliorer la filtration glomérulaire, la diurèse et donc de diminuer la pression artérielle [426]. Des résultats positifs ont également été obtenus dans d'autres pathologies rénales impliquant une surexpression d'ET-1 et/ou du récepteur ETA, comme les scléroses glomérulaires ou les insuffisances rénale aiguës consécutives à des ischémies [427, 428].

### **3.2.6. L'axe endothéline dans les autres organes**

Comme le montre la figure 35, les rôles physiologiques du système endothéline sont multiples et impliquent de nombreux organes [356]. Certains sont liés aux propriétés contractiles des endothélines, comme l'éjection des ovocytes à partir des follicules ovariens lors de l'ovulation [429] ou la migration des spermatozoïdes dans l'épididyme [430]. En revanche, certaines autres fonctions physiologiques sont plus surprenantes, notamment la fonction de neurotransmetteur de l'ET-1 dans le système nerveux central ou périphérique [431], la régulation de l'ostéogenèse par le biais d'ETAR [432], l'effet mélanogène de l'ET-1 dans la peau [433], ou encore la modulation du métabolisme glucidique et lipidique au niveau du foie et du tissu adipeux [434].

Malgré la diversité des fonctions physiologiques, les complications pathologiques liées au système endothéline mettent souvent en jeu les mêmes mécanismes, à savoir une hyperprolifération ou une hypertrophie cellulaire (via ETAR surtout), le déclenchement d'une réaction inflammatoire (ETBR) et le remodelage de la matrice extracellulaire par les fibroblastes (ETAR). Ces trois phénomènes sont des étapes clés dans la genèse des pathologies fibrotiques et permettent d'expliquer le rôle de l'axe endothéline dans des maladies comme l'athérosclérose, l'insuffisance cardiaque ou toutes autres affections impliquant une fibrose tissulaire [435], comme la sclérodermie ou la cirrhose hépatique. Par ailleurs, les trois phénomènes que sont la prolifération, l'inflammation et le remodelage de la matrice extracellulaire sont également des mécanismes essentiels pour la progression tumorale. Ainsi, outre les pathologies fibrotiques, les endothélines sont également impliquées dans le développement des cancers, notamment grâce à leurs actions mitogéniques et leurs effets sur la matrice extracellulaire et les cellules inflammatoires.

Dans les paragraphes qui vont suivre, nous allons aborder plus en détail le rôle de l'axe endothéline dans la carcinogenèse afin de montrer que les endothélines et leurs récepteurs sont des cibles pertinentes pour la thérapie des cancers.

### 3.3. *L'axe endothéline dans la carcinogenèse*

#### 3.3.1. **Expression de l'axe endothéline dans les cancers**

Seulement deux ans après l'identification des endothélines en 1988, Kushuara et ses collègues furent les premiers à montrer que de multiples lignées cellulaires cancéreuses humaines produisent de fortes quantités d'ET-1 [436]. Depuis, une surexpression des endothélines et de leurs récepteurs a été mise en évidence dans divers échantillons de tissus collectés chez des individus atteints de cancers. Comme le montre le tableau 7, l'expression des composants de l'axe endothéline est dérégulée dans de nombreux cancers, incluant les tumeurs de la prostate, des ovaires, du colon, du sein, de la vessie, du rein, du poumon, de la sphère ORL, ainsi que les mélanomes et gliomes. En fonction de la tumeur, la dérégulation du système endothéline est différente et peut impliquer les ligands, les récepteurs et/ou les enzymes de conversion ou de dégradation.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'interaction ET-1/ETAR est principalement responsable des effets mitogènes alors qu'ETBR sert à contrebalancer ces actions. Ainsi, on retrouve une surexpression de l'ET-1 et du récepteur ETAR, parfois couplée à une baisse de l'expression d'ETBR, dans divers types de tumeurs. Les meilleurs exemples sont les tumeurs de la prostate et du pharynx, pour lesquelles la surexpression d'ETAR et de l'ET-1 est fréquemment associée à une hyperméthylation du promoteur du gène codant ETBR [437-440]. De plus, dans les tumeurs prostatiques, une baisse d'expression de la NEP a également été rapportée, ce qui favorise l'accumulation d'ET-1 [441]. Pour ces cancers, il est intéressant de noter que la dérégulation de l'expression des ETRs correspond à une inversion du ratio ETAR/ETBR par rapport aux tissus sains, dans lesquels la prépondérance du récepteur ETBR permet de réguler les actions de l'ET-1 via ETAR. Une forte surexpression d'ET-1 et d'ETAR a aussi été retrouvée dans les cancers de l'ovaire [442] qui, avec les carcinomes prostatiques, sont les deux principaux types de tumeurs étudiés pour comprendre l'influence du récepteur ETAR dans les cancers. Sur le plan clinique, les niveaux d'expression d'ETAR ont été corrélés avec le stade de développement des tumeurs (prostate, pharynx) [438, 440] et la surproduction d'ET-1, mesurable dans le plasma (prostate, colon) et/ou la salive (cancer ORL), avec une baisse de la moyenne de survie des patients [443-445]. L'expression d'ETAR a également été impliquée dans l'émergence de métastases osseuses à partir de tumeurs prostatiques [438], ou l'établissement de métastases pulmonaires à partir de cancers de la vessie [446].

A la différence d'ETAR, l'expression d'ETBR dans les cancers est plus énigmatique. En effet, dans certains cancers, la production d'ETBR est réduite ce qui permet de favoriser les rôles pathogènes de l'ET-1 et d'ETAR (voir ci-dessus). En revanche, dans des tumeurs comme les mélanomes, les sarcomes de Kaposi, les cancers du sein, de la vulve et certains gliomes, le récepteur ETB est surexprimé par les cellules cancéreuses [447-451]. De plus, dans les mélanomes et les cancers de la vulve, cette surexpression est fortement corrélée avec la progression tumorale et /ou la survie des patients. Ainsi, ces données démontrent que, dans certains cancers, les actions pathologiques des endothélines sont médiées par ETBR. A l'heure actuelle, la grande majorité des études visant à étudier le rôle d'ETBR dans la carcinogénèse concernent les mélanomes. Par ailleurs, il est important de noter que le récepteur ETB est parfois surexprimé, non pas sur les cellules tumorales, mais sur les cellules stromales avoisinant les tumeurs. Cette observation a été faite dans les cancers de l'ovaire et du colon [452, 453], deux types de tumeur surexprimant ETAR, mais aussi dans les cancers du sein qui surexpriment les deux sous-types d'ETRs [454]. Dans ces tumeurs, la surexpression d'ETBR est fréquemment associée à une augmentation de la densité vasculaire, ce qui suggère un rôle du récepteur ETB dans le processus d'angiogénèse tumorale. D'autre part, la surexpression sélective d'ETBR dans les vaisseaux entourant des tumeurs ovariennes a été corrélée avec une diminution de la survie des patientes et à un faible nombre de  $L_T$  l'infiltrant les tumeurs (TIL) [452]. Ce résultat, rapporté par l'équipe de Buckanovich en 2008, a permis de mettre en lumière un nouveau rôle d'ETBR dans la progression tumorale qui consiste à réduire la réponse immunitaire anticancéreuse en inhibant l'infiltration de TILs dans les tumeurs.

Pour résumer, toutes ces études démontrent que le système endothéline est dérégulé dans de nombreux cancers humains (tableau 7). Cette dérégulation est complexe, spécifique à chaque type de tumeur et peut concerner les ligands, les récepteurs et/ou les enzymes de conversion. De plus, elle n'implique pas forcément une surexpression des composants de l'axe endothéline. Ceci est particulièrement vrai pour ETBR, dont l'implication dans le processus tumoral peut être dû à une surexpression (e.g. les mélanomes) ou à une sous-expression (e.g. les carcinomes prostatiques), en fonction du type de tumeur. Enfin, il faut également souligner l'importance de l'axe endothéline dans les cellules composant le stroma tumoral et, en particulier dans l'endothélium vasculaire, où une dérégulation de l'expression et de l'activation du récepteur ETB peut favoriser l'angiogénèse tumorale et l'échappement de la tumeur au système immunitaire.

TYPE DE CANCER	ETRs	ETs / ECE	Commentaires / Références
SURRENALE - Adénomes - Phéochromocytomes	↗ ETAR, ↗ ETBR ↗ ETAR, ↗ ETBR	↗ ET-1 ↗ ET-1, ↗ ECE	↗ ET-1 associée à la sécrétion d'aldostérone [455, 456]
THYROÏDE	↗ ETAR	↗ ET-1, ↗ ECE	[457]
FOIE	↘ ETBR	↗ ET-1	↗ ET-1 plasmatique [458]
UTERUS - col - Léiomyomes - Endomètre	↗ ETAR, ↗ ETBR ↗ ETAR, ↘ ETBR	↗ ET-1, ↗ ET-2, ↘ ET-3 ↗ ECE, ↗ ET-1, ↘ NEP	[459] [460] [461]
OESOPHAGE	↘ ETBR	↗ ET-1	Corrélation avec une baisse de la survie et avec la progression tumorale; ↗ ET-1 plasmatique. [462, 463]
COLON	↗ ETAR, ↘ ETBR	↗ ET-1	Corrélation avec une baisse de la survie (ET-1) [443]; ↗ ETBR dans les vaisseaux et les CMLs du stroma tumoral [453].
VULVE	↗ ETBR > ↗ ETAR		Corrélation avec une baisse de la survie et avec la progression tumorale (ETBR) [450]
VESSIE	↗ ETAR	↗ ET-1, ↗ ECE	Corrélation avec la progression tumorale, l'apparition de métastases pulmonaires, la baisse de la survie. [446]
GLIOMES - Glioblastomes - Astrocytomes - Oligodendrogliomes	↗ ETBR ↗ ETBR > ↗ ETAR, ↗ ETBR	↗ ET-1	Résultats contradictoires [451, 464, 465]
NEUROBLASTOMES	ETBR		Corrélation avec le niveau de différenciation des cellules tumorales [466]
SEIN - Carcinomes	↗ ETBR > ↗ ETAR	↗ ET-1, ↗ ECE, ↘ ET-3	Corrélation avec l'angiogenèse, avec la résistance à la chimiothérapie (ETAR), avec une baisse de la survie (ET-3), avec la présence de métastases (ET-1). [449, 454, 467, 468]
MELANOMES	↗ ETBR	? ↗ ET-3?	Corrélation avec la progression tumorale Résultats parfois contradictoires [447]
MENINGIOMES	↗ ETAR (ARNm) ↗ ETBR (vaisseaux)	↗ ET-1	Corrélation avec la progression tumorale et avec l'angiogenèse (↗ VEGF) [469, 470]
REIN	↗ ETAR, ↗ ETBR	↗ ET-1	[471]
POUMON - NSCLC	↗ ETAR, ↘ ETBR	↗ ET-1	↗ ET-1 dans les condensats d'air expirés [472]. Résultats contradictoires pour l'expression des ETRs [473, 474]
PROSTATE	↗ ETAR, ↘ ETBR	↗ ET-1, ↘ NEP	Corrélation avec la progression tumorale ↗ ET-1 plasmatique [437, 441, 445]
OS (ostéosarcomes, métastases prostatiques)	↗ ETAR	↗ ET-1	[475, 476]
NASOPHARYNX	↗ ETAR, ↘ ETBR	↗ ET-1	Corrélation avec l'apparition de métastases ↗ ET-1 plasmatique, ↗ ET-1 dans la salive [439, 440, 444]
OVAIRE	↗ ETAR	↗ ET-1	↗ ETBR dans les vaisseaux avoisinant les tumeurs et corrélation avec la survie et la présence de TILs [452]. Corrélation avec l'angiogenèse et la synthèse de VEGF (ET-1). ↗ ET-1 dans les ascites. [442, 477]
SARCOMES DE KAPOSI	↗ ETBR > ↗ ETAR		[448]
RHABDOMYOSARCOMES	ETAR	↗ ET-3	Lignées cellulaires humaines [478]
PANCREAS	ETAR	↗ ET-1, ↗ ECE	Lignées cellulaires humaines [479, 480]
GASTRIQUE	ETAR	↗ ET-1	Lignées cellulaires humaines [481]
CHORIOCARCINOME	ETBR	ET-1	Lignées cellulaires humaines [482]

Tableau 7. Expression de l'axe endothéline dans les cancers humains.

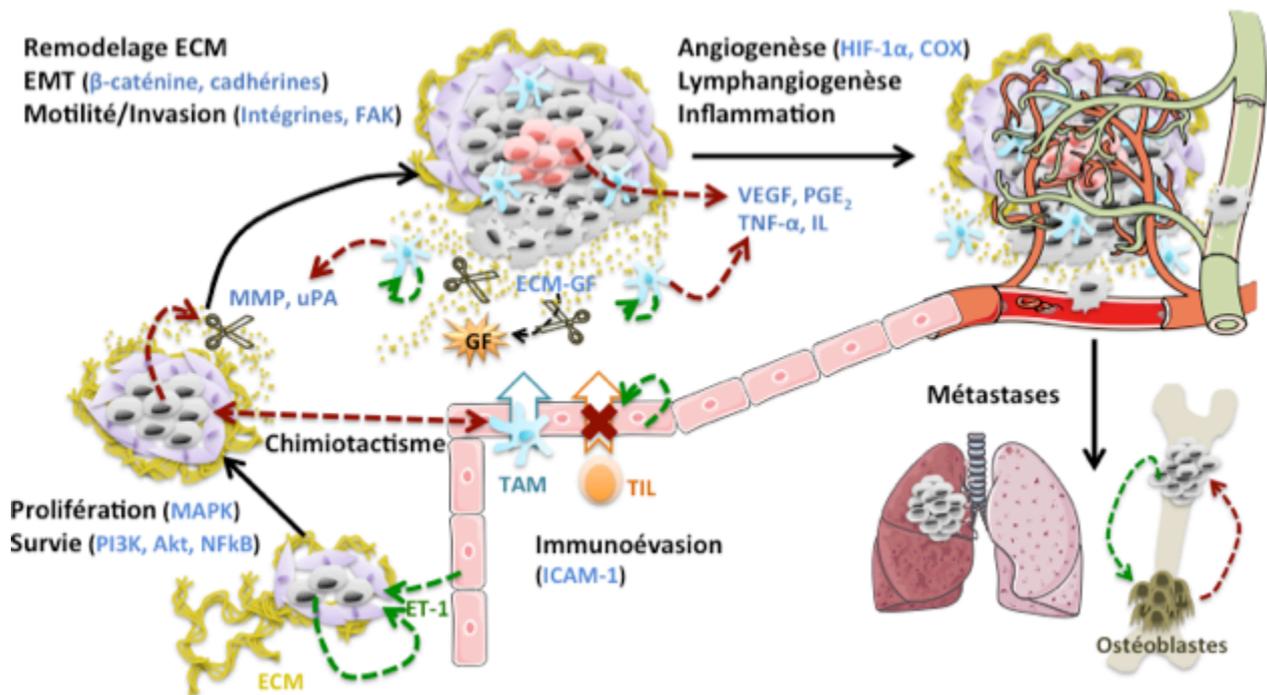
### 3.3.2. Mécanismes d'action de l'axe endothéline dans la croissance tumorale

En se fixant sur leurs récepteurs, les endothélines sont capables de déclencher de multiples processus favorisant la plupart des étapes de la progression tumorale (Figure 38). Au vu des différentes études réalisées (surtout par A. Bagnato et son équipe), il est possible de scinder les effets tumorigènes des endothélines en deux catégories : (i) les effets « directs » sur les cellules cancéreuses, incluant la prolifération, la survie, la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT),... et (ii) les effets « indirects » sur l'environnement tumoral comme l'angiogenèse, la lymphangiogenèse ou la modulation du système immunitaire. Les premiers impliquent l'activation du récepteur ETAR dans de nombreux cancers (sauf les mélanomes) alors que les seconds mettent principalement en jeu ETBR.

#### *L'axe endothéline et la prolifération cellulaire*

Les endothélines et en particulier l'ET-1 ont un effet mitogène sur de nombreuses lignées cancéreuses humaines. Cet effet est relayé par le récepteur ETA dans les cancers de la prostate, de l'ovaire, du col de l'utérus, du poumon, et du colon et par ETBR pour les mélanomes et les oligodendrogliomes [483]. Dans certaines lignées (ovaire, prostate, colon), une inhibition de la prolifération cellulaire endogène peut être obtenue en utilisant un antagoniste d'ETAR ; de plus, ces lignées sécrètent généralement de fortes quantités d'ET-1, ce qui indique une action autocrine de l'ET-1 sur la croissance cellulaire [484]. En activant les ETRs, les endothélines déclenchent un ensemble de voies de signalisation régulant la prolifération cellulaire (Figure 39), dont les principales sont les voies MAPK, IP3/calcium/PKC et PI3K [485, 486]. Par ailleurs, les effets mitogènes des endothélines peuvent également impliquer la transactivation de récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) comme l'EGFR ou le VEGFR-3. La transactivation de l'EGFR par l'ET-1 a été démontrée *in vitro* avec des lignées cancéreuses ovariennes surexprimant ETAR [487]. De même, la transactivation du VEGFR-3 par l'ET-1 ou l'ET-3 a été identifiée dans des lignées cellulaires de mélanomes via l'activation d'ETBR (ET-12 meeting, Cambridge, Sept 2011). Deux mécanismes expliquant la transactivation des RTKs ont été déterminés : soit la phosphorylation intracellulaire directe des RTKs par la protéine kinase c-Src, soit leur activation grâce à l'action de métalloprotéases permettant le relargage de facteurs de croissance associés à la matrice extracellulaire comme l'HB-EGF [488]. Ce phénomène de transactivation de l'EGFR par les ETRs (ETAR), qui à d'ailleurs été rapporté pour d'autres RCPGs avec d'autres RTK, semble avoir un rôle important dans les effets mitogéniques des endothélines. Enfin, les activités mitogènes des endothélines (parfois assez modestes) peuvent

être nettement augmentées en présence d'autres facteurs de croissance comme l'EGF, le bFGF, l'IGF ou le PDGF [489]. Ces effets prolifératifs synergiques entre les ETs et d'autres facteurs de croissance suggèrent que des multithérapies combinant des inhibiteurs d'ETRs avec des inhibiteurs de RTKs (e.g. le Géfitinib) pourraient se révéler particulièrement efficaces.



**Figure 38. Actions des endothélines sur les différentes étapes de la progression tumorale.** Les endothélines, et en particulier l'ET-1, sont capables de favoriser la plupart des phénomènes contribuant au développement des cancers, à savoir : la prolifération, la survie, l'invasivité cellulaire, le remodelage de la matrice extracellulaire (ECM), l'angiogenèse et la dissémination métastatique. Flèches vertes : production d'ET-1 ; flèches rouges : effets de l'ET-1. ECM : *extracellular matrix* ; ECM-GF : *ECM-associated growth factors* ; TAM : *Tumor associated macrophage* ; TIL : *Tumor Infiltrating Lymphocyte*.

### L'axe endothéline et la survie cellulaire

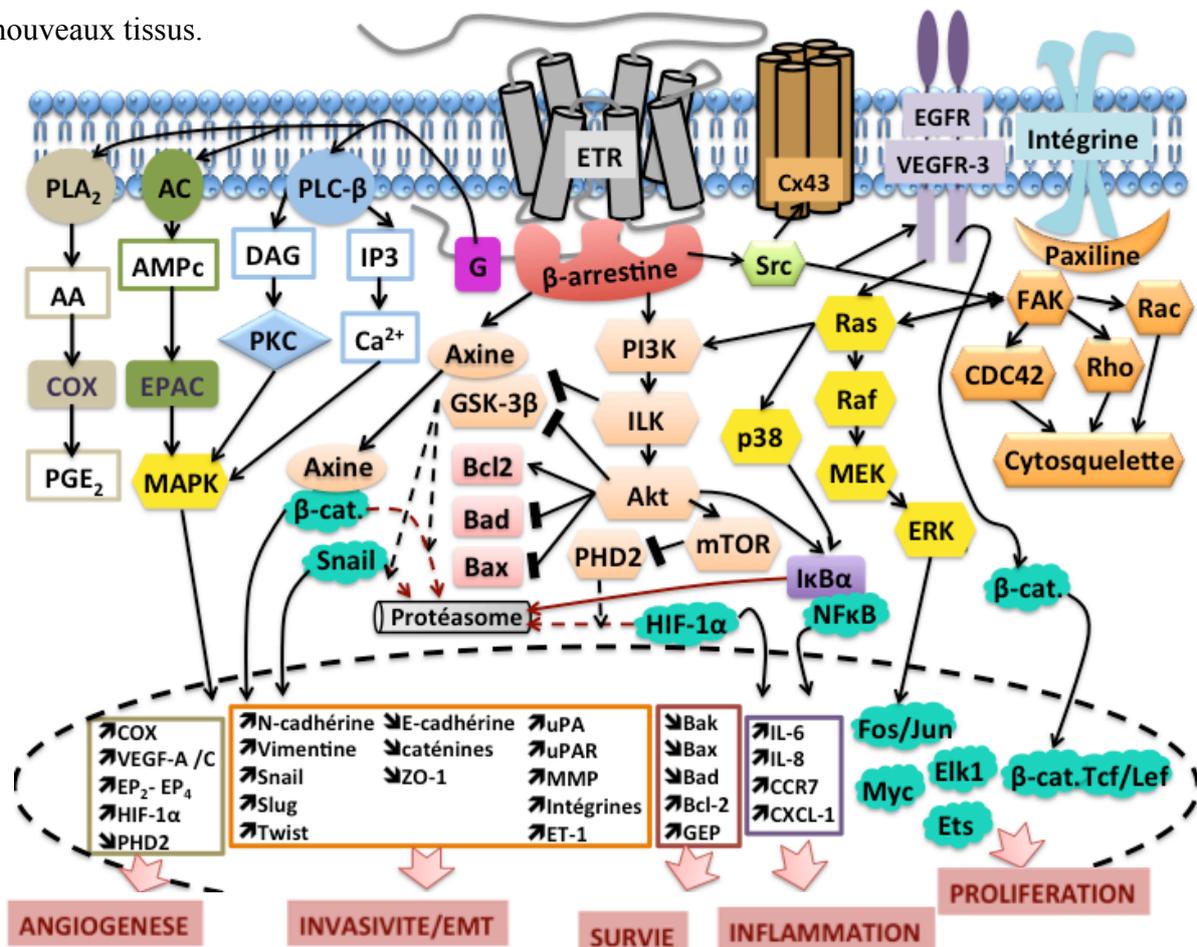
La survie, ou plus précisément la résistance à l'apoptose, est un phénomène fréquemment observé dans les cellules cancéreuses qui favorise les rechutes à la suite des traitements chimiothérapeutiques et l'émergence de résistances. De nombreuses études démontrent que l'ET-1, en plus de son action mitogène, est capable d'induire des effets antiapoptotiques dans de multiples lignées cancéreuses [490, 491]. Cette modulation de la survie cellulaire implique, entre autres, l'activation PI3K-dépendante des kinases Akt et mTOR et la stabilisation du facteur antiapoptotique Bcl-2, couplée à une diminution de la production de facteurs pro-apoptotiques comme Bad, Bax et Bak [490, 492] (Figure 39). Au niveau de lignées cellulaires cancéreuses ovariennes ou prostatiques, ces effets antiapoptotiques sont médiés par ETAR, et permettent aux cellules de résister à l'apoptose

induite par des agents chimiothérapeutiques comme le paclitaxel [490, 492]. D'autres voies de signalisation ont également été impliquées dans les effets antiapoptotiques de l'ET-1. C'est le cas de la voie de sphingosine kinase, probablement via ETBR, dans des lignées tumorales de léiomyomes utérins [493], ou d'une voie impliquant l'activation Akt dépendante de la  $\beta$ -arrestine, via la PI3K et l'ILK, dans des lignées tumorales ovariennes [494]. Par ailleurs, un effet antiapoptotique indirect de l'ET-1, par le biais de la synthèse du précurseur de la granuline et de l'épithéline (GEP), a été identifié dans les cancers de l'ovaire [495]. Enfin, il a également été démontré que l'ET-2 constitue un facteur antiapoptotique dans des cancers du sein en permettant aux cellules cancéreuses de survivre dans un environnement hypoxique grâce à l'activation d'ETBR [496].

#### *L'axe endothéline et l'invasivité cellulaire*

Pour les cellules cancéreuses, l'acquisition de caractéristiques invasives est une étape clé dans la progression tumorale. Ces caractéristiques, qui incluent la capacité à remodeler la matrice extracellulaire (ECM), l'augmentation de la motilité et la perte de la cohésion cellulaire, permettent aux cellules tumorales d'envahir les tissus sains adjacents et, dans les étapes tardives, de métastaser vers d'autres organes [497]. De multiples études *in vitro* et *in vivo* démontrent que l'axe endothéline joue un rôle important dans le développement des propriétés invasives des cellules cancéreuses, ce qui supporte les observations cliniques corrélant l'expression de l'ET-1 avec la présence de tumeurs métastatiques pour certains cancers (e.g. prostate, nasopharynx, sein) [440, 445, 498]. *In vitro*, il a été montré que l'ET-1, par l'intermédiaire d'ETAR et/ou d'ETBR, permet d'induire le relargage de protéases dégradant la matrice extracellulaire, comme les MMP (*Matrix Metalloproteinase*) et l'urokinase, ce qui favorise l'invasivité de diverses lignées cellulaires tumorales [499-501]. Ajouté à cela, l'ET-1 augmente également la transcription des ARNm codant ces enzymes ainsi que l'activation des pro-enzymes, ce qui amplifie la dégradation de l'ECM et l'invasion tumorale. Dans certains cas, cette activité protéasique est potentialisée par la présence de macrophages (TAM, *Tumor associated Macrophages*) qui sont attirés à proximité des tumeurs grâce à l'action de l'ET-2. Cet effet chimiotactique, qui a été montré dans le cas de tumeurs mammaires, est médié par l'interaction ET-2/ETBR à la surface des macrophages [502]. Par ailleurs, toujours dans le cas de lignées cellulaires cancéreuses mammaires, l'ET-1 et l'ET-2 sont capables de stimuler l'invasion des cellules tumorales par l'intermédiaire d'ETAR et d'ETBR [503]. Cette invasion implique à la fois une action chimiotactique des endothélines sur les cellules tumorales et la production de MMP (notamment la MMP-14 via

l'activation d'ETAR). De manière intéressante, le potentiel invasif des cellules tumorales est fortement amplifié en présence de macrophages et, il a été montré que les endothélines accentuent nettement la sécrétion de MMP par les macrophages, seulement lorsque ces derniers sont en co-culture avec des cellules tumorales [503]. Ces résultats indiquent qu'il existe un dialogue moléculaire complexe entre les cellules tumorales et les TAM permettant d'intensifier l'invasion des tissus sains par les cellules cancéreuses. Parallèlement à tout cela, l'ET-1 déclenche également l'activation de kinases d'adhésion focales (FAK) et la phosphorylation de la paxiline, une protéine directement en contact avec les intégrines, ce qui permet d'augmenter la motilité cellulaire (Figure 39) [485, 504]. De plus, les niveaux d'expression ainsi que la signalisation associée aux intégrines sont eux aussi amplifiés grâce à l'ET-1 [504, 505]. Ainsi, l'augmentation de la motilité cellulaire, couplée à une forte activité protéasique dégradant l'ECM, permet aux cellules tumorales de migrer et d'envahir de nouveaux tissus.



**Figure 39. Voies de signalisation déclenchées par l'axe endothéline contrôlant la progression tumorale.** De multiples voies de signalisation sont régulées par les récepteurs ETA et ETB dans les cellules tumorales. Elles favorisent la prolifération cellulaire, la résistance à l'apoptose, l'invasivité, l'angiogenèse et l'inflammation. Les flèches pointillées indiquent une action inhibée. Les flèches rouges indiquent un ciblage des protéines vers le protéasome. β-cat. : β-caténine ; Cx43 : Connexin 43 ; EP<sub>2</sub> / EP<sub>4</sub> : Prostaglandin Receptor E2 / E4 ; EPAC : Exchange Protein Activated by cAMP ; GEP : Granulin Epithelin Precursor ; GSK-3β : Glycogen Synthase Kinase 3β ; ILK : Integrin Linked Kinase ; PHD2 : Prolyl Hydroxylase 2 ; ZO-1 : Zona Occludens-1.

Les carcinomes invasifs et agressifs sont fréquemment associés avec la présence de cellules tumorales ayant perdu leurs caractéristiques épithéliales pour acquérir un phénotype mésenchymateux (i.e. proche de celui d'une cellule embryonnaire). Cette transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) implique une reprogrammation génique importante qui aboutit à la perte de la cohésion cellulaire et à une augmentation de la motilité [497]. Un des événements majeurs de l'EMT correspond à l'altération des connexions intercellulaires médiées par la E-cadhérine et les connexines. Dans des lignées cancéreuses issues de mélanomes ou de cancers ovariens, les endothélines sont capables d'induire une baisse d'expression de la E-cadhérine et des  $\beta$ -caténines tout en accroissant l'expression de protéines d'adhésion mésenchymateuses comme la N-cadhérine [504, 506]. De plus, l'ET-1 ou l'ET-3 sont également de puissants inducteurs de l'expression de la protéine MCAM (*Melanoma Cell Adhesion Molecule*) dans les mélanocytes [507]; MCAM est une protéine d'adhésion généralement absente dans les mélanocytes mais exprimée dans environ 70% des mélanomes métastatiques et corrélée avec l'agressivité des tumeurs. D'un point de vue moléculaire, les endothélines, via ETAR dans les cancers de l'ovaire, déclenchent l'inhibition de la GSK-3 $\beta$  (*Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$* ) par l'intermédiaire de la PI3K, de l'ILK (*Integrine Linked Kinase*) et de la  $\beta$ -arrestine, ce qui limite la dégradation de la  $\beta$ -caténine et du facteur de transcription Snail par le protéasome (Figure 39) [506, 508]. Ceci permet d'engager le programme transcriptionnel responsable de l'EMT avec l'inhibition de la synthèse d'E-cadhérine, l'augmentation de la production de N-cadhérine et l'activation de facteurs de transcription comme Slug ou Twist. Par ailleurs, les endothélines entraînent également le désassemblage des jonctions communicantes intercellulaires en induisant la phosphorylation de la connexine 43 par l'intermédiaire de la kinase Src [504]. Tous ces événements, responsables de l'EMT et donc de l'acquisition de caractéristiques invasives par les cellules, ont également été associés avec la capacité des cellules tumorales à résister à la chimiothérapie dans des cas de cancers ovariens [509].

#### L'axe endothéline dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse tumorale

Au delà d'une certaine taille, les tumeurs ont besoin d'être vascularisées pour continuer à croître. Pour ce faire, les cellules cancéreuses sont capables de sécréter des substances pro-angiogéniques, comme le VEGF ou la PGE<sub>2</sub>, afin de favoriser la formation de nouveaux vaisseaux irriguant la masse tumorale. La biosynthèse de facteurs angiogéniques par les cellules tumorales est régulée par diverses substances et par la présence d'un environnement hypoxique permettant la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ . L'ET-1, par le biais d'ETAR ou d'ETBR en fonction du type de tumeur, est capable d'induire

la biosynthèse de VEGF ou de PGE<sub>2</sub> par les cellules tumorales, favorisant ainsi l'angiogenèse tumorale. Dans des lignées tumorales ovariennes ou de mélanomes, il a été montré que l'activation des récepteurs ETA ou ETB par les endothélines déclenche une voie de signalisation impliquant la phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>), l'acide arachidonique et donc la production de prostaglandines par les cyclooxygénases (COX ; voir figure 39) [510, 511]. De plus, dans ces mêmes lignées, l'ET-1 permet également d'augmenter la biosynthèse et la transcription des COX-1 et 2, ce qui amplifie la production de PGE<sub>2</sub>. Parallèlement à cela, les endothélines favorisent la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ , ce qui aboutit à la biosynthèse de VEGF qui est un facteur pro-angiogénique essentiel dans le processus de néovascularisation [512]. Dans des lignées de mélanomes, la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  implique l'activation d'ETBR et d'une voie de signalisation de type PI3K/ILK/Akt/mTOR aboutissant à l'inhibition de la prolyl hydroxylase 2 (PHD2), l'enzyme responsable du ciblage d'HIF-1 $\alpha$  vers le protéasome (à la suite de l'action de l'ubiquitine ligase VHL) [513]. Ainsi, les effets de l'ET-1 sur HIF-1 $\alpha$  permettent de mimer des conditions hypoxiques en situation normoxique ou d'amplifier une hypoxie déjà présente, ce qui stimule la transcription de gènes comportant un site de fixation à HIF comme le gène codant le VEGF ou l'ET-1. Toujours dans les mélanomes, l'ET-1 provoque également la sécrétion du VEGF-C qui, à la différence du VEGF-A, est un facteur spécifique de la lymphangiogenèse (F. Spinella, ET-12 meeting, Cambridge, Sept 2011). Ce résultat indique que l'ET-1 est capable d'induire, d'une manière indirecte, le processus de lymphangiogenèse en stimulant la synthèse de VEGF-C par les cellules tumorales. De plus, l'ET-1 augmente aussi la production du récepteur spécifique au VEGF-C, le VEGFR-3, dans les mélanomes, ce qui suggère un effet autocrine du VEGF-C. Comme cela a été mentionné précédemment, le VEGFR-3 est transactivé à la suite de la fixation d'ET-1 ou d'ET-3 sur ETBR, ce qui participe à l'effet prolifératif, antiapoptotique et pro-invasif des endothélines sur les mélanomes. L'action autocrine du VEGF-C, consécutive à une stimulation par l'ET-1, permet d'amplifier tous ces phénomènes et favorise également la dédifférenciation des cellules tumorales en cellules capables de former des structures vasculaires (F. Spinella, ET-12 meeting, Cambridge, Sept 2011). Ce processus de mimétisme vasculaire, présent dans diverses tumeurs, est corrélé avec l'agressivité des cancers, la présence de métastases et un mauvais pronostic [514]. Les endothélines ont été associées à ce phénomène dans les mélanomes et les cancers ovariens.

Par ailleurs, les endothélines sont capables de stimuler directement l'angiogenèse et la lymphangiogenèse en se fixant sur les récepteurs ETB exprimés par les cellules endothéliales

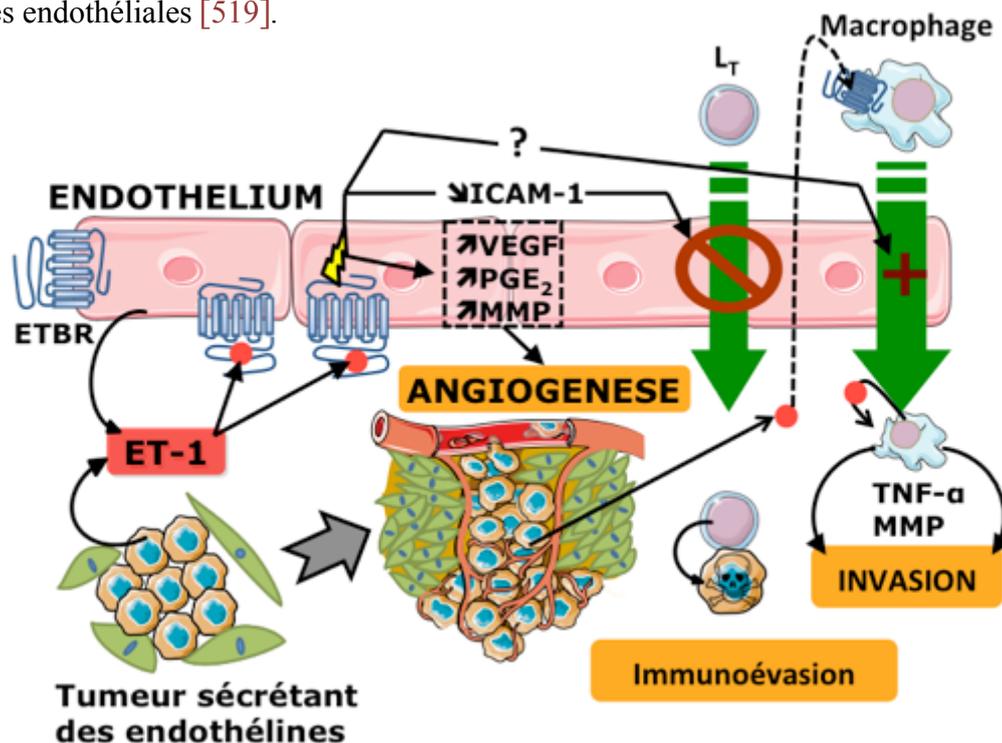
vasculaires et lymphatiques [515, 516]. Ces deux types cellulaires sécrètent de fortes quantités d'ET-1 qui peut ainsi exercer une action autocrine. *In vitro*, l'ET-1 favorise plusieurs étapes du processus de néovascularisation, incluant la prolifération, la survie et l'invasion des cellules endothéliales vasculaires, mais aussi le remodelage de l'ECM et la formation de structures capillaires par ces mêmes cellules ; des observations similaires ont été réalisées avec des cellules endothéliales lymphatiques. Il a également été montré que les endothélines (ET-1 et ET-3) déclenchent la production de VEGF-A et C par les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques, ce qui potentialise nettement les actions pro-angiogéniques et pro-lymphangiogéniques des endothélines.

Toutes ces données expérimentales concernant le rôle de l'axe endothéline dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse tumorale renforcent les observations cliniques réalisées sur des échantillons tumoraux issus de patients. En effet, l'expression de l'ET-1 est corrélée avec la densité lymphovasculaire et avec la présence de métastases distantes ou dans les ganglions lymphatiques drainants, dans différents cancers (tableau 7). Ainsi, le ciblage de l'axe endothéline, et en particulier du binôme ET-1/ ETBR, apparaît comme une stratégie pertinente pour inhiber l'angiogenèse et la lymphangiogenèse, deux processus importants pour la croissance tumorale et pour la dissémination métastatique.

#### *L'axe endothéline et la modulation du système immunitaire*

En dépit du caractère immunogène des cellules cancéreuses et de la présence d'un environnement inflammatoire, le système immunitaire est rarement efficace contre les tumeurs. Ceci est dû au fait que les cellules tumorales sont capables de manipuler le système immunitaire afin d'échapper à l'immunité anticancéreuse tout en activant un état inflammatoire pro-invasif et pro-métastatique favorisant la carcinogenèse [517]. Les endothélines, surtout par le biais du récepteur ETB, sont capables de moduler l'infiltration et/ou l'activation de certaines cellules immunitaires infiltrant les tumeurs comme les TAM ou les TIL (Figure 40). Comme mentionné précédemment, les endothélines sont des agents chimiotactiques pour les macrophages. En particulier, l'expression de l'ET-2, augmentée dans les zones hypoxiques des tumeurs mammaires, est fréquemment co-localisée avec des macrophages exprimant fortement ETBR [502]. De plus, les endothélines permettent également d'activer ces macrophages et d'induire le relargage de cytokines ou d'autres facteurs protéiques, comme le TNF- $\alpha$  [518], qui maintiennent un état inflammatoire propice au remodelage de l'ECM, à l'invasion des cellules tumorales et à leur extravasation pour coloniser d'autres organes. Par ailleurs, le récepteur ETB exprimé par le stroma tumoral s'est

révélé particulièrement important pour l'infiltration des TAM au sein de tumeurs mammaires syngéniques dans un modèle de rats déficients en ETBR [519]. En effet, il a été montré que chez ces animaux, le manque d'ETBR fonctionnel entraîne une diminution de la croissance des tumeurs mammaires ainsi qu'une baisse très importante du nombre de métastases pulmonaires. Plus précisément, ces effets inhibiteurs sur la progression tumorale ont été corrélés avec une diminution des TAMs et de la concentration en TNF- $\alpha$  sérique. Cependant, dans ce modèle, l'infiltration des TAMs ne semble pas dépendre uniquement de l'expression d'ETBR sur les macrophages et donc de l'effet chimiotactique des endothélines ; en effet, le récepteur est absent sur ces cellules lorsqu'un transgène codant ETBR est réinséré dans les animaux déficients sans pour autant empêcher la restauration d'un phénotype « sensible » aux tumeurs, caractérisé par de nombreuses métastases, la présence de TAM et la production de TNF- $\alpha$ . Les auteurs proposent donc l'intervention d'un autre type cellulaire du stroma tumoral exprimant ETBR et pouvant intervenir dans l'infiltration des macrophages, comme les cellules endothéliales [519].



**Figure 40. Rôles du récepteur ETBR exprimé par le stroma tumoral dans la carcinogenèse.** ETBR est plus fréquemment dérégulé sur les cellules stromales que sur les cellules tumorales. Au niveau de l'endothélium tumoral, la surexpression ou la suractivation d'ETBR favorise l'angiogenèse, l'infiltration de TAM qui amplifie l'invasion des cellules cancéreuses, et l'échappement des tumeurs aux lymphocytes T cytotoxiques (TIL).

Malgré, la présence d'un environnement inflammatoire, le rejet des tumeurs par des cellules immunitaires cytotoxiques est généralement peu efficace. Ce constat contradictoire s'explique par le fait que les cellules tumorales, tout en recrutant des effecteurs immunitaires

favorisant l'inflammation et l'invasivité des tumeurs (e.g. les TAM), peuvent simultanément inhiber l'infiltration et l'activation de cellules effectrices intervenant dans le rejet tumoral comme les LT (les TIL) ou les cellules NK. L'axe endothéline, et en particulier ETBR, a récemment été impliqué dans la modulation de l'infiltration des TIL au sein de tumeurs ovariennes. Buckanovich et ses collègues ont observé qu'il existe une corrélation entre la surexpression d'ETBR au niveau de l'endothélium vasculaire tumoral, une faible proportion de TIL et une baisse de la survie de patientes atteintes de carcinomes ovariens [452]. Afin d'expliquer le rôle d'ETBR dans l'infiltration lymphocytaire, des expériences *in vitro* ont été réalisées et ont démontré que l'activation d'ETBR au niveau de l'endothélium vasculaire est capable d'inhiber l'adhésion de  $L_T$  sur des cellules endothéliales, en réprimant l'expression de la protéine d'adhésion ICAM-1 par le biais d'une voie de signalisation dépendante du NO. Les mêmes résultats ont été obtenus avec des cellules endothéliales activées par du TNF- $\alpha$ , démontrant ainsi que la présence d'un environnement inflammatoire est compatible avec une faible infiltration lymphocytaire causée par l'action de l'ET-1. Par ailleurs, étant donné la surexpression d'ETBR sur l'endothélium tumoral et la forte sécrétion d'ET-1 par les cellules cancéreuses ovariennes (mais aussi par les cellules endothéliales), de puissantes boucles autocrines et paracrines, favorisant l'échappement des tumeurs ovariennes au système immunitaire, existent probablement *in vivo*. Dans ce contexte, des expériences *in vivo* de vaccination anticancéreuse ont été entreprises et ont mis en évidence l'intérêt de combiner le blocage d'ETBR avec certains protocoles de vaccination, alors que l'administration seule de chacun des traitements s'est révélée inefficace [452]. Le ralentissement de la progression tumorale, observé pour les animaux recevant les deux traitements (i.e. vaccination et blocage d'ETBR), est dû à une augmentation de l'infiltration des TIL selon le même mécanisme que celui établi grâce aux tests *in vitro*.

A la lumière de toutes ces données, le blocage du récepteur ETB, fréquemment surexprimé ou suractivé au niveau du stroma tumoral, pourrait constituer une stratégie thérapeutique bénéfique pour certains cancers.

#### L'axe endothéline dans la dissémination métastatique

Les métastases constituent une des caractéristiques classiques des tumeurs malignes. Elles reflètent le stade terminal de la maladie et sont généralement associées à une forte létalité pour les patients. Certains organes, comme le foie, les poumons et les os, sont fréquemment touchés par des métastases issues de divers types de cancers. Plusieurs études cliniques rapportent une corrélation entre l'expression de l'axe endothéline et l'apparition de

métastases. C'est le cas pour les cancers du sein, de l'ovaire, de la vessie, de la prostate et de la sphère ORL [438, 440, 446, 498]. Pour toutes ces tumeurs, l'expression de l'ET-1 est associée à la présence de métastases et donc avec une faible survie des patients. Par ailleurs, l'analyse d'échantillons issus de patients, menée parallèlement à l'étude de l'influence des endothélines sur des lignées cellulaires tumorales *in vitro*, ont permis de mettre en évidence certains mécanismes par lesquels l'axe endothéline favorise la dissémination métastatique. Parmi ces mécanismes, l'interaction des cellules tumorales avec les macrophages, au niveau de la tumeur primaire ou des sites métastatiques, semble être un évènement crucial pour l'initiation du processus métastatique. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, l'ET-1 sécrétée par les cellules tumorales permet de favoriser l'infiltration et l'activation de TAM qui sont directement associés à la présence de métastases pulmonaires issues de tumeurs mammaires. De manière intéressante, des résultats similaires ont été obtenus dans une étude récente et très complète concernant les cancers de la vessie [446]. Dans cette étude, les auteurs démontrent que le couple ET-1 / ETAR n'est pas ou peu impliqué dans la croissance des tumeurs primaires, mais plutôt dans l'initiation de métastases pulmonaires en favorisant l'interaction entre les cellules tumorales et les macrophages au niveau du site métastatique. Cette interaction implique la biosynthèse, ET-1 dépendante, de cytokines pro-inflammatoires qui assurent la colonisation du tissu pulmonaire par des macrophages, avant même que les cellules tumorales métastatiques n'aient réellement commencé à proliférer. La présence de macrophages avec les cellules tumorales permet ensuite de potentialiser la synthèse d'ET-1 et d'autres cytokines, générant ainsi un cercle vicieux en faveur de l'invasion métastatique [446]. L'importance de la signalisation médiée par ETAR est illustrée par une diminution impressionnantes du nombre de métastases lorsqu'un inhibiteur spécifique d'ETAR, le zibotentan, est administré à des animaux xéno greffés avec des cellules tumorales vésicales. Cependant, l'action du zibotentan est limitée si son administration a lieu trop tardivement après l'implantation tumorale, confirmant ainsi le fait que de l'axe endothéline, dans ce modèle, intervient dans l'initiation des métastases pulmonaires [446].

Outre les poumons, les os sont également un site métastatique fréquent pour les cellules tumorales prostatiques ou mammaires. Dans ces deux types de tumeurs, l'influence de l'axe endothéline dans la survenue des métastases osseuses a largement été étudiée et l'ET-1, par l'intermédiaire d'ETAR, favorise la formation de métastases osseuses de type ostéoblastique [520]. En fait, les cellules tumorales sécrétant de l'ET-1 stimulent la prolifération des ostéoblastes exprimant ETAR, qui en retour produisent des facteurs de

croissance et des cytokines favorisant l'invasion et la multiplication des cellules cancéreuses ainsi que la synthèse d'ET-1. Ainsi, une boucle paracrine d'autostimulation entre les cellules cancéreuses et les ostéoblastes se met en place, ce qui favorise la progression métastatique et l'apparition de complications comme des fractures ou de fortes douleurs. Dans des modèles animaux ainsi que dans des essais cliniques, l'inhibition du récepteur ETA grâce à des molécules comme l'atrasentan a montré des effets prometteurs sur l'incidence et les complications liées aux métastases osseuses issues de tumeurs prostatiques ou mammaires [520-522].

L'expression de l'ET-1 par des tumeurs mammaires a également été corrélée avec une augmentation de la présence de métastases au niveau des ganglions lymphatiques drainants [523]. Le mécanisme sous-jacent à ce phénomène pourrait impliquer le récepteur de chimiokines CCR7, qui se trouve lui aussi surexprimé chez des patientes présentant une invasion ganglionnaire. Des expériences *in vitro* ont confirmé cette hypothèse en montrant que l'ET-1, par le biais d'ETAR, est capable d'induire l'expression de CCR7 à la surface de différentes lignées tumorales issues de cancer du sein. De plus, cette surexpression de CCR7 se traduit par une amplification des actions chimiotactiques et pro-invasives des chimiokines CCL21 et CCL19, les deux ligands de CCR7, sur les lignées tumorales. CCL21 et CCL19 sont des chimiokines qui assurent normalement l'attraction des cellules immunitaires vers les organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions. Dans le cas de tumeurs surexprimant CCR7, consécutivement à l'activation de l'axe endothéline ou non, ces chimiokines favorisent donc l'invasion et la migration des cellules tumorales vers les ganglions lymphatiques drainants.

Enfin, le couple ET-1 / ETAR a également été impliqué dans formation de métastases hépatiques et péritonéales, provenant respectivement de tumeurs colorectales et ovariennes. Dans le premier cas, la concentration d'ET-1 plasmatique est significativement accrue chez les individus présentant des métastases hépatiques et l'induction de ces dernières, dans un modèle animal, est inhibée par l'administration d'un antagoniste spécifique d'ETAR [524]. Dans le second exemple, les auteurs démontrent que les tumeurs ovariennes avancées co-expriment préférentiellement ETAR avec la  $\beta$ -arrestine-1 et que cette co-expression favorise l'apparition de métastases péritonéales [508].

Pris ensemble, les différents exemples présentés ci-dessus soulignent clairement l'importance de l'axe endothéline dans le processus métastatique. Ces résultats corroborent les nombreuses études concernant l'influence de l'axe endothéline dans l'invasivité cellulaire,

l'angiogenèse, la lymphangiogenèse, et indiquent que l'axe endothéline, plutôt que d'agir sur la croissance tumorale, semble surtout avoir un rôle dans le développement des métastases.

#### *L'axe endothéline et la douleur liée au cancer*

L'étiologie de la douleur liée au cancer est multiple. Elle peut résulter de l'invasion de tissus sains ou d'organes, de la compression ou de la destruction de fibres nerveuses par la tumeur, ou bien du relargage de médiateurs nociceptifs par les cellules tumorales. L'ET-1, qui est sécrétée par de nombreuses tumeurs a récemment été impliquée dans la douleur associée au cancer, en particulier dans le cas de métastases osseuses, qui constituent une des causes majeures de douleurs sévères et persistantes [525]. Chez des individus atteints de cancers de la prostate métastatiques, l'atrasentan, un inhibiteur sélectif d'ETAR, a permis d'atténuer les douleurs et de diminuer les doses d'analgésiques pour 30% des patients [526]. De même, dans des modèles animaux de métastases osseuses impliquant des cellules tumorales sécrétrices d'ET-1, ce même inhibiteur a permis de réduire significativement les manifestations douloureuses ainsi que l'expression de marqueurs moléculaires nociceptifs dans les fibres nerveuses chez les animaux traités [525]. Au contraire, le traitement des animaux avec un inhibiteur spécifique d'ETBR a produit l'effet inverse et potentialisé la douleur. Les rôles opposés des récepteurs ETA et ETB dans la modulation de la douleur liée aux cancers ont également été identifiés dans d'autres études, avec d'autres tumeurs [527, 528]. L'action nociceptive de l'ET-1 a été attribuée à la stimulation d'ETAR exprimé par les fibres nerveuses, alors que les effets analgésiques, observés avec des agonistes spécifiques d'ETBR, sont médiés par le relargage de substances opioïdes. Tous ces résultats indiquent que l'utilisation de modulateurs des ETRs, des antagonistes pour ETAR ou des agonistes pour ETBR, pourrait être une nouvelle stratégie pour traiter la douleur causée par les cancers.

#### *3.4. L'axe endothéline comme cible pour les thérapies anticancéreuses*

Seulement quelques années après la découverte des endothélines, des inhibiteurs, sélectifs ou mixtes, des ETRs ont été développés. Ces inhibiteurs, d'abord peptidiques, comme le BQ123 et le BQ788, ont constitué des outils précieux afin de déterminer l'influence et les mécanismes d'action des endothélines dans diverses pathologies cardiovasculaires. Très rapidement, d'autres inhibiteurs chimiques, plus adaptés à une utilisation clinique, ont vu le jour et ont été évalués dans de multiples essais cliniques chez l'homme [529]. Cet ensemble d'inhibiteurs, initialement développés pour traiter des pathologies cardiovasculaires, a également permis de démontrer la pertinence du ciblage des ETRs comme stratégie

thérapeutique contre les cancers. D'ailleurs certains antagonistes des ETRs sont actuellement testés dans des protocoles cliniques en oncologie. Outre les récepteurs, les enzymes de conversion, fréquemment surexprimées dans les cancers, sont également apparues comme des cibles thérapeutiques potentiellement intéressantes pour les thérapies antitumorales. Néanmoins, la présence de multiples isoformes d'ECE et de voies alternatives de production des endothélines a pour le moment limité l'utilisation clinique d'inhibiteurs ciblant les ECE [530, 531]. Ainsi, les paragraphes qui suivent se focalisent principalement sur les molécules pharmacologiques ciblant les ETRs ayant montré une activité thérapeutique anticancéreuse dans des études précliniques ou cliniques.

### **3.4.1. Les modulateurs pharmacologiques des ETRs et leur impact sur la progression tumorale**

De multiples modulateurs chimiques ou peptidiques ciblant les ETRs ont été produits depuis la découverte de l'axe endothéline. Des agonistes ou antagonistes peptidiques (sélectifs ou mixtes) comme le BQ123 (un antagoniste d'ETAR), le BQ788 (un antagoniste d'ETBR) ou l'IRL-1620 (un agoniste d'ETBR), ont largement été utilisés en recherche [532-534]. Ils ont permis de disséquer les voies de signalisation déclenchées par les ETRs et de donner les premières preuves de l'implication des ETRs dans diverses pathologies dont les cancers. A titre d'exemple, le BQ123 a permis de mettre en évidence les rôles prolifératifs, antiapoptotiques et pro-invasifs du couple ET-1/ETAR dans les cancers ovariens et prostatiques entre autres. Le BQ788, quant à lui, a permis de démontrer les multiples actions pro-tumorigènes d'ETBR dans les mélanomes et au niveau du stroma tumoral de tumeurs ovariennes ou mammaires. Au niveau préclinique, ces deux antagonistes sélectifs se sont révélés efficaces dans des multiples modèles animaux, entraînant un ralentissement de la croissance de diverses tumeurs [520, 524, 535]. Cependant, leurs coûts de développement élevés ainsi que leur sensibilité à la dégradation enzymatique une fois injectés chez l'hôte, ont grandement limité leur utilisation clinique.

Par conséquent, des modulateurs chimiques non peptidiques ont été conçus afin d'une part, de valider les résultats précliniques prometteurs obtenus avec antagonistes peptidiques, et d'autre part, de disposer d'agents utilisables en clinique. A l'heure actuelle, la majorité des études précliniques ont été réalisées avec trois molécules : deux antagonistes sélectifs d'ETAR, l'atrasentan (ABT-627) et le zibotentan (ZD-4054) et un inhibiteur mixte, le bosentan. Les premiers ont montré une efficacité importante sur diverses tumeurs surexprimant ETAR, comme les tumeurs ovariennes, prostatiques et nasopharyngiales, avec

parfois une inhibition de plus de 60 % du volume tumoral [536-538]. De plus, la combinaison de ces antagonistes avec d'autres molécules utilisées en chimiothérapie comme les taxanes, les sels de platine ou le géfitinib, a montré des effets antitumoraux synergiques dans le cas de carcinomes ovariens ou prostatiques [537, 539-543]. D'autres bithérapies, associant l'atrasentan avec le trastuzumab ou le zibotentan avec des inhibiteurs endocriniens, ont démontré leur pertinence pour la thérapie de cancers mammaires [544, 545]. Le bosentan, quant à lui, a principalement été utilisé lors d'études *in vitro*, et a montré un effet antiprolifératif et pro-apoptotique sur des cellules issues de mélanomes ou de gliomes [546, 464]. Les études *in vivo* impliquant le blocage d'ETBR ont plutôt été réalisées avec d'autres molécules (antagonisant sélectivement ETBR), comme le BQ788 ou le A-192621, qui ont nettement validé l'impact d'ETBR sur la croissance tumorale des mélanomes ou des sarcomes de Kaposi [448, 535], mais aussi sur les phénomènes d'angiogenèse, de lymphangiogenèse et d'immunoévasion [452, 515, 516]. Par ailleurs, d'autres inhibiteurs, comme le YM598, le LU-302146 ou le LU-302872 ont été utilisés ponctuellement lors d'études précliniques et ont permis de mettre en évidence le rôle d'ETAR dans d'autres cancers comme les tumeurs gastriques, pancréatiques ou hépatiques [481, 547, 548].

Enfin, une stratégie opposée à celles présentées ci-dessus, et basée sur l'utilisation d'un agoniste du récepteur ETB comme adjuvant à des agents chimiothérapeutiques, a montré des effets thérapeutiques prometteurs. Cette approche repose sur le fait que les vaisseaux irriguant les tumeurs possèdent une sensibilité accrue aux molécules ciblant ETBR. En effet, il a été montré que l'injection d'agonistes spécifiques d'ETBR, comme l'IRL-1620, déclenche une vasodilatation et donc une élévation de la perfusion, transitoirement et spécifiquement au niveau de la masse tumorale [549, 550]. Par conséquent, l'administration d'IRL-1620, environ 15 minutes avant l'injection de divers composés chimiothérapeutiques (paclitaxel, doxorubicine, cisplatine, 5-FU), permet d'augmenter fortement la distribution intratumorale de ces molécules, ce qui améliore significativement leur efficacité anticancéreuse. De manière intéressante, ce phénomène semble applicable à de nombreuses tumeurs puisque l'effet adjuvant de l'IRL-1620 a été observé dans divers modèles animaux présentant, entre autres, des tumeurs mammaires et prostatiques [551-553]. Cependant, certaines études décrivent des effets inverses de l'IRL-1620 sur l'endothélium vasculaire irriguant des fibrosarcomes ou des carcinosarcomes, ce qui suggère que le rôle d'ETBR dans le tonus vasculaire tumoral peut varier en fonction du type de cancer [554, 555]. Quoiqu'il en soit, une étude de phase I utilisant l'IRL-1620 (ou SPI-1620) en combinaison avec du docetaxel chez des individus

atteints de divers types de carcinomes, a été réalisée et a montré la bonne tolérance du traitement ainsi que des effets antitumoraux encourageants chez certains patients (A. Tolcher, ET-12 meeting, Cambridge, Sept 2011).

### **3.4.2. Essais cliniques impliquant des molécules ciblant les ETRs pour la thérapie des cancers**

Compte tenu des nombreux résultats positifs observés dans les modèles précliniques, certains antagonistes des ETRs sont entrés en phase clinique pour une indication thérapeutique en oncologie. Par ailleurs, pour bon nombre d'entre eux, des phases II ont été initiées très rapidement car les études de tolérance chez des volontaires sains avaient déjà été réalisées dans le cadre d'essais cliniques concernant des pathologies cardiovasculaires.

De manière globale, la tolérance des inhibiteurs sélectifs ou mixtes des ETRs comme l'atrasentan, le zibotentan ou le bosentan, est acceptable [529]. Néanmoins, les effets indésirables sont fréquents et incluent classiquement des maux de tête, des oedèmes périphériques, des nausées et des écoulements nasaux. Aux fortes doses, une toxicité hépatique (réversible à l'arrêt du traitement) peut apparaître, ce qui a conduit à la mise en place de tests systématiques de la fonction hépatique chez les patients sous traitement. D'autre part, certaines classes d'antagonistes des ETRs sont des inducteurs ou des inhibiteurs de cytochromes P450, ce qui indique que des interactions médicamenteuses sont à envisager. Enfin, les antagonistes des ETRs sont formellement contre-indiqués chez les femmes enceintes à cause de leurs effets tératogènes.

Comme le montre le tableau 8, la majorité des essais cliniques évaluant des modulateurs des ETRs dans le cadre de pathologies cancéreuses, impliquent l'atrasentan, le zibotentan et le bosentan. Les deux premiers ont été testés principalement sur des hommes possédant des tumeurs prostatiques, au cours de phase II et III, mais aussi chez des individus porteurs de tumeurs rénales, pulmonaires ou de gliomes. Seules les phases II concernant les cancers prostatiques ont donné lieu à des résultats positifs, caractérisés par une augmentation significative du temps sans progression de la maladie ou de la survie globale des patients traités avec l'atrasentan ou le zibotentan [556, 557]. Fort de ces conclusions, des phases III ont été entreprises (et certaines sont encore en cours) mais malheureusement, aucun des deux composés n'a, pour le moment, montré de bénéfice par rapport au placebo en se basant sur des critères comme le temps sans progression de la maladie, la moyenne de survie sans progression ou la moyenne de survie globale [558]. Des résultats mitigés ont également été obtenus avec le bosentan. En effet, un bénéfice thérapeutique prometteur a été obtenu lors

d'une phase II non contrôlée avec des patients atteints de mélanomes métastatique de stade IV [559], sans pouvoir se confirmer au cours d'une seconde phase II, contrôlée, « randomisée », et réalisée en double aveugle [560]. Ces résultats contradictoires et l'échec des phases III concernant l'atrasentan et le zibotentan, soulignent l'importance de la conception des études cliniques dans la réussite ou l'échec de ces mêmes études. En particulier, le choix de paramètres d'analyse principaux et secondaires appropriés et permettant de démontrer sans ambiguïté le bénéfice ou l'inefficacité d'un agent anticancéreux reste encore un sujet à controverse. Par ailleurs, la sélection des participants à l'aide de critères d'inclusion et d'exclusion adaptés, ainsi que la durée de l'essai, sont également des éléments cruciaux pour la réussite d'une étude clinique. Ainsi, tous ces biais potentiels, couplés à une activité thérapeutique relativement modeste des inhibiteurs des ETRs, peuvent peut-être expliquer les résultats variables et globalement décevants qui ont été obtenus jusqu'à présent. Le développement d'antagonistes plus puissants ou d'agents thérapeutiques agissant par d'autres modes d'action comme les anticorps, pourrait éventuellement permettre d'obtenir des résultats cliniques positifs et sans ambiguïté.

ESSAIS CLINIQUES	TUMEURS	PATIENTS	TRAITEMENTS	RESULTATS
<b>PHASE I</b>				
Tolcher (2011)	Divers	n= 30	SPI-1620	Bonne tolérance
<b>PHASE II</b>				
Carducci (2003)	HRPC	n= 288	Atrasentan	Amélioration du TTP
Manola (2007)	RC	n= 94	Atrasentan	Aucun bénéfice (TTP)
Phuphanich (2008)	Gliome	n= 25	Atrasentan	2 réponses partielles
Michaelson (2006)	mPC	n= 44	Atrasentan + Z.acid	Aucun bénéfice de l'association
Chiappori (2008)	NSCLC	n= 44	Atrasentan + Chimioth.	Aucun bénéfice de l'association
Armstrong (2008)	mHRPC	n= 31	Atrasentan + Chimioth.	Aucun bénéfice de l'association
<b>Kefford (2007)</b>	<b>MM</b>	<b>n= 35</b>	<b>Bosentan</b>	<b>Stabilisation du cancer pour 5 patients</b>
<b>Kefford (2010)</b>	<b>MM</b>	<b>n= 80</b>	<b>Bosentan + Chimioth.</b>	<b>Aucun bénéfice de l'association</b>
James (2010)	mHRPC	n= 312	Zibotentan	Pas d'effet sur le TTP, ↗ survie globale
Trump (2010)	mPC	n= 31	Zibotentan + Chimioth.	Bénéfice de l'association
<b>Lahav (2011)</b>	<b>MM</b>	<b>n≈ 10</b>	<b>BQ788</b>	<b>A venir</b>
<b>PHASE III</b>				
Carducci (2007)	mHRPC	n= 809	Atrasentan	Aucun bénéfice (TTP)
Nelson (2008)	HRPC	n= 941	Atrasentan	Aucun bénéfice (TTP)
ENTHUSE M1	mHRPC	n= 848	Zibotentan	Aucun bénéfice (OS)
ENTHUSE M0	HRPC	n= 2496	Zibotentan	Aucun bénéfice (OS)
ENTHUSE M1c	mHRPC	n= 1445	Zibotentan + Chimioth	A venir

**Tableau 8. Molécules ciblant les ETRs utilisées en phase clinique pour le traitement des cancers.** TTP : *Time to Progression* ; OS : *Overall Survival* ; HRPC : *Hormone Refractory Prostate cancer* ; RC : *Renal Carcinoma* ; mPC : *metastatic Prostate Carcinoma* ; NSCLC : *Non small Cell Lung cancer* ; MM : *Metastatic Melanoma* ; Z. acid : *Zoledronic acid*. Les lignes écrites en rouge indiquent une implication d'ETBR.

### **3.4.3. Les anticorps ciblant le système endothéline et leurs applications en cancérologie**

Parmi les membres de l'axe endothéline, seuls les ligands et les récepteurs apparaissent comme des cibles thérapeutiques accessibles et pertinentes pour des anticorps (même si des ECE peuvent se localiser à la membrane plasmique). Commercialement, de multiples anticorps polyclonaux ou monoclonaux anti-endothéline ou anti-ETRs sont disponibles. Néanmoins, le nombre d'anticorps monoclonaux capables de reconnaître les ETRs dans leur contexte membranaire est très limité, soulignant ainsi le défi technique lié à la production d'anticorps anti-RCPGs capables de lier la structure native de ces récepteurs. Dans la littérature, peu de publications rapportent l'utilisation ou la production d'anticorps anti-endothéline ou anti-ETR dans un but thérapeutique. A ma connaissance, il n'existe que deux publications décrivant l'utilisation thérapeutique d'anticorps ciblant les ETRs. La première relate l'obtention et l'utilisation de CovXbodies (anticorps fusionnés avec un peptide ou un pharmacophore) antagonistes d'ETAR capables d'inhiber la croissance de tumeurs prostatiques *in vivo* [561]. La seconde présente la caractérisation d'un ADC ciblant ETBR et son utilisation thérapeutique sur des souris xénotreffées avec des mélanomes [331]. Ces deux publications récentes, de 2007 et 2011, soulignent l'intérêt de développer des anticorps anti-ETRs dans le but de traiter les cancers, renforçant ainsi la pertinence du projet de thèse exposé ci-après.

## II. OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

Les RCPGs constituent la plus importante famille de récepteurs membranaires, ciblés par plus de 30% des médicaments sur le marché et impliqués dans la plupart des processus physiopathologiques, dont le développement tumoral [314, 327]. Malgré cela, aucun anticorps monoclonal thérapeutique approuvé actuellement ne cible un RCPG, révélant ainsi le défi technique lié au développement d'anticorps pharmacologiques ciblant les RCPGs.

Dans ce contexte, le projet de thèse propose la production et la caractérisation d'anticorps monoclonaux contre des RCPGs, les ETRs, qui sont fortement impliqués dans la genèse de diverses pathologies dont les cancers. Le projet s'est axé sur le récepteur ETB à cause de son implication fréquente dans la progression tumorale, résultant non seulement de sa surexpression sur les cellules cancéreuses (e.g. les mélanomes) [447, 331], mais aussi de sa dérégulation sur les cellules du stroma tumoral par le biais desquelles il favorise l'angiogenèse [516], le remodelage de l'ECM [503] et l'échappement au système immunitaire [452]. Les anticorps monoclonaux anti-ETBR produits seront évalués en fonction de leur « potentiel pharmacologique » mais pourront également constituer des outils uniques pour étudier les aspects structuraux et fonctionnels des ETRs dans des conditions physiologiques et/ou pathologiques.

Dans un premier temps, il a fallu mettre en place des outils cellulaires surexprimant les récepteurs des endothélines. Ces cellules sont nécessaires pour le processus d'immunisation, pour le criblage des anticorps monoclonaux et pour leur caractérisation.

Dans un second temps, des campagnes d'immunisation ont été réalisées afin de produire des anticorps polyclonaux puis monoclonaux ciblant spécifiquement le récepteur ETB. La sélection des anticorps monoclonaux spécifiques a nécessité la mise au point d'un test de criblage sur cellules vivantes, favorisant l'obtention d'anticorps reconnaissant la conformation native du récepteur.

Enfin, les anticorps polyclonaux et monoclonaux ont été caractérisés en fonction de leurs spécificités, de leurs réactions croisées, de leurs affinités et de leurs propriétés pharmacologiques vis à vis d'ETBR, à la fois sur des cellules transfectées et sur des cellules tumorales.

### III. RESULTATS et DISCUSSION

#### 1. Mise en place et validation des outils cellulaires

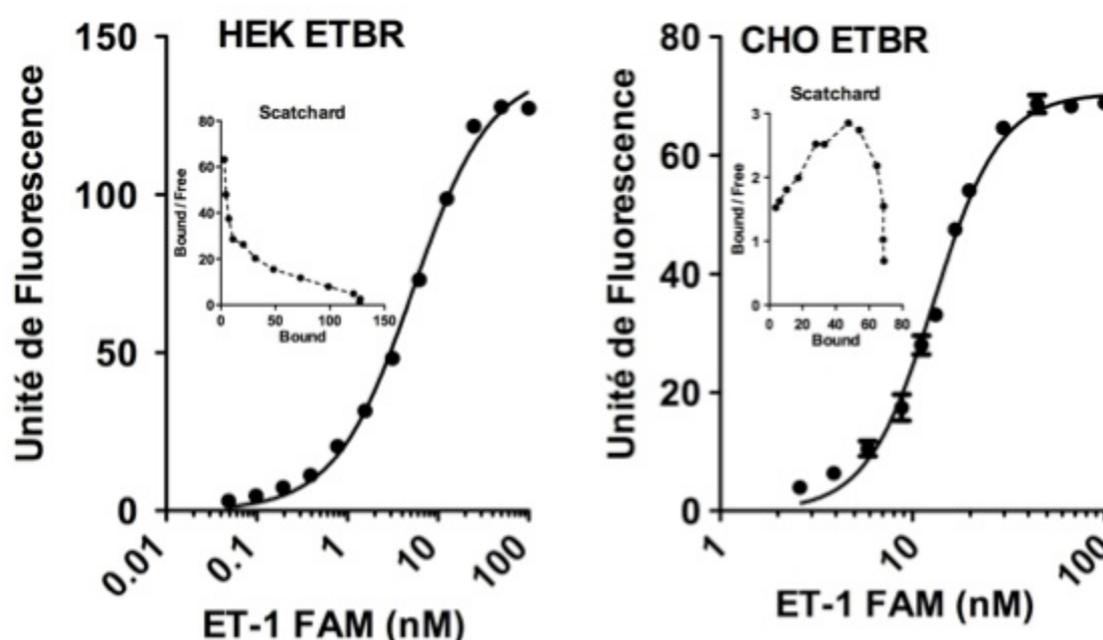
Le but du projet de thèse est de développer des anticorps ciblant spécifiquement le récepteur ETB dans son contexte membranaire, une propriété indispensable pour espérer obtenir de potentiels effets pharmacologiques. Afin de favoriser l'obtention de tels anticorps, il est nécessaire d'avoir à disposition une source de récepteur ETB dans sa conformation native qui sera utilisée pour les étapes d'immunisation, de criblage et de caractérisation des futurs anticorps. Nous avons opté pour le développement de lignées cellulaires stables surexprimant à leur surface le récepteur ETB. La génération de lignées stables surexprimant de fortes quantités de récepteurs peut se révéler difficile et leur utilisation dans des processus d'immunisation et de criblage implique un lourd travail de culture cellulaire. Néanmoins, cette stratégie permet de disposer du récepteur ETB dans une conformation optimale, physiologique, et évite les étapes fastidieuses et aléatoires de purification et de renaturation liées à la production recombinante de récepteurs membranaires [562].

Ainsi, deux lignées stables surexprimant à leur surface le récepteur ETB ont été générées, à partir de cellules CHO (CHO-ETBR) et HEK (HEK-ETBR). Ces lignées ont fait l'objet d'une caractérisation pour valider la présence de récepteurs ETB membranaires fonctionnels.

##### *1.1. Liaison des endothélines sur les lignées surexprimant ETBR*

Des expériences de liaison des différents ligands et inhibiteurs du récepteur ETB ont été réalisées sur les deux lignées stables afin de vérifier la présence de récepteurs fonctionnels. Toutes les expériences ont été analysées par cytométrie en flux sur cellules intactes afin de favoriser l'étude du récepteur dans sa conformation native. Dans un premier temps, nous avons déterminé l'affinité de l'ET-1 pour ETBR grâce à des expériences de saturation à l'équilibre. Pour ce faire, des concentrations croissantes d'ET-1 couplée à de la fluorescéine (ET-1 FAM) ont été incubées 24 h à 4°C avec des CHO ou des HEK-ETBR. Comme le montre la figure 41, la liaison de l'ET-1 FAM sur les lignées stables est saturable et une constante de dissociation ( $K_D$ ) autour de 10 nM peut être calculée pour les deux lignées. La détermination des paramètres de liaison ( $K_D$ ,  $B_{MAX}$ , h) réalisée grâce à l'équation de Hill, permet de mettre en évidence une interaction complexe entre l'ET-1 et ETBR, caractérisée par une représentation de Scatchard non linéaire et un coefficient de Hill (h)

proche de 2 pour les CHO-ETBR. On remarquera également que le signal correspondant à la saturation maximum ( $B_{MAX}$ ), plus fort pour les HEK-ETBR, indique un nombre de récepteurs plus important à la surface de ces cellules. Le nombre de récepteurs par cellule s'est révélé variable en fonction des conditions de culture et du nombre de passage des cellules, allant de  $7 \times 10^5$  à  $5 \times 10^6$  récepteurs par cellule, environ. Dans un second temps, des expériences de compétition avec différents ligands non marqués (ET-1, ET-2, ET-3, S6c) ont été réalisées (Figure 42). Ceci nous a permis de vérifier la non sélectivité du récepteur ETB vis à vis des endothélines (contrairement au récepteur ETA qui lie moins bien l'ET-3) ainsi que la fixation de la sarafotoxine 6c, un agoniste spécifique d'ETBR. La fonctionnalité d'ETBR a également été validée grâce à des inhibiteurs spécifiques d'ETBR (BQ-788) ou d'ETAR (FR139317).



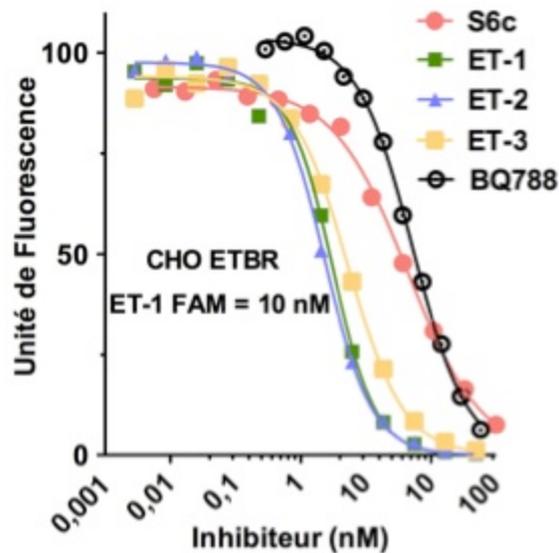
	$K_D$	$B_{MAX}$	$h$
CHO ETBR (n = 13)	$11 \pm 10$	$66 \pm 40$	$1,7 \pm 0,3$
HEK ETBR (n = 4)	$13 \pm 7$	$140 \pm 76$	$1,4 \pm 0,4$

**Figure 41. Saturation de la liaison à l'équilibre de l'ET-1 FAM sur ETBR à la surface de cellules CHO ou HEK transfectées.** La moyenne de l'intensité de fluorescence (MFI) est mesurée par cytométrie en flux. Les valeurs présentées dans le tableau correspondent à la moyenne  $\pm$  s.d, calculée grâce au logiciel GraphPad Prism en utilisant l'équation de Hill.

Ces résultats démontrent la fonctionnalité, en terme de liaison, des récepteurs ETB à la surface des lignées stables établies. Les récepteurs ETB présentent bien les caractéristiques classiques énoncées dans la littérature, à savoir une liaison équivalente pour les trois endothélines [563], une sélectivité pour la sarafotoxine 6c [564] et une sensibilité à l'antagoniste peptidique spécifique BQ788 [533]. De façon intéressante, les expériences de saturation suggèrent une fixation non conventionnelle de l'ET-1-FAM sur ETBR (différente d'un modèle classique d'interaction monovalente). En effet, le coefficient de Hill proche de 2, ainsi que l'aspect concave de la représentation de Scatchard, dans le cas des CHO ETBR indique une coopérativité positive [565] qui pourrait être due à la présence de récepteurs ETB multimériques à la surface de ces cellules [566]. La multimérisation des RCPGs est un concept relativement nouveau et des études récentes ont démontré que le récepteur ETB pouvait former des homodimères ou des hétérodimères avec ETAR [567, 568]. Concernant les HEK ETBR, la situation est différente : le coefficient de Hill n'est pas significativement différent de 1. Néanmoins, la représentation de Scatchard n'est pas linéaire et semble scindée en deux parties, ce qui pourrait indiquer la présence de deux types de site de liaison : un site de haute et un site de basse affinité. La présence de récepteurs ETB présentant un site de « super haute » affinité a été rapportée par l'équipe de M. Sokolovsky [569].

### *1.2. Caractérisation pharmacologique des lignées surexprimant ETBR*

Après les expériences de liaison, les lignées stables surexprimant ETBR ont été évaluées d'un point de vue pharmacologique. L'activation du récepteur ETB à la surface des lignées par l'ET-1 a été vérifiée en mesurant le relargage de calcium intracellulaire. Comme le montre la figure 43, l'ajout de 100 nM d'ET-1, d'ET-2, d'ET-3 ou de S6c stimule la libération de calcium intracellulaire. Cette stimulation est totalement inhibée si les cellules sont préincubées avec un excès de BQ788. Aucune inhibition n'est observée avec l'ajout de FR139317, un inhibiteur spécifique d'ETAR [570]. La stimulation de la voie de signalisation calcique est dose dépendante avec un EC50 de  $0.62 \pm 0.24$  nM pour l'ET-1 et  $0.73 \pm 0.15$  nM pour la S6c (Figure 44).



	CHO ETBR	HEK ETBR
	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (nM)
ET-1	3,6 ± 1,1	4,6 ± 1,1
ET-2	2,3 ± 0,5	3,1 ± 1,1
ET-3	7,6 ± 2,2	7 ± 1,2
S6c	47 ± 4	52 ± 1,2
BQ788	63 ± 15	61 ± 7

Figure 42. Compétition de la liaison de l'ET-1 FAM. Les IC<sub>50</sub> ± s.d présentées dans le tableau sont calculées par le logiciel GraphPad Prism et sont représentatives de trois expériences indépendantes.

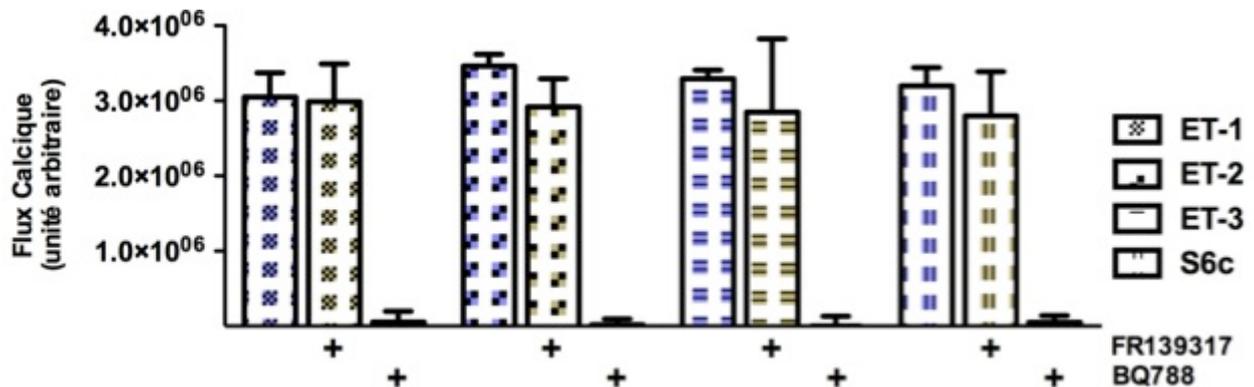


Figure 43. Stimulation de la voie de signalisation IP3-calcium avec les endothélines. Des cellules CHO-ETBR sont stimulées avec 100 nM d'ET-1, 2, 3 ou S6c, en présence ou non de 500 nM de différents inhibiteurs : FR139317 ou BQ788. Le FR139317 est un inhibiteur spécifique du récepteur ETA alors que le BQ788 est spécifique d'ETBR (K<sub>i</sub> de l'ordre du nanomolaire pour ces deux molécules).

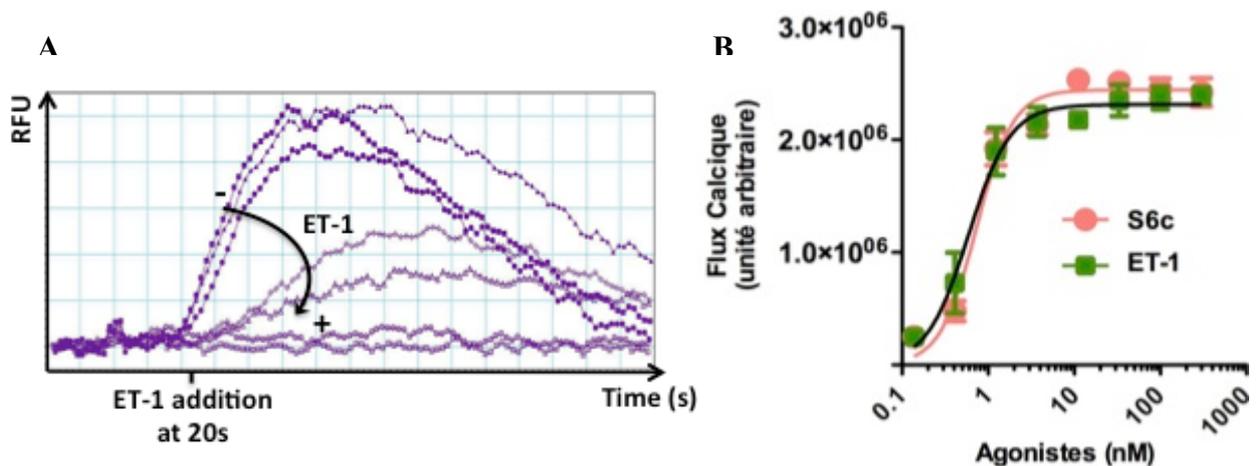


Figure 44. Stimulation de la voie de signalisation IP3-calcium par l'ET-1 et la S6c. (A) données brutes, obtenues lors de la mesure des variations de flux calciques en temps réel. (B) courbes dose-réponse correspondant à l'aire sous les courbes présentées en (A) en fonction de la concentration en agoniste du récepteur ETB.

## 2. Production et caractérisation d'anticorps polyclonaux anti-ETBR

### 2.1. Une approche par immunisation génique

L'immunisation génique est une méthode qui a émergé au début des années 90 à la suite de plusieurs études démontrant la possibilité de transférer et d'exprimer des gènes étrangers *in vivo*, simplement en injectant un plasmide contenant l'information génétique d'intérêt [571, 572]. D. Tang et ses collègues furent les premiers à montrer que l'introduction chez la souris d'un plasmide codant pour l'hormone de croissance humaine était capable de déclencher une réponse immunitaire humorale contre la protéine étrangère [573]. Dès lors, de nombreuses études ont été réalisées et ont démontré l'intérêt de la méthode d'immunisation génique pour stimuler des réponses immunitaires humorales et cellulaires contre des pathogènes ou des cellules tumorales [323]. Les mécanismes moléculaires expliquant le fonctionnement de l'immunisation génique sont peu connus. D'après le modèle présenté dans la figure 45, l'injection *in vivo* du matériel génétique permet la transfection de différentes cellules présentes dans le tissu ciblé : myocytes, kératinocytes, cellules présentatrices de l'antigène professionnelles (CPA). Après transfection, ces cellules vont être capables de produire l'immunogène et de le présenter au système immunitaire via les molécules du CMH de classe 1 et/ou 2. La transfection directe des cellules par l'immunogène permet une présentation via le CMH I (Figure 45, étapes 1 et 1'). Les CPA peuvent présenter l'immunogène via le CMH I ou II en fonction de la forme moléculaire de l'immunogène (soluble, associé à une cellule ou à des débris cellulaires, complexe immun) puis migrer vers le ganglion lymphatique drainant pour activer des lymphocytes T naïfs et déclencher une réponse cellulaire (étape 2 et 3). Concernant le déclenchement d'une réponse humorale, on imagine aisément le mécanisme dans le cas d'un antigène produit et sécrété par les cellules transfectées, accessibles aux lymphocytes B. Par contre, dans le cas d'un antigène membranaire, les étapes conduisant à l'activation des lymphocytes B spécifiques de l'antigène sont peu connues (mécanisme putatif, voir étape 4).

Outre son intérêt dans des protocoles de vaccination ou de thérapie génique, la méthode d'immunisation génique s'est également révélée très utile pour générer des anticorps polyclonaux et monoclonaux contre des cibles difficiles à manipuler comme des récepteurs membranaires [324-326, 574-577]. En effet, l'immunisation génique évite la biosynthèse *in vitro* de l'immunogène (production particulièrement difficile pour les protéines

membranaires) et favorise l'obtention d'anticorps reconnaissant la forme native de la protéine cible. Cette stratégie d'immunisation est donc particulièrement appropriée pour produire des anticorps monoclonaux pharmacologiquement actifs contre des protéines membranaires comme les RCPGs, dont ETBR.

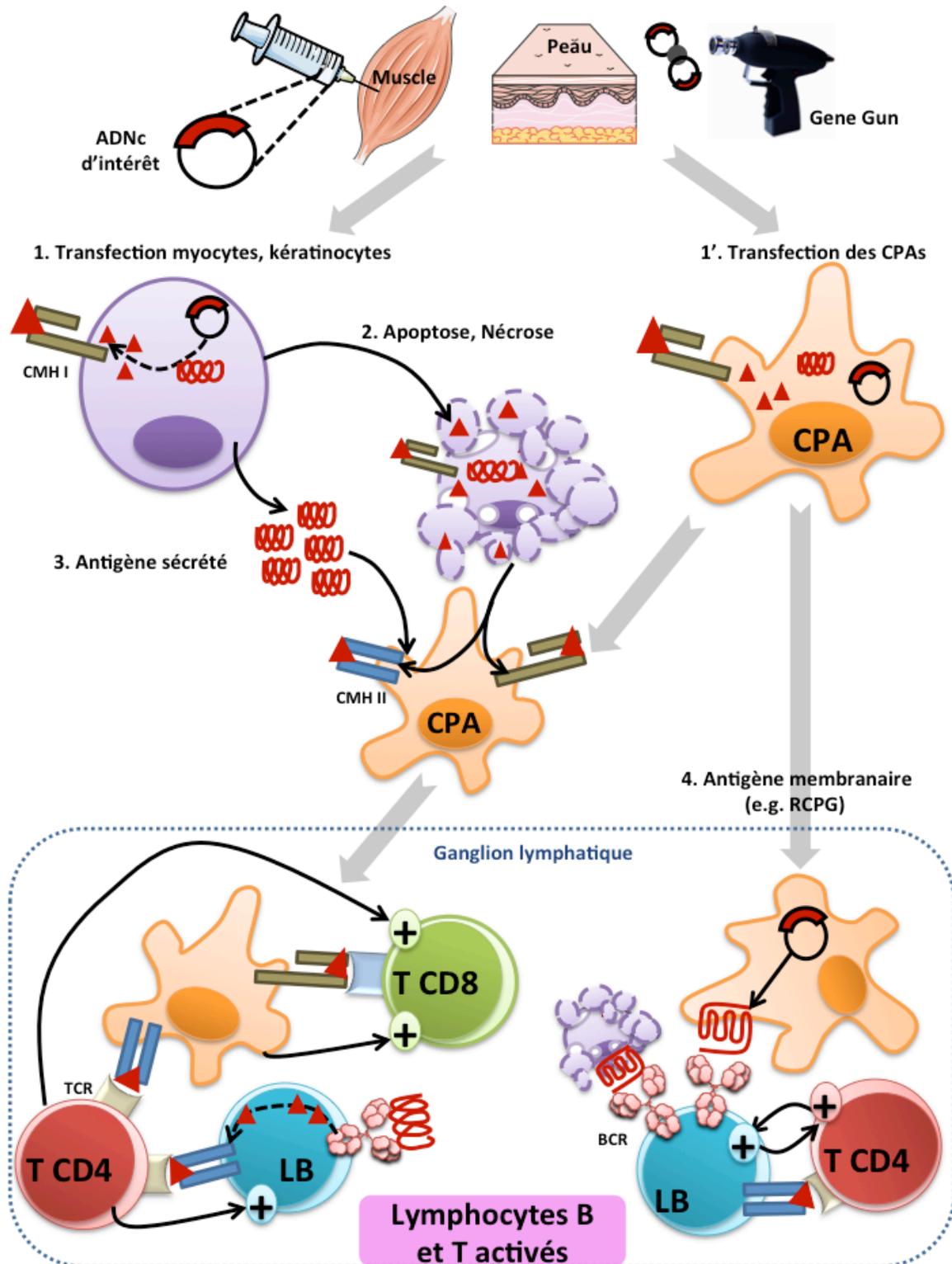


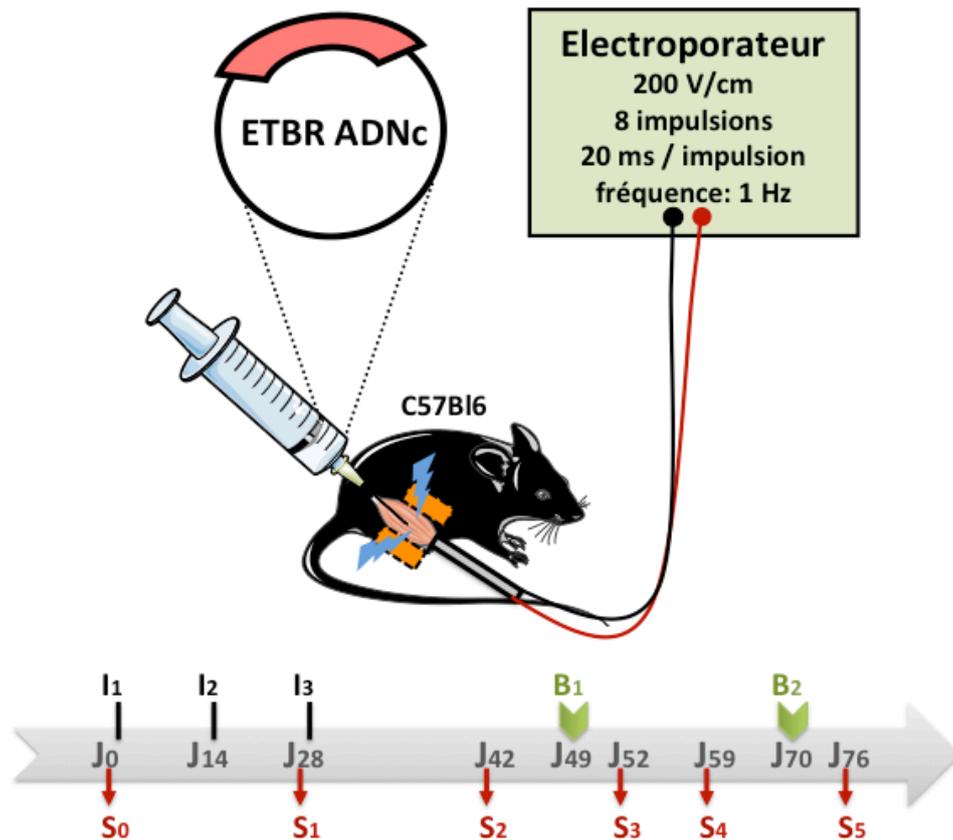
Figure 45. Induction d'une réponse immunitaire cellulaire et humorale par la méthode d'immunisation génique. Schéma inspiré de celui de Kutzler et Weiner [323]. Le mécanisme d'activation des lymphocytes B dans le cas d'un antigène membranaire est hypothétique (étape 4).

## 2.2. Description du protocole d'immunisation génique

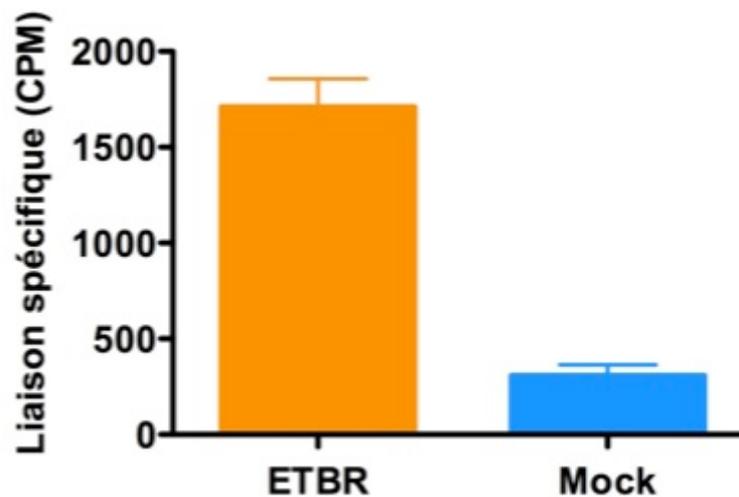
Il existe différentes méthodes pour introduire de l'ADN *in vivo* chez la souris. Les plus utilisées sont l'injection intramusculaire ou sous cutanée ainsi que le bombardement à l'aide d'un « pistolet à gène » ou gene gun. Au laboratoire, l'immunisation génique est une technique expérimentée depuis plusieurs années et l'injection intramusculaire s'est révélée être la stratégie la plus efficace et la plus simple à mettre en œuvre [575, 578]. Néanmoins, l'injection intramusculaire seule n'induit qu'une faible expression de la protéine cible *in vivo* et un couplage avec un agent chimique ou physique est nécessaire pour augmenter l'expression de l'immunogène *in vivo* et déclencher une réponse immunitaire humorale forte, compatible avec la production d'anticorps monoclonaux. Ainsi, nous avons couplé l'immunisation génique par injection intramusculaire avec l'électroporation, une méthode très efficace permettant d'augmenter fortement l'expression de la protéine *in vivo* [579] ainsi que la réponse immunitaire humorale [580]. Le protocole utilisé pour les immunisations « ETBR » est présenté dans la figure 46 : il comprend trois immunisations géniques couplées avec l'électroporation, espacées de deux semaines, puis plusieurs rappels cellulaires (injection de cellules HEK-ETBR). Ce protocole, de type « prime-boost », permet d'initier une réponse très spécifique grâce à l'immunisation génique puis d'induire une très forte production d'anticorps lors des rappels protéiques [581]. La réponse humorale spécifique est suivie tout au long du protocole grâce à des prélèvements sanguins analysés par cytométrie en flux.

## 2.3. Validation de l'expression d'ETBR *in vivo*

Avant de débiter le protocole d'immunisation, nous avons cherché à évaluer l'expression du récepteur ETB *in vivo*, après injection dans le muscle tibialis cranialis puis électroporation. L'expression d'ETBR est mesurée cinq jours après l'électroporation en incubant des extraits de muscle avec de l'ET-1 radioactive. Comme on peut l'observer sur la figure 47, le récepteur ETB est bien surexprimé suite à l'électroporation *in vivo*. De plus, cette surexpression concerne du récepteur fonctionnel, capable de lier l'ET-1 radioactive.



**Figure 46. Schématisation du protocole d'immunisation génique.** L'injection intramusculaire du plasmide est suivie par des chocs électriques. B = « Boost » cellulaire ; I = immunisation génique ; J = Jour ; S = prélèvement sanguin.



**Figure 47. Expression du récepteur ETB après électroporation *in vivo*.** ETBR (n = 6), Mock (n = 4). Chaque mesure est effectuée sur un échantillon correspondant à 100 µg de protéines, 5 jours après l'électroporation. Mock = injection et électroporation en omettant le plasmide.

#### *2.4. Suivi de la réponse en anticorps polyclonaux anti-ETBR lors du protocole d'immunisation génique*

Tout au long du protocole, des prélèvements sanguins ont permis de suivre le taux d'anticorps polyclonaux anti-ETBR présents dans le sérum des souris (Figure 48). A la suite des trois immunisations géniques, on ne détecte aucune réponse polyclonale anti-ETBR dans le sérum des souris immunisées. Par contre, dix jours après le premier rappel cellulaire (injection i.p de cellules HEK-ETBR), les souris immunisées avec ETBR présentent des taux d'anticorps anti-ETBR significativement supérieurs à ceux des souris témoins. Un deuxième rappel cellulaire, environ 20 jours après le premier, permet d'augmenter encore plus fortement le taux d'anticorps anti-ETBR chez les souris immunisées (saignées S5). Les anticorps des différentes saignées S5 semblent très spécifiques d'ETBR avec un marquage au moins 7 fois plus intense sur des cellules CHO-ETBR par rapport à celui observé sur des cellules CHO-WT (Figure 49). Après la saignée S5, le taux d'anticorps baisse rapidement et un troisième rappel cellulaire permet de restimuler la production d'anticorps anti-ETBR (Saignée S8). Néanmoins, à partir de ce troisième rappel on remarque que les souris témoins commencent à produire des taux importants d'anticorps non spécifiques, indiquant qu'une fraction non négligeable des anticorps produits par les souris immunisées (dans les saignées S8) sont en fait non spécifiques. Ce résultat est confirmé par une chute du ratio de fluorescence CHO ETBR / WT, pour 50% des souris, entre les saignées S5 et S8 (Figure 49).

Ainsi, cette étude démontre l'efficacité de la stratégie « prime-boost » pour produire rapidement de forts taux d'anticorps polyclonaux spécifiquement dirigés contre la forme native d'ETBR. Ces résultats indiquent également que les rappels cellulaires doivent se limiter à deux ou trois au maximum pour ne pas diluer les anticorps spécifiques dans un bruit de fond composé d'anticorps dirigés contre des antigènes cellulaires non pertinents. En dépit des trois rappels cellulaires et de l'apparition d'anticorps non spécifiques, les souris 1 et 10 ont été utilisées (après une période de repos suivie par un nouveau rappel cellulaire) pour la production d'anticorps monoclonaux anti-ETBR (voir partie 3.1 sur le rendomab-B1). Les souris 1 et 10 ont été choisies sur la base du rapport de fluorescence CHO ETBR / WT obtenu pour les saignées S8 (Figure 49), reflétant le taux d'anticorps spécifiques anti-ETBR.

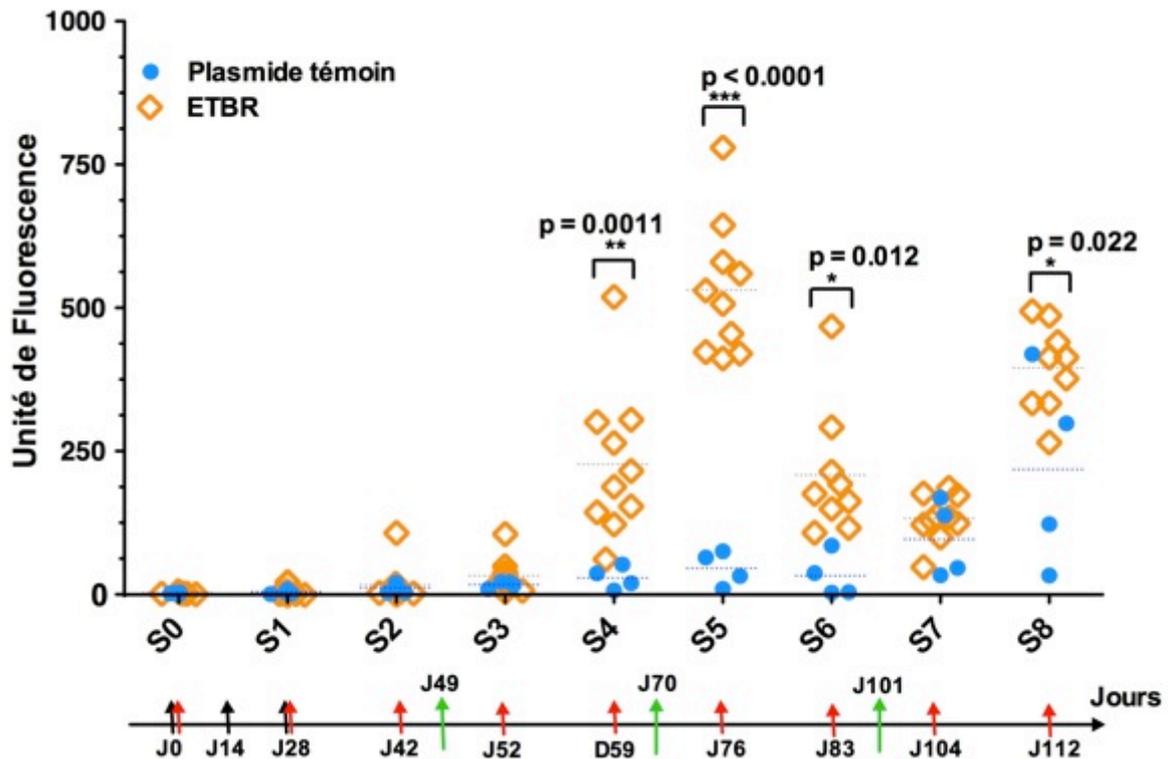


Figure 48. Suivi de la réponse humorale polyclonale anti-ETBR au cours du protocole d'immunisation génique. Les mesures sont effectuées par cytométrie en flux avec des cellules CHO-ETBR. Flèche noire : immunisation génique ; Flèche rouge : prélèvement sanguin ; Flèche verte : boost cellulaire (HEK-ETBR ou HEK-WT pour les souris témoins).\*, \*\*, \*\*\* :  $p < 0,05$  ;  $0,01$  ;  $0,001$ , respectivement, à la suite d'un test de Student comparant les souris immunisées par rapport aux souris témoins.

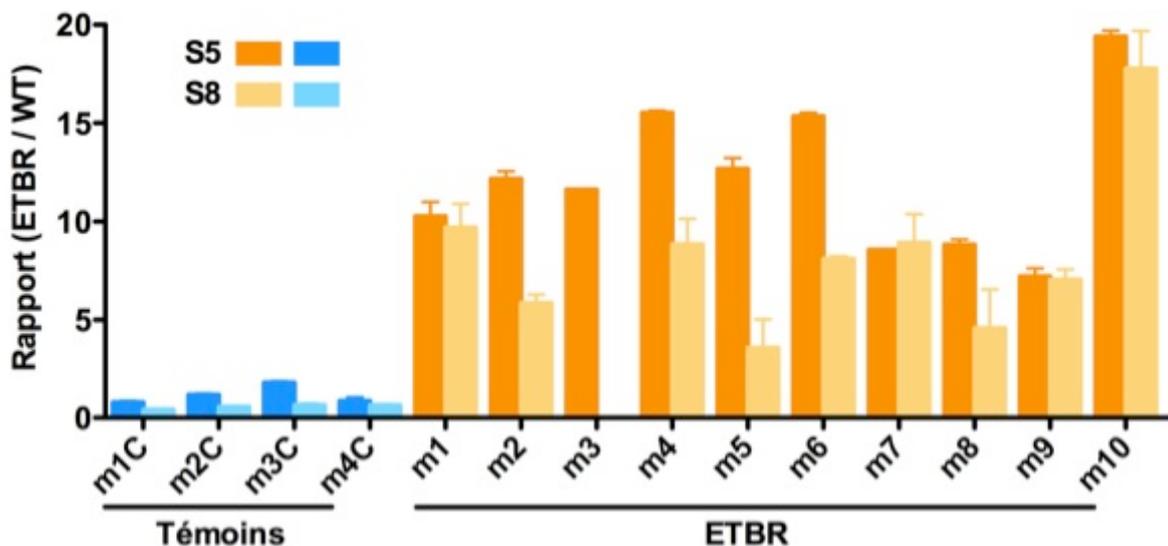
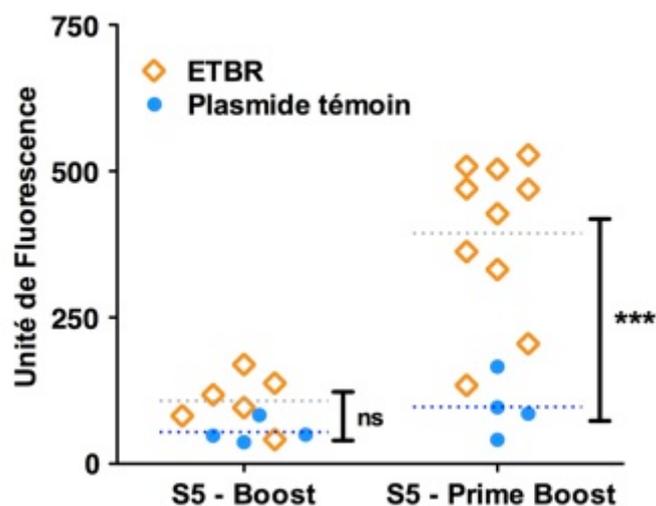


Figure 49. Spécificité des anticorps polyclonaux de la saignée n°5 (S5) vis à vis du récepteur ETB. mX = souris immunisée n°X ; mXC = souris témoin n°X. Les valeurs présentées en ordonné correspondent aux rapports entre les intensités moyennes de fluorescence (MFI) obtenus sur les CHO-ETBR et les CHO WT pour chaque antisérum.

## *2.5. Importance de l'immunisation génique dans la production d'anticorps anti-ETBR*

L'immunisation génique est une technique utilisée depuis plus de dix ans pour produire des anticorps monoclonaux. Néanmoins, la faible connaissance des mécanismes moléculaires expliquant son efficacité ainsi que le couplage quasi systématique à des rappels protéiques, nécessaire pour induire une production massive d'anticorps, peuvent laisser un doute sur la réelle efficacité de l'injection d'ADN dans l'induction de la réponse humorale. Afin de dissiper ce doute, nous avons réalisé une expérience permettant de comparer l'efficacité d'un protocole « prime-boost » comprenant des immunisations géniques, avec un protocole « boost » n'incluant pas d'immunisation génique, mais seulement des rappels cellulaires (les protocoles utilisés correspondent à celui présenté sur la figure 46). L'analyse de la réponse polyclonale anti-ETBR dans les sera des saignées S5, montre une forte réponse polyclonale anti-ETBR (similaire à celle observée dans la figure 48) pour le protocole « prime boost ». Au contraire, les souris immunisées simplement avec des rappels cellulaires (protocole « boost »), ne présentent aucune réponse polyclonale anti-ETBR significativement supérieure aux souris témoins. Les deux rappels cellulaires n'ont donc un intérêt que lorsqu'ils sont couplés à des étapes préalables d'immunisation génique. On peut imaginer qu'un nombre plus important de rappels déclencherait certainement une production plus importante d'anticorps anti-ETBR ; cependant, les anticorps spécifiques ainsi générés seraient probablement dilués dans un bruit de fond d'anticorps non spécifiques, dû à un nombre de rappels cellulaires trop important (voir figure 50). Les trois phases d'immunisation génique, bien qu'incapables de produire des taux élevés d'anticorps anti-ETBR par elles-mêmes, permettent donc probablement d'induire le développement de cellules B mémoires spécifiques assurant une production massive et rapide d'anticorps lors des rappels cellulaires [582]. Ainsi, ce résultat démontre le rôle indispensable de l'immunisation génique dans l'initiation de la réponse humorale spécifiquement dirigée contre ETBR, initiation qui permet ensuite la production massive d'anticorps avec un nombre restreint de rappels cellulaires.



**Figure 50.** Comparaison de la réponse immunitaire, au stade du prélèvement sanguin n°5 (S5), entre un protocole « prime-boost » impliquant l’immunisation génique et un protocole n’incluant que des rappels cellulaires. Les mesures des taux d’anticorps anti-ETBR dans les sera sont effectuées par cytométrie en flux avec des cellules CHO-ETBR. \*\*\* :  $p < 0,001$  pour un test de Student (comparaison ETBR versus plasmide témoin).

*2.6. Article n°1: Electroporation-aided DNA immunization generates polyclonal antibodies against the native conformation of human endothelin B receptor – DNA Cell Biol. 2011 Sep;30(9):727-37*

La caractérisation des anticorps polyclonaux anti-ETBR générés grâce à la méthode d’immunisation génique a fait l’objet d’une publication dans *DNA & Cell Biology* qui est présentée ci-après.

Cet article, focalisé sur des aspects méthodologiques, décrit la stratégie d’immunisation génique utilisée au laboratoire et la présente comme un outil particulièrement approprié pour la production d’anticorps monoclonaux dirigés contre la forme native de protéines membranaires (en prenant comme modèle ETBR). En effet, sans avoir besoin de passer par des étapes particulièrement fastidieuses de production de protéine recombinante et de renaturation liées à la nature transmembranaire de l’immunogène, la méthode d’immunisation génique nous a permis de générer des anticorps contre la forme native du récepteur ETB. Les anticorps polyclonaux anti-ETBR produits grâce à cette méthode sont spécifiques et capables de reconnaître le récepteur ETB dans son contexte membranaire, à la surface de cellules transfectées mais également à la surface de lignées cellulaires de mélanomes humains (connues pour surexprimer ETBR). Ce résultat indique la présence d’anticorps potentiellement intéressants pour une future production d’anticorps monoclonaux anti-ETBR dans le but de cibler le récepteur ETB à la surface de cellules tumorales. De plus,

des expériences de compétition montrent que l'ET-1 inhibe partiellement la liaison des anticorps sur ETBR, suggérant ainsi que certains anticorps pourraient présenter des activités pharmacologiques. Par ailleurs, une étude du site de liaison potentiel des anticorps polyclonaux sur le récepteur ETB met en évidence un épitope majoritaire, localisé dans la partie N-terminale, qui pourrait donc être fonctionnellement lié au site de liaison des endothélines. Enfin, ces anticorps ont également été utilisés pour mettre au point un test de criblage ELISA sur cellules vivantes, compatible avec une future production d'anticorps monoclonaux anti-ETBR et adapté à la sélection d'anticorps reconnaissant ETBR dans sa conformation native. Ainsi, la méthode d'immunisation génique nous a permis de produire de nouveaux outils immunologiques, particulièrement intéressants pour étudier le récepteur ETB dans des conditions physiologiques ou pathologiques comme dans les cancers. De plus, cette technique pourra être mise à profit pour produire des anticorps monoclonaux contre ETBR, et plus généralement contre d'autres RCPGs d'intérêt pharmacologique.

## **ARTICLE n°1**

**Electroporation-aided DNA immunization generates polyclonal antibodies against the native conformation of human endothelin B receptor**



**Electroporation-aided DNA immunization generates polyclonal antibodies  
against the native conformation of human endothelin B receptor**

**Bertrand Allard<sup>a,1</sup>, Fabienne Priam<sup>b,1</sup>, Frédérique Deshayes<sup>c</sup>, Frédéric Ducancel<sup>a</sup>,  
Didier Boquet<sup>a</sup>, Anne Wijkhuisen<sup>a,b</sup> and Jean-Yves Couraud<sup>a,b,\*</sup>**

<sup>1</sup> first co-authors

<sup>a</sup>CEA, iBiTecS, SPI, Laboratoire d'Ingénierie des Anticorps pour la Santé (LIAS), Bt. 136,  
CEA de Saclay, Gif sur Yvette, F-91191, France.

<sup>b</sup>EA 3515, Univ Paris Diderot - Paris 7, F-75013, Paris, France.

<sup>c</sup>Institut Jacques Monod, CNRS-Univ Paris Diderot-Paris 7, F-75013, Paris, France.

\*Corresponding author: Prof. Jean-Yves Couraud

CEA/DSV/iBiTec-S/SPI/LIAS

CEA Saclay, bâtiment 136

91191 Gif sur Yvette Cedex

Tel: +33 1 69 08 72 97

Fax: +33 1 69 08 59 07

Running title: antibodies to native human ET<sub>B</sub> receptor

## Abstract

Endothelin B receptor (ET<sub>B</sub>R) is a G protein-coupled receptor (GPCR) specific for endothelin peptides (including endothelin-1, ET-1), which mediates a variety of key physiological functions in normal tissues, such as modulation of vasomotor tone, tissue differentiation or cell proliferation. Moreover, ET<sub>B</sub>R, overexpressed in various cancer cells including melanoma, has been implicated in the growth and progression of tumors, as well as in controlling T cell homing to tumors. To gather information on receptor structure and function, antibodies are generally considered as choice molecular probes, but generation of such reagents against the native conformation of GPCRs is a real technical challenge. Here we show that electroporation-aided genetic immunization, coupled to cardiotoxin pretreatment, is a simple and very efficient method to raise large amounts of polyclonal antibodies highly specific for native human ET<sub>B</sub>R (hET<sub>B</sub>R), as assessed both by flow cytometry analysis of different stably transfected cell lines and by a new and rapid cell-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that we also describe. The antibodies recognized two major epitopes on hET<sub>B</sub>R, mapped within the N-terminal extracellular domain. They were used to reveal hET<sub>B</sub>R on membranes of three different human melanoma cell lines, by flow cytometry as well as by confocal microscopy, a method that we show is more relevant than mRNA PCR in assessing receptor expression. In addition, ET-1 partially competed with antibodies for receptor binding. The strategy described here thus efficiently generated new immunological tools to further analyze the role of ET<sub>B</sub>R under both normal and pathological conditions, including cancers. Above all, it can now be used to raise monoclonal antibodies against hET<sub>B</sub>R and, more generally, against GPCRs which constitute by far the largest reservoir of potential pharmacological targets.

## Introduction

Endothelin-1 (ET-1) is a member of a family of three 21-amino-acid isopeptides (ET-1, ET-2 and ET-3) released by a variety of cells in different tissues, including vascular endothelium, liver, kidney and the central and peripheral nervous systems (Rubanyi and Polokoff, 1994; Shah, 2007). ET-1 was originally identified as a potent vasoconstrictor, but is known also to be involved in cell proliferation and differentiation, hormone secretion, homeostasis and nociceptive signaling (Levin, 1995; Goldie, 1999). This pleiotropic ET-1 activity is mediated by binding to specific cell surface receptors, ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors (ET<sub>A</sub>R and ET<sub>B</sub>R). ET<sub>A</sub>R exhibits a similar affinity for ET-1 and ET-2 that is two orders of magnitude higher than that for ET-3, whereas ET<sub>B</sub>R has equal affinity for all three ETs. Both receptors are distributed throughout the body and belong to the G protein-coupled receptor (GPCR) or the heptahelical transmembrane receptor family.

Most interestingly, it was suggested for the first time in 1990 that ET-1 could also be involved in the growth of cancer cells *in vitro* (Kusuhara et al., 1990) and *in vivo* (Nelson et al., 1995), and since then a wealth of evidence has shown that various types of cancer cells are indeed overexpressing ET-1 and ET-1 receptors (Bagnato and Rosano, 2008). This overexpression could actually contribute to tumor growth not only by favoring the proliferation or the survival of cancer cells themselves (Bagnato and Catt, 1998; Shichiri et al., 1991) (autocrine effect), but also by promoting angiogenesis, cell invasion and migration through an action on vascular endothelium (Bagnato and Spinella, 2003; Spinella et al., 2007; Bagnato et al., 2008; Rosano et al., 2009). ET<sub>B</sub>R in particular appears to be overexpressed in melanoma, oligodendromas, bone and lung cancers (Egidy et al., 2000; Lahav, 2005; Hoshi et al., 2009; Paolillo et al., 2010; Saldana-Caboverde and Kos, 2010). Moreover, this receptor, located on endothelial cells, has also recently been implicated in reducing T cell homing to tumors, thus favoring tumor escape from immune surveillance (Buckanovich et al., 2008; Kandalaft et al., 2009). In this context, there is a real need for biological tools not only to gather more information on ET<sub>B</sub>R cytochemical distribution, structure and roles, under both normal and pathological conditions, but also possibly to block this receptor, i.e. to exert antagonist properties, when ET<sub>B</sub>R is associated with pathogenesis.

To this end, antibodies recognizing the native conformation of human ET<sub>B</sub> receptor (hET<sub>B</sub>R) would appear to be ideal molecular probes. However, the raising of such antibodies, and more generally antibodies against membrane GPCRs, is commonly hampered by several problems when using classic (i.e. protein or peptide) immunization procedures, as

emphasized in a recent review (Hutchings et al., 2010). The main problem is the difficulty of purifying sufficient amounts of correctly folded soluble antigen, GPCRs being generally weakly expressed molecules, buried in membranes, poorly immunogenic and very unstable when purified. To overcome these difficulties, one possibility is to generate antibodies to GPCR-derived peptides, but, except for a few notable cases (e.g. Gupta et al., 2007), such antibodies generally do not efficiently recognize the native structure of the protein inserted in the membrane. Another possibility is to purify and renature recombinant receptors, expressed in bacterial, yeast, insect or mammalian cells (Jungbauer and Kaar, 2007). These techniques are, however, usually difficult to implement. This is probably why, using these conventional approaches, only two groups until now have succeeded in obtaining antibodies against endothelin-1 receptors (Kondoh et al., 1990; Yamaguchi et al., 2004). Nevertheless, the specificity of the antibodies obtained by the former group against rat lung membrane preparations (i.e. recognition of rat ETA vs ETB receptors) was not described, while the raising of antibodies actually directed against hET<sub>B</sub>R, reported by the latter team required the still complicated purification of recombinant receptors overexpressed in insect cells.

In this context, DNA immunization, which bypasses laborious protein extraction, purification and *in vitro* renaturation procedures, appears to be an alternative and attractive way to obtain antibodies specific for the native conformation of membrane proteins. It has been successfully employed to raise antibodies against various targets, which could, for instance, be used for passive immunotherapy owing to their ability to recognize their native antigens *in vivo* (Nagata et al., 2003). As far as GPCRs are concerned, few antibodies have been prepared up to now using genetic immunization, by various groups (Costagliola et al., 1998, Pichurin et al., 2001, Kaptein et al., 2008, Fujimoto et al., 2009) including our own (Tymciu et al., 2002). More recently, we also showed that the efficiency of DNA immunization against low-immunogenic molecules could be greatly enhanced by using vectors encoding T-cell epitopes (Tymciu et al., 2004), or above all by coupling DNA injection to electroporation (Alexandrenne et al., 2009). In the present study, we report that electroporation-aided genetic immunization, possibly coupled to cardiotoxin pretreatment, is a simple and very efficient method of raising large amounts of polyclonal antibodies highly specific for hET<sub>B</sub>R. The recognition of the native conformation of hET<sub>B</sub>R was assessed by FACS analysis of different stably transfected cell lines and also by a newly developed, rapid and efficient cell-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) performed on unfixed cells in suspension. The major epitopes recognized by these antibodies on the receptor molecule were mapped within the N-terminal extracellular domain of hET<sub>B</sub>R. Antibodies

were used to reveal hET<sub>B</sub>R overexpressed on membranes of several human melanoma cell lines by flow cytometry as well as by confocal microscopy. As a consequence, these antibodies, which in addition compete with ET-1 for receptor binding, can be used for cytochemical and functional studies of hET<sub>B</sub>R. Importantly, the data reported here open the way to the use of electroporation-aided DNA immunization for generating pharmacologically active monoclonal antibodies against hET<sub>B</sub>R and, most probably, against GPCRs, which constitute by far the most abundant receptor superfamily in mammals and the largest reservoir of potential pharmacological targets.

## **Materials and methods**

### *Animals*

Six-week-old female C57BL/6 mice from Janvier (Le Genest-St-Isle, France) were kept in a specific pathogen-free animal facility. All animal experiments complied with French animal experimentation regulations.

### *Plasmids*

The cDNA clone of the human ET<sub>B</sub> receptor (a generous gift from Dr. M.J. Brownstein, Bethesda, USA) was subcloned in pcDNA3.1 vector (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The integrity of the construct was confirmed by sequence analysis.

### *Transfection experiments and cell cultures*

Chinese hamster ovary cells (CHO, obtained from ECACC, Wiltshire, UK) were cultured in Ham-F12 medium and human embryonic kidney cells (HEK293T, obtained from EACC) in DMEM medium. Human melanoma cell lines (A375 and HT144, purchased from ATCC, Molsheim, France) and SLM8 (generous gift from Dr. M. Viguier, Hôpital Saint-Louis, Paris, France) were cultured in Ham-F12/DMEM (50%-50%) medium. All media were supplemented with 10% fetal calf serum, 1 mM pyruvate, 1% nonessential amino acids, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/mL streptomycin (culture products from Invitrogen) and cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The cDNA for hET<sub>B</sub>R was stably overexpressed in CHO and HEK cells.

### *DNA immunizations*

Mice were anesthetized using ketamine (Merial, Lyon, France) and xylazine (Bayer Pharma, Puteaux, France) (100 and 10 mg/kg, respectively) and their legs were shaved. 50 µg in 35 µL of hET<sub>B</sub>R-cDNA was injected into tibialis anterior muscles of 6 mice at days 0, 14 and 28. Square wave electric pulses (8 pulses of 200 V/cm, 20 ms duration and a frequency of 1 Hz) were generated by a Gene Pulser Xcell electroporation system (Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France). Five days prior to the first DNA injection, muscles were pre-treated or not with cardiotoxin purified from venom of *Naja nigricollis* (10 µM, 50 µL/injection; Latoxan, Valence, France). Four animals received an electrotransferred empty DNA vector and were used as negative controls. A protein boost was performed at day 42 with 5x10<sup>6</sup> HEK cells overexpressing hET<sub>B</sub>R. Blood was obtained for specific antibody detection at days 0, 28, 35 and 49. A group of six mice received only a single cellular boost 7 days before blood sampling, without any previous plasmid injection.

### *In vivo hETBR expression*

Five days after a single plasmid injection, tibialis muscles from animals receiving the hET<sub>B</sub>R-cDNA containing vector, or the empty vector, were dissected and snap-frozen in liquid nitrogen. Muscles were homogenized (10%) in a 5% glucose solution containing protease inhibitors (Complete Tablets, Roche Diagnostic, Meylan, France) using a FastPrep<sup>TM</sup> kit (Bio-Rad). hET<sub>B</sub>R expression level was evaluated by <sup>125</sup>I-ET-1 binding experiments in muscle extracts, as described previously (Tymciu et al., 2002)

### *Flow cytometry analysis*

For the determination of hET<sub>B</sub>R specific antibody binding, flow cytometric analysis was performed on five cell culture models: the WT CHO cells, the hET<sub>B</sub>R-CHO cells and the three human melanoma cell lines A375, HT144 and SLM8. Confluent cells in 75-cm<sup>2</sup> flasks were washed with phosphate buffer saline (D-PBS, Invitrogen) and collected after incubation at 37°C for 15 min with 5 mL of versene buffer (D-PBS/8 mM EDTA). Cells were then seeded (100 000 cells/well) onto V-shaped 96-well plates (Greiner Bio One, Courtaboeuf, France), plates were centrifuged, supernatant was discarded and cells were incubated for 2 h at 4°C with 100 µL of PBS/0.1% BSA/5% normal goat serum (NGS) containing serum (1:100) from immunized mice. After two washes with 150 µL of D-PBS 0.1% BSA/1% NGS, cells were incubated for 1 h at 4°C in the dark with phycoerythrin (PE)-conjugated AffiniPure

goat anti-mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch). Cells were washed twice again and resuspended in 100  $\mu$ L of D-PBS/0.1% BSA. The fluorescence was finally assayed using a GUAVA flow cytometer (Guava Easyocyte Plus, Millipore, Molsheim, France) and mean fluorescence intensity (MFI) of samples was measured. For the competition test, diluted antisera (1:500 or 1:1000) were incubated overnight with increasing concentrations of ET-1. All experiments, including competition tests, were performed at 4°C to avoid receptor internalization.

#### *ELISA test on unfixed cells*

For large-scale screening of huge numbers of samples, we developed a rapid and reliable cell-based ELISA test. Confluent hET<sub>B</sub>R-CHO cells in 75-cm<sup>2</sup> flasks were washed with D-PBS and collected after incubation at 37°C for 15 min with 5 mL of versene buffer. Cells were then seeded (100 000 cells/well) onto V-shaped 96-well plates (Greiner Bio One, Courtaboeuf, France), plates were centrifuged, supernatant was discarded and cells were resuspended in 100  $\mu$ L of D-PBS/0.1% BSA/5% NGS and saturated for 4 h at 4°C. Plates were centrifuged, supernatant was discarded and cells were incubated for 2 h at 4°C with 100  $\mu$ L of D-PBS/0.1% BSA/5% NGS containing serum (1:100) from immunized mice. After two washes with 150  $\mu$ L of D-PBS/0.1% BSA/1% NGS, cells were incubated for 2 h at 4°C with 100  $\mu$ L of acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7)-conjugated-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch) (2 Ellman units/mL). Plates were washed twice again and resuspended in 200  $\mu$ L of Ellman reagent. Acetylcholinesterase activity was measured by the colorimetric method of Ellman (Grassi et al., 1989) and absorbance at 414 nm was measured with an automatic reader (Labsystems, Kennett Square, USA).

#### *Confocal microscopy analysis*

Confocal microscopy analysis was performed on four cell culture models: the hETBR-CHO cells and the three human melanoma cell lines A375, HT144 and SLM8. Cells were seeded (100 000 cells/well) on the Lab Tek system (Nunc, Rochester, USA). The following day, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at 4°C, washed three times with D-PBS and blocked for 1 h at 4°C in D-PBS/3% BSA. Then, cells were incubated overnight at 4°C with D-PBS/0.1% BSA/5% NGS containing serum (1:500) from immunized mice. After three washes, they were stained with Alexa-488 conjugated goat anti-mouse (Invitrogen) at a dilution of 1:100 for 2 h at 4°C and washed three times with D-PBS. Cell nuclei were labeled

with a sodium phosphate buffer containing DRAQ5 (1/2000) (Biostat, Leicestershire, UK). Cells were then washed twice with distilled water and observed by confocal microscopy (Zeiss LSM510 Meta confocal microscope, Carl Zeiss S.A.S., Le Pecq, France).

#### *mRNA PCR*

Total RNA was extracted using the RNeasy kit (Qiagen, Valencia, California, USA) following the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using 400 ng of oligo(dT) (Roche Diagnostics, Meylan, France), 20 units of RNasin RNase inhibitor (Promega, Madison, Wisconsin, USA) and eight units of Omniscript reverse transcriptase (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturers' instructions. All the conditions for RNA extraction, reverse transcription and PCR, in addition to primer sequences for GAPDH, were previously described (Baton et al., 2004). PCR was performed by an initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 30 cycles at 95°C for 45s, 62°C for 45s and 72°C for 1min. Primer sequences for human ET<sub>B</sub>R were: 5'-GCACATCGTCATTGACATCC-3' and 5'-CAGAGGGCAAAGACAAGGAC-3'.

#### *Peptide synthesis and hET<sub>B</sub>R-binding epitope mapping*

Overlapping 12-mer peptides, frameshifted by three residues, covering the entire extracellular amino acid sequence of hET<sub>B</sub>R receptor, were synthesized on a cellulose membrane using the SPOT technique described by Laune et al. (2002). The membrane was soaked overnight in 20 mL of Tris-buffered saline (TBS) containing 2 mL of blocking buffer (Roche Diagnostics) and 1 g of sucrose (pH 7.0), and then washed three times with TBS containing 0.1% (v/v) Tween (TBSTw). Serum (1:100) from immunized mice was added in the presence of an anti-protease cocktail (Roche) and the membrane was incubated in a moist chamber for 2 h. After three washes with TBSTw (pH 7.0) the membrane was stirred in a 1:500 dilution of monoclonal anti-mouse IgG labeled with alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) for 1 h. After three washes with TBSTw (pH 7.0), the interacting peptide spots were colored for 30 min by adding the 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) substrate for alkaline phosphatase (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). The membrane was washed three times with deionized water and dried for scanning. The membrane can be used repeatedly after a regeneration step consisting of one wash in dimethylformamide for 1 min, three washes in deionized water, three washes in 8 M urea containing 1% (w/v) SDS and 1% (w/v) β-mercaptoethanol and three subsequent washes in a mixture of ethanol-acetic-acid-water (50:10:40, v/v/v).

## Results

In preliminary experiments, we checked the ability of hET<sub>B</sub>R encoding plasmid, which served as immunogen, to trigger expression of functionally active endothelin-1 receptor, both *in vitro* and *in vivo*. This was shown first by FACS analysis, performed both on CHO and HEK cells stably transfected with the hET<sub>B</sub>R construct, using fluorescein-labeled ET-1. A clear shift in ET-1 fluorescence was detected with both hET<sub>B</sub>R-transfected cells, compared with signals obtained with control cells transfected with the empty vector (not shown). Second, we checked, by performing radiolabeled ET-1 binding experiments on muscle cell membranes, that *in vivo* injection of hET<sub>B</sub>R encoding plasmid coupled to electroporation triggered the expression of recombinant hET<sub>B</sub>R in tibial muscles 5 days after immunization (1710 +/- 328 cpm/100 µg muscle, n=6). No significant synthesis occurred in animals receiving the empty vector under similar experimental conditions (263 +/- 124 cpm/100 µg muscle, n=4).

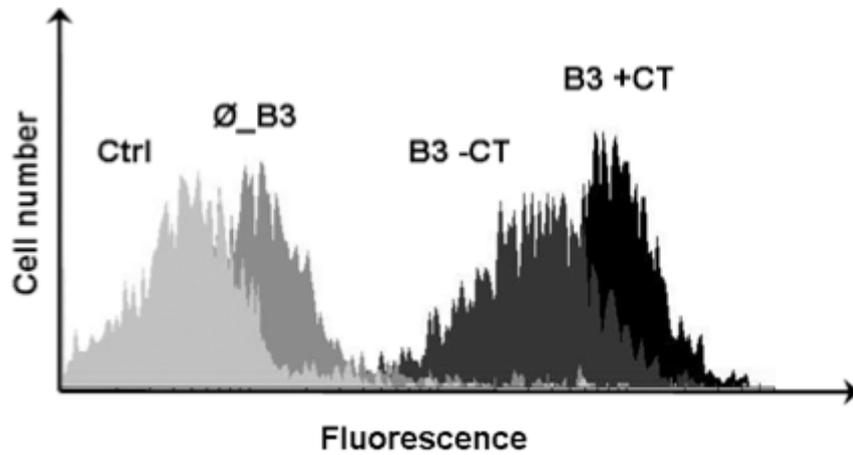
### *DNA immunization generates antibodies specifically recognizing native hET<sub>B</sub> receptor*

FACS analysis, which avoids any cell fixation treatment, is a method of choice for detecting antibodies recognizing native conformations of membrane antigens. We therefore favored this technique for assessing the possible occurrence of antibodies recognizing the native hET<sub>B</sub>R in the sera from DNA-ET<sub>B</sub>R-immunized animals, with or without a cardiotoxin pretreatment before any DNA injection. As shown on a representative example depicted in Fig. 1, a large shift in fluorescence appeared between hET<sub>B</sub>R-expressing CHO cells incubated with the sera from hET<sub>B</sub>R cDNA immunized animals, pretreated or not with cardiotoxin, and those incubated with the sera from control mice immunized with the empty vector (nonspecific binding) or with all preimmune sera (not shown). By contrast, no difference was observed when similar experiments were carried out on WT CHO cells not expressing the receptor (not shown). In order to follow the anti-hET<sub>B</sub>R antibody blood level throughout the immunization protocol, data obtained with all experimental sera were quantified and are summarized in Fig. 2. Significant amounts of anti-receptor antibodies in the sera of cardiotoxin-free animals appeared only at the second bleeding, after three DNA injections, then reached very high levels (signals 10 times higher) after a cellular boost with stable HEK-hET<sub>B</sub>R cells. Interestingly, cardiotoxin pretreatment increased the early raising of antibodies, which could be detected in some animals as soon as the first bleeding, after only two DNA injections. This enhancing effect was maximal at the time of the second bleeding, but did not

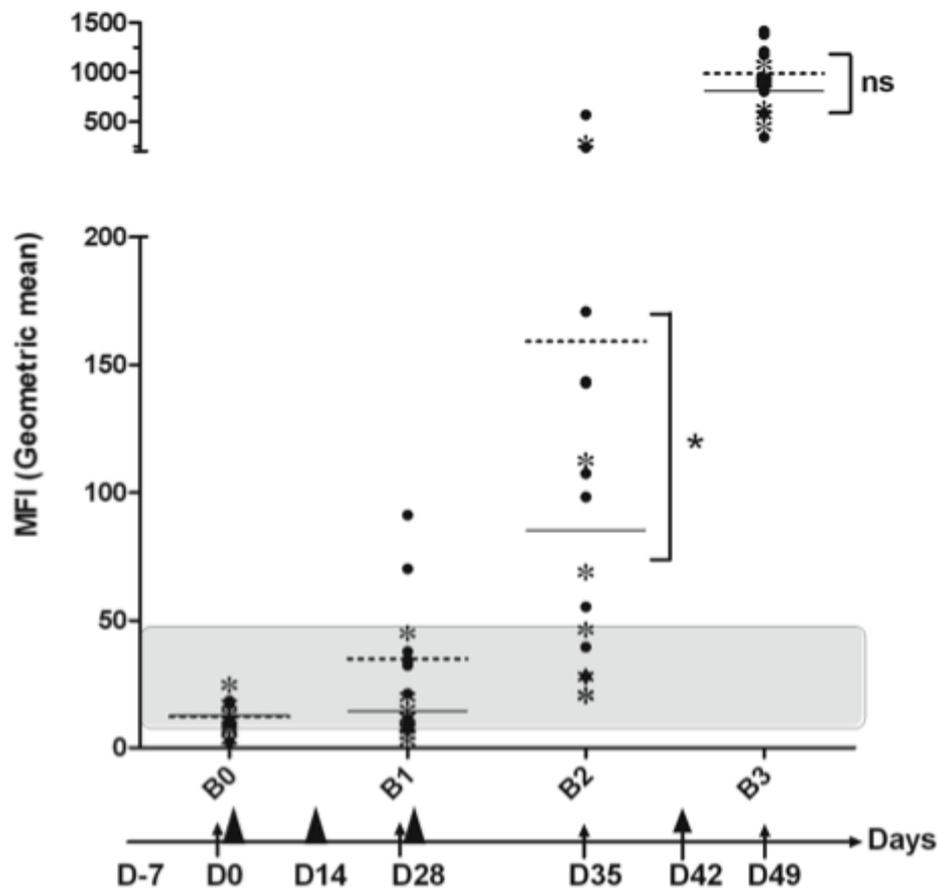
persist thereafter, following the cellular boost. No antibodies were detected at any time in the sera of control animals that received empty DNA vectors with electroporation (not shown). Similar negative results were also observed with the sera of animals that only received an HEK cell injection 7 days before bleeding, without any previous DNA injection (not shown).

Antibody titers (defined as serum dilution giving 50% of the maximum fluorescence signal) were measured by quantitative FACS analysis in the sera obtained from bleeding no. 3 (B3) for some DNA-ET<sub>B</sub>R immunized animals and were found to be around 1:1000-1:2000 (not shown). Significant signals, as compared with control values observed using sera from animals injected with empty vectors, were still detected under our experimental conditions for dilutions as high as 1:25000, depending on the serum (not shown).

The specificity of labeling was further documented on B3 sera from DNA-ET<sub>B</sub>R immunized animals, with or without cardiotoxin pretreatment, through additional control experiments. Firstly, the MFI signal was considerably reduced when hET<sub>B</sub>R-expressing CHO cells were preincubated for 30 min at 37°C with endothelin-1, the specific receptor endogenous ligand, which we showed in preliminary experiments triggers the partial internalization of ET<sub>B</sub>R under these experimental conditions (not shown). Secondly, the MFI signals for all B3 sera obtained on hET<sub>B</sub>R-expressing CHO cells (hET<sub>B</sub>R-CHO) were quantitatively compared with those obtained on control WT CHO cells not expressing the receptor. To this end, the percentage of specific labeling was defined as:  $(\text{MFI on hET}_{\text{B}}\text{R-CHO cells} - \text{MFI on WT CHO cells}) / \text{MFI on hET}_{\text{B}}\text{R-CHO cells} \times 100$ . Using sera from DNA-ET immunized animals, with and without cardiotoxin pretreatment, the specific labeling values were found to be 92% +/- 5% and 89 +/- 10%, respectively. Although these values must be interpreted with caution since MFI is not really a quantitative index, they strongly suggest that antibodies present in all B3 sera, i.e. after 3 DNA injections and a cellular boost, are highly specific for the hET<sub>B</sub>R, i.e. notably do not significantly cross-react with any antigenic molecule potentially common to both HEK-hET<sub>B</sub>R cells (which served for the boost) and CHO-hET<sub>B</sub>R cells (which served for the screening). Thirdly, FACS experiments, performed using CHO cells stably transfected with hET<sub>A</sub>R (kindly provided by Dr. M. Iglarz, Actelion, Paris, France) on the one hand and ELT3 mouse cells expressing both murine ET<sub>B</sub>R and ET<sub>A</sub>R (kindly provided by Dr. Z. Tanfin, Orsay, France) on the other hand, revealed the absence of any significant labeling, indicating that, under our experimental conditions, anti-hET<sub>B</sub>R polyclonal sera do not cross-react with human hET<sub>A</sub>R or with any murine ET-1 receptor (not shown) despite partial sequence homology.



**FIG. 1.** Electroporation-aided hETBR DNA immunization generates antibodies against the native conformation of hETBR, as revealed by flow cytometry. Experiments were performed using CHO cells expressing hETBR incubated with sera (diluted 1:100) from the third bleeding (B3) of mice immunized with hETBR DNA, with (+ CT) or without (-CT) cardiotoxin pretreatment, or with an empty plasmid vector ( $\emptyset$ ). The control (Ctrl) corresponds to basal immunofluorescence, using only the secondary labelled antibody. hETBR, Endothelin B receptor; CHO, Chinese hamster ovary cells.



**FIG. 2.** Evolution of individual antibody responses to recombinant hETBR throughout immunization. MFI was calculated from histograms (as shown in Fig. 1) obtained by incubating CHO cells with sera from hETBR-DNA-immunized-animals (diluted 1:100), with (•) or without (\*) cardiotoxin (CT) pretreatment. For reasons of clarity, individual signals obtained using control animals injected with an empty plasmid vector are omitted: the gray zone corresponds to mean - SD of all these control values. Small arrows indicate the four bleedings (including the preimmune one: B0), arrow heads indicate the three DNA injections, and the large arrow (D42) indicates the cell boost. Significant differences ( $*p < 0.05$ ) between MFI values obtained with sera of CT-pretreated (+ CT, dotted line) and not pretreated (- CT, continuous line) animals were observed only at the second bleeding (B2). ns, not significant; MFI, mean fluorescence intensity; SD, standard deviation.

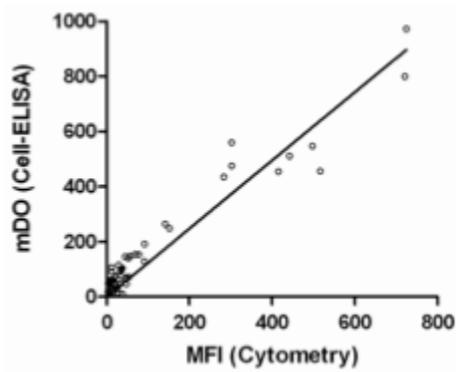
### *ELISA test on unfixed cells*

Although flow cytometry is particularly suited to detection of antibodies against native membrane proteins, it is too time-consuming for the large-scale screening of huge numbers of samples. To circumvent this technical difficulty, we developed a rapid and reliable ELISA test, using the anti-hET<sub>B</sub>R sera that we obtained as molecular probes. This ELISA test, performed in microtiter plates on unfixed viable cells in suspension, appeared to be much faster than FACS analysis, even using the semi-automatic effective GUAVA apparatus (typically about 2 s to read one plate, compared with about 40 min). Importantly, as shown in Fig. 3, when comparing the values obtained by both tests (MFI signals versus OD values) for a large number of sera (n=54) from different bleedings, we found a very good correlation ( $r^2 = 0.90$ ), which validates the use of this new ELISA test in screening hundreds of samples for antibodies against the native form of hET<sub>B</sub>R, typically in the supernatants of hybridoma cultures.

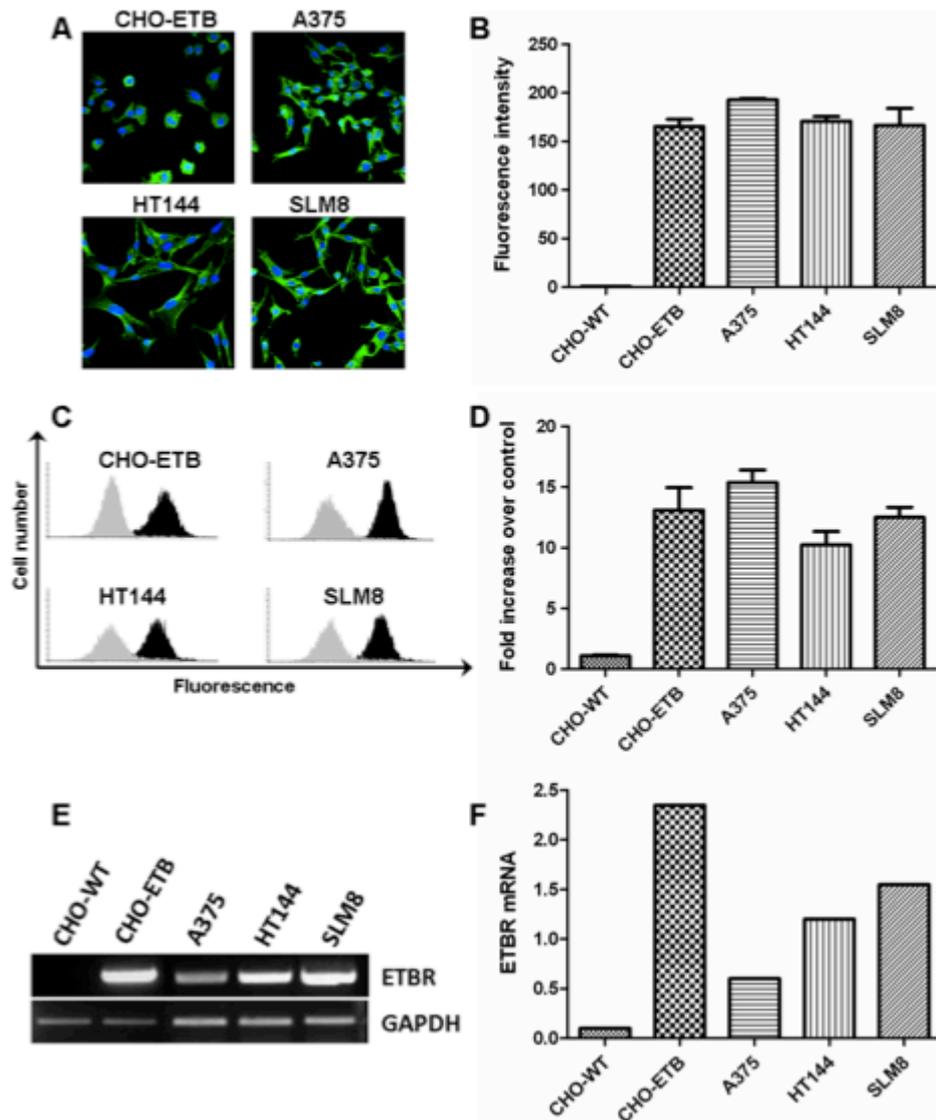
### *Antibodies label cell membranes*

Confocal microscopy experiments were undertaken to localize at the ultrastructural level the previous labeling revealed by FACS and ELISA. Using selected sera from the B3 bleedings, clear membrane fluorescence could be detected on CHO cells expressing hET<sub>B</sub>R (Fig. 4A). By contrast, only background fluorescence was observed i) when the same sera were incubated with WT CHO cells not expressing the receptor and ii) when preimmune sera, or sera from mice immunized with the empty vector, or sera from mice immunized with an unrelated antigen, were tested on CHO cells expressing or not the receptor (not shown).

In addition, confocal microscopy analysis was successfully used to reveal membrane labeling of various human melanoma cells (A375, HT144 and SLM8 cell lines) using anti-hET<sub>B</sub>R polyclonal sera (Fig. 4A). This labeling was quantified (Fig. 4B) and the respective values were very similar to those obtained by flow cytometry analysis (Figs. 4C and D) on the same cell samples. This result indicates that paraformaldehyde treatment does not significantly alter the conformation of membrane receptors. In addition, we observed a clear discrepancy when comparing these levels of membrane labeling with the quantitative expression of mRNA by the same cells (Figs. 4E and 4F). For example, A375 cells whose membrane expression of hET<sub>B</sub> receptors was the highest both in confocal microscopy and flow cytometry experiments are those with the lowest mRNA expression.



**FIG. 3.** Correlation between signals generated by anti-hETBR antibodies using flow cytometry analysis and the new ELISA test. All sera from hETBR-DNA-immunized animals, with or without cardiotoxin pretreatment, were tested for anti-hETBR antibody content (at 1:100 dilution) by both flow cytometry (as shown in Fig. 2) and the newly developed ELISA test performed on unfixed cells. Signals (MFI vs. optical density values, respectively) were highly correlated ( $r^2 = 0.9059$ ,  $n = 54$ ). ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.



**FIG. 4.** Comparison of human ETB receptor levels expressed by CHO and different human melanoma cells, as estimated by immunocytochemistry, flow cytometry, and mRNA PCR. Selected B3 sera from hETBR DNA-immunized mice were used for confocal immunocytochemistry (A) and flow cytometry (C) experiments performed on recombinant hETBR-expressing CHO cells and on three human melanoma cell lines (A375, HT144, and SLM8). Gray histograms in C refer to non specific fluorescence (using a polyclonal antiserum against an irrelevant protein). Results were quantified in B and D, respectively (data are the mean – SD of two independent experiments). hETBR mRNA PCR was performed on the same cells (E), and the results were quantified in F. Very similar relative signals between these four cell lines were observed by immunocytochemistry (B) and flow cytometry (D) using polyclonal anti-hETBR antibodies, whereas a clear discrepancy appears when comparing these data with the results from mRNA PCR (F). PCR, polymerase chain reaction.

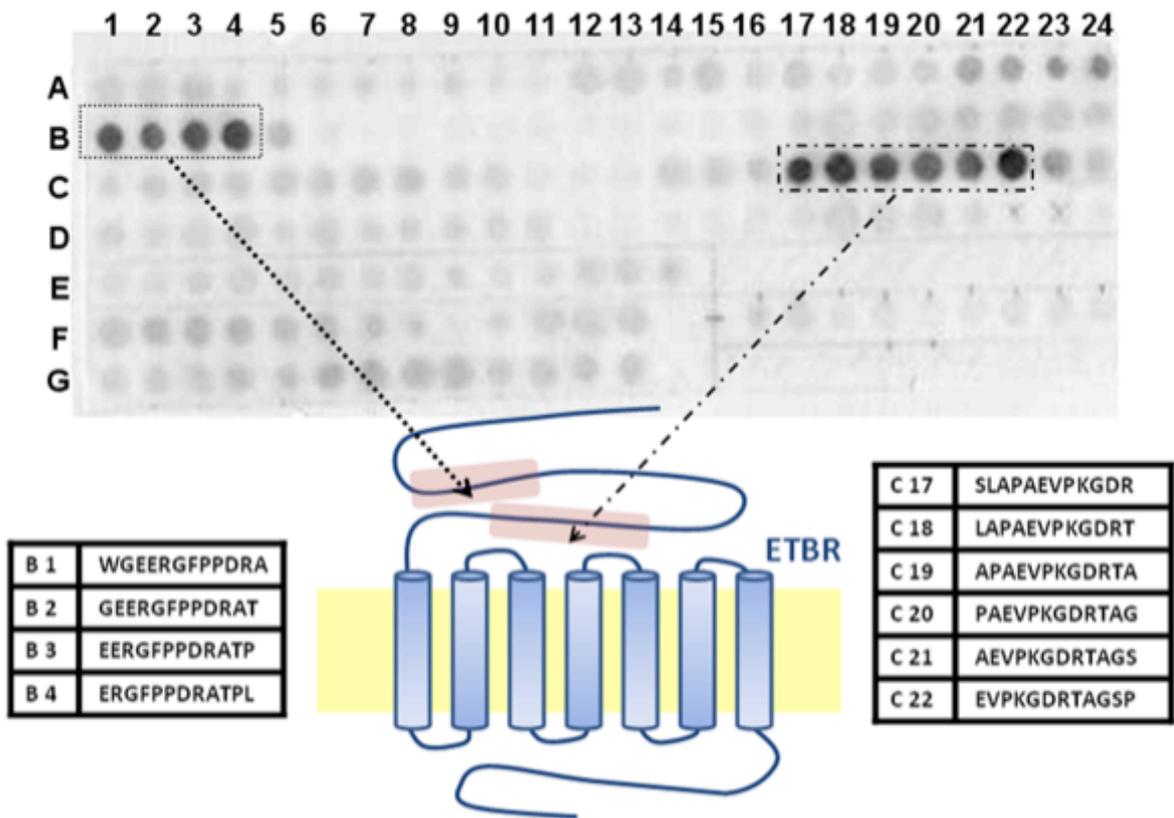
Although we could not detect any significant amount of ET-1 in the culture medium of any melanoma cell line, this lack of correlation could be due to differential internalizations of receptors induced by very low levels of secreted ET-1. Anyway, our observations clearly indicate that immunocytochemical studies, allowed by the present antibodies, are more relevant than mRNA PCR, at least in this case, in assessing the overexpression of membrane hET<sub>B</sub>R in melanoma cell lines.

#### *Antibodies recognize extracellular epitopes of hET<sub>B</sub> receptor*

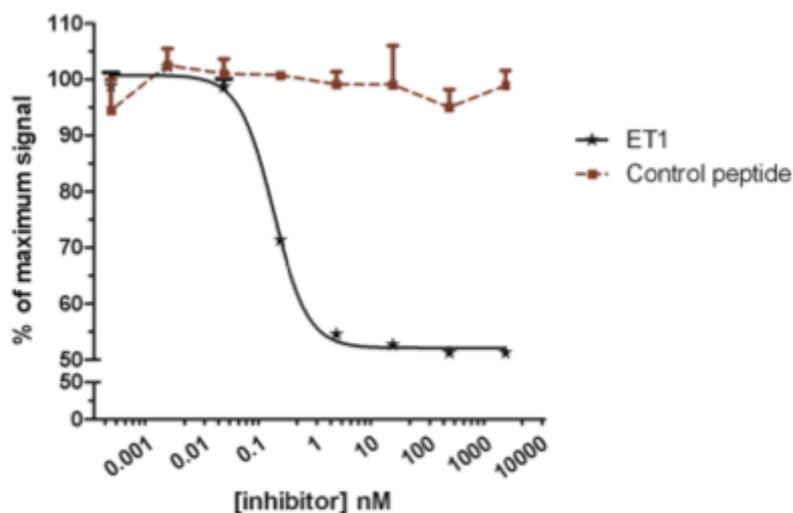
Owing to our strategy of immunization, anti-hET<sub>B</sub>R antibodies that we obtained are likely to be directed towards the extracellular domains of the receptor. So, in order to investigate the receptor epitopes that would be recognized by these antibodies, we carried out an analysis using a set of 147 overlapping dodecapeptides covering the entire length of the hET<sub>B</sub>R extracellular regions, i.e. the N-terminal extremity (including the 1-26 signal peptide sequence) and the three extracellular loops E1, E2 and E3. The possible recognition of all these peptides, prepared on a cellulose membrane by spot multiple peptide synthesis, was tested by using the same two selected B3 bleedings that were used for confocal microscopy analysis. Fig. 5 shows the pattern of binding of one representative polyclonal anti-hET<sub>B</sub>R antiserum to the set of peptides. Ten peptides (B1 to B4 and C17 to C22) were found to be antigenically reactive: they correspond respectively to amino acid residues 25-39 (i.e. 27-39 in the mature receptor when the 1-26 signal peptide is cleaved) and 65-81 in the N-terminal sequence of hET<sub>B</sub>R. Peptides from any extracellular loop appeared essentially unreactive. A similar recognition pattern was observed using the other B3 antiserum (not shown).

#### *ET-1 competes with antibodies for ET<sub>B</sub> receptor binding*

Since the major linear epitopes of our antibodies (at least those present in the two selected B3 sera) were delineated, we wondered whether these antibodies could be used to give any new insight into the localization of the ligand binding site in hET<sub>B</sub>R, which is still a subject of great controversy (Lee et al., 1994; Wada et al., 1995; Boivin et al., 2004; Aubin et al., 2008; Lättig et al., 2009). For this purpose, we investigated whether endothelin-1 could compete with these antibodies for receptor binding. FACS experiments were carried out on hET<sub>B</sub>R-expressing CHO cells, using different B3 sera, including of course those whose epitopes were mapped. As shown in Fig. 6, when CHO cells were preincubated with increasing amounts of endothelin-1, but not of a control peptide, the cell immunolabeling, as quantified by flow cytometry analysis, was decreased to a plateau of about 50% of maximum



**FIG. 5.** Mapping of discontinuous epitopes of anti-hETBR antibodies by pepsin analysis of extracellular regions of hETBR. The reactivity of overlapping peptides, covering the entire N-terminal region, and the three extracellular loops of hETBR, was tested using a representative B3 serum from an hETBR DNA-immunized animal (upper panel). Two regions (peptides B1-B4 and C17-C22, whose sequences are indicated below) appear strongly immunoreactive. The same result (not shown) was obtained using another B3 serum. The location of these two linear epitopes on the N-terminal extremity of hETBR is schematically represented in the lower panel (the first 26 residues, corresponding to the signal peptide sequence, are not represented).



**FIG. 6.** Competition between ET-1 and anti-ETBR antibodies for hETBR binding. Flow cytometry experiments were performed with hETBR-expressing CHO cells, using anti-ETBR serum (from the same B3 sample as that used for receptor epitope mapping, Fig. 5) diluted 1:1000, and increasing concentrations of endothelin-1 (ET-1, ★) or of a control 21-amino acid-peptide (■). Data are the mean – SD of three independent experiments. Similar results were obtained using anti-hETBR antibodies from two other B3 sera. ET-1 specifically but partially competes (maximum inhibition of  $\approx 50\%$ ) with anti-hETBR antibodies for receptor binding, with an IC<sub>50</sub> of  $\approx 0.15$  nM. ET-1, endothelin 1.

binding, reached for an ET-1 concentration close to 0.15 nM. Very similar results were observed for the two other B3 bleedings, although the plateau for maximum inhibition, reached for same ET-1 concentration, was slightly higher (around 70-75 % of maximum binding, not shown). In agreement with these results, confocal microscopy observations also revealed that preincubation of anti-hET<sub>B</sub>R-expressing cells with ET-1 greatly reduced the membrane labeling by anti-ET<sub>B</sub>R antibodies (not shown). Since we observed only a partial inhibition of antibody binding under both these experimental conditions, these results indicate that a fraction of antibodies present in these bleedings clearly recognize receptor regions structurally and/or functionally distinct from the endogenous ligand binding site. However, since the reverse competition (i.e. the possible inhibition by antibodies of labeled ET-1 binding) was not tested for any serum, our present results cannot help to delineate precisely the ligand binding domain but only could suggest that this domain might interact (directly or indirectly) with at least one of the two identified N-terminal linear epitopes (aa 25-39 and/or 65-81) recognized by the antibodies.

## **Discussion**

Production of antibodies against membrane receptors in their native conformation, with a view to developing molecular tools for fundamental or applied (e.g. clinical) research, remains technically very difficult. This is particularly crucial when addressing G-protein-coupled receptors (GPCRs), since their large-scale purification for immunization purposes is greatly hampered by a generally low expression level and, above all, by a tight transmembrane insertion through seven helical domains, two major problems to which should be added low immunogenicity due to high sequence homologies between mammalian species. GPCRs constitute one of the largest protein superfamilies, their genes comprising around 5% of mammalian genomes. Furthermore, and owing to their key roles in signal transduction, GPCRs are estimated to represent the targets for more than 50% of pharmaceutical drugs (Schlyer and Horuk, 2006; Lundstrom, 2009), emphasizing the need to develop immunological tools for their study (Hutchings et al., 2010). Among GPCRs, the human B receptor for the endothelin-1 peptide (hET<sub>B</sub>R) has attracted the attention of several research groups because of its involvement in cancer, particularly in angiogenesis and development of metastases (Salani et al., 2000; Dong et al., 2005; Spinella et al., 2009) and also in tumor escape from immune surveillance, as more recently discovered (Buckanovich et al., 2008). We show in this study that genetic immunization coupled to electrotransfer, with or without

cardiotoxin pretreatment, appears to be a promising technique for generating antibodies to the native form of hET<sub>B</sub>R, and probably to various GPCRs.

Under our experimental conditions, three DNA injections coupled to electroporation were sufficient to reach high levels of antibodies against the native hET<sub>B</sub>R, as revealed by flow cytometry analysis of intact cells. Our results emphasize the value of applying an electric field to tissues, which increases DNA uptake and gene expression (Mir et al., 1999), as we recently demonstrated in a comparative study of different genetic immunization protocols in a different model (Alexandrenne et al., 2009), and as also reported by others (Kaptein et al., 2008). Our results also suggest that cardiotoxin pretreatment could accelerate the production of specific antibodies during the course of the immunization protocol (probably through to the recruitment of abundant antigen-presenting cells at the site of injection, Costagliola et al., 1998), which could be advantageous for poorly immunogenic proteins. Another observation of technical interest is the crucial importance of the cell boost following DNA injections (prime-boost strategy) for enhancing antibody titers, confirming previous reports (Nagata et al., 2003; Parise et al., 2008), including ours (Tymciu et al., 2004, Alexandrenne et al., 2009; Alexandrenne et al., 2010). It may be noted in this connection that the negative results of our additional control experiments, using animals injected with hET<sub>B</sub>R-expressing cells yet without any previous DNA injection, exclude the possibility that the generation of antibodies detected 7 days after the cell injection was solely due to this cellular boost itself. By contrast, this observation clearly indicates that the role of the cell boost is actually to efficiently stimulate memory B lymphocytes already expanded after several DNA injections. Prime-boost DNA immunization, aided by electroporation and cardiotoxin treatment, therefore appears to be a highly successful procedure for the large-scale production of anti-membrane hET<sub>B</sub>R antibodies. In particular it appears much simpler than conventional protein immunization techniques, which require, for immunization purposes, not only overproduction of membrane recombinant proteins in various cellular expression systems, but also protein extraction and renaturation procedures. These technical steps are time-consuming and complicated, and need intensive optimization for each individual type of protein (Popot, 2010). However, it should be recognized that the new strategy for cell-free expression of membrane proteins (Klammt et al., 2007a), interestingly applied to producing functional hET<sub>B</sub>R (Klammt et al., 2007b), also appears to be an attractive and rather simple approach to the generation of correctly folded receptor probably directly suitable for immunizations.

Taking advantage of the very high number of serum samples that we generated in this study, we undertook to develop an alternative new screening method for antibodies

directed against membrane hET<sub>B</sub>R, which would be less time-consuming than flow cytometry. We describe here a new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) performed on unfixed cells in suspension, whose characteristics meet these requirements. Indeed, comparison of the results obtained using this new ELISA with those derived from flow cytometry analysis, for a very large collection of different sera, reveals a very strong correlation, while the time required for sample analysis was considerably reduced. The development of this new technique therefore allows the assay of many thousands of samples in a reasonable time, as required for instance after cell fusion for antibody screening in hybridoma supernatants.

The successful cell labeling that we obtained in confocal microscopy experiments indicate that our anti-hET<sub>B</sub>R antibodies are also applicable to immunocytochemical studies on paraformaldehyde-fixed cells. These antibodies display strong membrane labeling not only on cells transfected with recombinant hET<sub>B</sub>R but also on various human melanoma cell lines, with a signal intensity perfectly correlated with that observed in flow cytometry experiments. This result is of importance since it indicates that immunocytochemistry using these antibodies, a technique that is simpler to implement than flow cytometry, is well suited to the detection of overexpression of membrane hET<sub>B</sub>R on tumor cells. Since no correlation was found between immunofluorescence signal intensity and hET<sub>B</sub>R mRNA expression, at least in the three melanoma cell lines that we analyzed, the present results suggest that direct immunocytochemistry using the present antibodies is much more relevant than mRNA PCR in assessing the expression of membrane hET<sub>B</sub> receptors. Such antibodies might thus be applicable to *in vitro* diagnosis, revealing hET<sub>B</sub> receptors not only in malignant cells but also possibly on the endothelium of newly developed intratumoral vessels.

Epitope mapping analysis, performed using coated linear peptides, reveals that the antibodies recognized essentially two regions (residues E27-L39 and S65-P81) in the N-term extracellular domain of the mature ET<sub>B</sub>R. These results, which indicate that these two regions constitute immunodominant linear epitopes, do not, however, exclude the possibility that antibodies could also recognize conformational epitopes. It is striking to note that the only other antibodies obtained until now against hET<sub>B</sub>R whose epitopes have been described (Yamaguchi et al., 2004) were shown to bind almost exactly the same regions (i.e. residues E27-Q41 and V71-I85), suggesting the immunodominant nature of these domains. Importantly, since these two N-terminus regions that we identified in the receptor contain numerous amino acids that differ between hET<sub>B</sub>R and hET<sub>A</sub>R (Adachi et al., 1991) and between human and murine ET<sub>B</sub>R (Wilkie et al., 1993), the present data afford a structural

basis for the high specificity of our antisera for hET<sub>B</sub>R as described above. In addition, the observation that ET-1 partly inhibits antibody binding might shed some light on the location of its binding domain. In fact, the precise delineation of the ET-1 binding site on ET<sub>B</sub>R remains a subject of controversy, despite the huge number of publications devoted to the question: numerous receptor domains have been implicated in ET-1 binding, including several transmembrane helices, TM1 and TM2 (Wada et al., 1995), TM3 (Lee et al., 1994) or TM5 (Boivin et al., 2004). To our knowledge, however, the two receptor regions that we identified here in the N-terminal domain have never been reported to play a direct role in endogenous ligand binding. Consequently, we think that our present results, rather than suggesting that the ET-1 binding domain overlaps one or other of these antibody extracellular segments, may more likely indicate that ET-1 binding triggers at a distance a conformational change of the receptor in at least one of these two N-terminal regions, reflecting a functional relationship between ET-1 and antibody-binding domains. If this is true, one can reasonably think that, conversely, antibodies might modulate ET-1 binding, i.e. could display pharmacological activities. This important point is currently under investigation.

In conclusion, we have shown here that DNA immunization, when coupled to electrotransfer and cardiotoxin treatment is a simple and very efficient method for the generation of polyclonal antibodies against the native conformation of human ET<sub>B</sub>R, a membrane receptor belonging to the GPCR family. These antibodies can be readily used for immunocytochemical analysis, a method that we show here to be more relevant than mRNA PCR in assessment of receptor expression, at least in the different melanoma cells that we tested. Above all, the method described here, as well as the ELISA screening test that we also developed, can now be used to raise monoclonal anti-hET<sub>B</sub>R antibodies, which is progress in our laboratory. Such antibodies might help not only to elucidate the functions of hET<sub>B</sub>R in the pathogenesis of several diseases, including cancers, but also it is to be hoped to have therapeutic effects. In this connection, it is worth noting that so far none of the thirty monoclonal antibodies that have been approved for therapeutic use in humans are directed against GPCR, whereas there are over 400 approved new chemical entity drugs that target these receptors (Hutchings et al., 2010). This situation probably reflects in part the above-mentioned difficulties in producing large amounts of correctly folded recombinant human proteins for immunization procedures. We hope that the method described here will serve to further the use of antibodies for fundamental studies as well as for therapy and diagnosis.

## Acknowledgements

This work was supported by bioMérieux and by institutional funds from the Commissariat à l’Energie Atomique (CEA, France) and from the Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche (EA 3515 Université Paris Diderot). We thank Dr. David Marsh for correcting the manuscript.

## Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

## References

- Adachi, M., Yang, Y.Y., Furuichi, Y., and Miyamoto, C. (1991). Cloning and characterization of cDNA encoding human A-type endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* **180**, 1265-72.
- Alexandrenne, C., Wijkhuisen, A., Dkhissi, F., Hanoux, V., Créminon, C., Boquet, D., and Couraud, J.Y. (2009). Generating antibodies against the native form of the human prion protein (hPrP) in wild-type animals: a comparison between DNA and protein immunizations. *J. Immunol. Methods* **341**, 41-49.
- Alexandrenne, C., Wijkhuisen, A., Dkhissi, F., Hanoux, V., Priam, F., Allard, B., Boquet, D., and Couraud, J.Y. (2010). Electrotransfer of cDNA coding for an heterologous prion protein (PrP) generates autoantibodies against native murine PrP in wild-type mice. *DNA Cell Biol.* **29**, 121-31.
- Aubin, J., Létourneau, M., Francoeur, E., Burgeon, E., and Fournier, A. (2008). Identification of ETA and ETB binding domains using ET-derived photoprobes. *Biochimie* **90**, 918-29.
- Bagnato, A., and Catt, K.J. (1998). Endothelins as autocrine regulators of tumor cell growth. *Trends Endocrin. Met.* **9**, 378-83.
- Bagnato, A., and Spinella, F. (2003). Emerging role of endothelin-1 in tumor angiogenesis. *Trends Endocrin. Met.* **14**, 44-50.
- Bagnato, A., and Rosano, L. (2008). The endothelin axis in cancer. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **40**, 1443–51.
- Bagnato, A., Spinella, F., and Rosano, L. (2008). The endothelin axis in cancer: the promise and the challenges of molecularly targeted therapy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **86**, 474-84.
- Baton, F., Deruyffelaere, C., Chapin, M., Prod’homme, T., Charron, D., Al-Daccak, R., and Alcaide-Loridan, C. (2004). Class II transactivator (CIITA) isoform expression and activity in melanoma. *Melanoma Res.* **14**, 453–61.
- Binder, C., Hagemann, T., Sperling, S., Schulz, M., Pukrop, T., Grimshaw, M.J., and Ehrenreich, H. (2009). Stromal endothelin B receptor-deficiency inhibits breast cancer growth and metastasis. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 2452-60.
- Boivin, S., Tessier, S., Aubin, J., Lampron, P., Detheux, M., and Fournier, A. (2004). Identification of a binding domain of the endothelin-B receptor using a selective IRL-1620-derived photoprobe. *Biochemistry* **43**, 11516-25.
- Buckanovich, R.J., Facciabene, A., Kim, S., Benecia, F., Sasaroli, D., Balint, K., Katsaros, D., O’Brien-Jenkins, A., Gimotty, P.A., and Coukos, G. (2008). Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. *Nat. Med.* **14**, 28-36
- Costagliola, S., Rodien, P., Many, M.C., Ludgate, M., and Vassart, G. (1998). Genetic immunization against the human thyrotropin receptor causes thyroiditis and allows production of monoclonal antibodies recognizing the native receptor. *J. Immunol.* **160**, 1458-65.
- Dong, F., Zhang, X., Wold, L.E., Ren, Q., Zhang, Z., and Ren, J. (2005). Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1. *Br. J. Pharmacol.* **145**, 323-33.
- Egidy, G., Eberl, L.P., Valdenaire, O., Irmiler, M., Majdi, R., Diserens, A.C., Fontana, A., Janzer, R.C., Pinet, F., and Juillerat-Jeanneret, L. (2000). The endothelin system in human glioblastoma. *Lab. Invest.* **80**, 1681-9.
- Fujimoto, A., Takatsuka, S., Ishida, I., and Chiba, J. (2009). Production of human antibodies to native cytokine receptors using the genetic immunization of KM mice. *Hum Antibodies* **18**, 75-80.
- Goldie, R.G. (1999). Endothelins in health and disease: an overview. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **26**, 145-8.

- Grassi, J., Frobert, Y., Pradelles, P., Chercuitte, F., Gruaz, D., Dayer, J.M., and Poubelle, P.E. (1989). Production of monoclonal antibodies against interleukin-1 alpha and -1 beta. Development of two enzyme immunometric assays (EIA) using acetylcholinesterase and their application to biological media. *J. Immunol. Methods* **123**, 193-210.
- Gupta, A., Décaillot, F.M., Gomes, I., Tkalych, O., Heimann, A.S., Ferro, E.S., and Devi, L.A. (2007). Conformation state-sensitive antibodies to G-protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **282**, 5116-24.
- Hoshi, N., Sugino, T., and Suzuki, T. (2009). Expression of endothelin system in neuroblastic tumors: close association of endothelin-1 and endothelin B receptor expression with differentiation of tumor cells. *Med. Mol. Morphol.* **42**, 110-7.
- Hutchings, C.J., Koglin, M., and Marshall, F.H. (2010). Therapeutic antibodies directed at G protein-coupled receptors. *MAbs.* **2**, 594-606.
- Jungbauer, A., and Kaar, W. (2007). Current status of technical protein refolding. *J. Biotechnol.* **128**, 587-96.
- Kandalaf, L.E., Facciabene, A., Buckanovich, R.J., and Coukos G. (2009). Endothelin B receptor, a new target in cancer immune therapy. *Clin. Cancer Res.* **15**, 4521-28.
- Kaptejn, S.J., Jungscheleger-Russell, J., Martínez-Martínez, P., Beisser, P.S., Lavreysen, H., Vanheel, A., De Baets M.H., Bruggeman, C.A., Vink, C., and Losen, M. (2008). Generation of polyclonal antibodies directed against G protein-coupled receptors using electroporation-aided DNA immunization. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **58**, 27-31.
- Klammt, C., Schwarz, D., Eifler, N., Engel, A., Piehler, J., Haase, W., Hahn, S., Dötsch, V., and Bernhard, F. (2007a). Cell-free production of G protein-coupled receptors for functional and structural studies. *J. Struct. Biol.* **158**, 482-93.
- Klammt, C., Srivastava, A., Eifler, N., Junge, F., Beyermann, M., Schwarz, D., Michel, H., Doetsch, V., and Bernhard, F. (2007b). Functional analysis of cell-free-produced human endothelin B receptor reveals transmembrane segment 1 as an essential area for ET-1 binding and homodimer formation. *FEBS J.* **274**, 3257-69.
- Kondoh, M., Miyazaki, H., Wanatabe, H., Shibata, S., Yanagisawa, M., Masaki, T., and Murakami, K. (1990). Isolation of anti-endothelin receptor monoclonal antibodies for use in receptor characterization. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **172**, 503-10.
- Kusuhara, M., Yamaguchi, K., Nagasaki, K., Hayashi, C., Suzaki, A., Hori, S., Handa, S., Nakamura, Y., and Abe, K. (1990). Production of endothelin in human cancer cell lines. *Cancer Res.* **50**, 3257-61.
- Lahav, R. (2005). Endothelin receptor B is required for the expansion of melanocyte precursors and malignant melanoma. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 173-80.
- Lättig, J., Oksche, A., Beyermann, M., Rosenthal, W., and Krause, G. (2009). Structural determinants for selective recognition of peptide ligands for endothelin receptor subtypes ETA and ETB. *J. Pept. Sci.* **15**, 479-91.
- Laune, D., Molina, F., Ferrières, G., Villard, S., Bès, C., Rieunier, F., Chardès, T., and Granier, C. (2002). Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *J. Immunol. Methods* **267**, 53-70.
- Lee, J.A., Brinkmann, J.A., Longton, E.D., Peishoff, C.E., Lago, M.A., Leber, J.D., Cousins, R.D., Gao, A., Stadel, J.M., Kumar, C.S., et al. (1994). Lysine 182 of endothelin B receptor modulates agonist selectivity and antagonist affinity: evidence for the overlap of peptide and non-peptide ligand binding sites. *Biochemistry* **33**, 14543-49.
- Levin, E.R. (1995). Endothelins. *N. Engl. J. Med.* **333**, 356-63.
- Lundstrom, K. (2009). An overview on GPCRs and drug discovery: structure-based drug design and structural biology on GPCRs. *Meth. Mol. Biol.* **552**, 51-66.
- Mir, L.M., Bureau, M.F., Gehl, J., Rangara, R., Rouy, D., Caillaud, J.M., Delaere, P., Branellec, D., Schwartz, B., and Scherman, D. (1999). High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**, 4262-7.
- Nagata, S., Salvatore, G., and Pastan, I. (2003). DNA immunization followed by a single boost with cells: a protein-free immunization protocol for production of monoclonal antibodies against the native form of membrane proteins. *J. Immunol. Methods*, **280** 59-72.
- Nelson, J.B., Hedican, S.P, George, D.J., Reddi, A.H., Piantadosi, S., Eisenberger, M.A., and Simons, J.W. (1995). Identification of endothelin-1 in the physiopathology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat. Med.* **1**, 944-49.
- Paolillo, M., Russo, M.A., Curti, D., Lanni, C., and Schinelli, S. (2010). Endothelin B receptor antagonists block proliferation and induce apoptosis in glioma cells. *Pharmacol. Res.* **61**, 306-15.
- Parise, C.B., Lisboab, B., Takeshitab, D., Sacramento, C.B., Zveiter de Moraesa, J., and Hana, S. (2008). Humoral immune response after genetic immunization is consistently improved by electroporation. *Vaccine* **26**, 3812-3817.

- Pichurin, P., Yan, X.M., Farilla, L., Guo, J., Chazenbalk, G.D., Rapoport, B., and McLachlan, S.M. (2001). Naked TSH receptor DNA vaccination: A TH1 T cell response in which interferon-gamma production, rather than antibody, dominates the immune response in mice. *Endocrinology* **142**, 3530-6.
- Popot, J.L. (2010). Amphipols, nanodiscs, and fluorinated surfactants: three nonconventional approaches to studying membrane proteins in aqueous solutions. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 737-75.
- Rosanò, L., Cianfrocca, R., Masi, S., Spinella, F., Di Castro, V., Biroccio, A., Salvati, E., Nicotra, M.R., Natali, P.G., and Bagnato, A. (2009). Beta-arrestin links endothelin A receptor to beta-catenin signaling to induce ovarian cancer cell invasion and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **106**, 2806-11.
- Rubanyi, G.M., and Polokoff, M.A. (1994). Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* **46**, 325-415.
- Salani, D., Taraboletti, G., Rosanò, L., Di Castro, V., Borsotti, P., Giavazzi, R., and Bagnato, A. (2000). Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am. J. Pathol.* **157**, 1703-11.
- Saldana-Caboverde, A., and Kos, L. (2010). Roles of endothelin signaling in melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**, 160-70.
- Schlyer, S., and Horuk, R. (2006). I want a new drug: G-protein-coupled receptors in drug development. *Drug Discov. Today* **11**, 481-93.
- Shah, R. (2007). Endothelins in health and disease. *Eur. J. Int. Med.* **18**, 272-82.
- Shichiri, M., Hirata, Y., Nakajima, T., Ando, K., Imai, T., Yanagisawa, M., Masaki, T., and Marumo, F. (1991). Endothelin-1 is an autocrine/paracrine growth factor for human cancer cell lines. *J. Clin. Invest.* **87**, 1867-71.
- Spinella, F., Rosanò, L., Di Castro, V., Decandia, S., Nicotra, M.R., Natali, P.G., and Bagnato, A. (2007). Endothelin-1 and endothelin-3 promote invasive behavior via hypoxia-inducible factor-1-alpha in human melanoma cells. *Cancer Res.* **67**, 1725-34.
- Spinella, F., Garrafa, E., Di Castro, V., Rosanò, L., Nicotra, M.R., Caruso, A., Natali, P.G., and Bagnato, A. (2009). Endothelin-1 stimulates lymphatic endothelial cells and lymphatic vessels to grow and invade. *Cancer Res.* **69**, 2669-76.
- Tymciuk, S., Wijkhuisen, A., Sagot, M.A., Frobert, Y., Grassi, J., Créminon, C., Couraud, J.Y., and Boquet, D. (2002). Use of DNA immunization to produce polyclonal antibodies against the native human neurokinin-1 receptor (NK1R) for substance P. *J. Neuroimmunol.* **128**, 23-30.
- Tymciuk, S., Durieux-Alexandrenne, C., Wijkhuisen, A., Créminon, C., Frobert, C., Grassi, J., Couraud, J.Y., and Boquet, D. (2004). Enhancement of antibody response in DNA vaccination using a vector encoding a universal T-helper cell epitope. *DNA Cell Biol.* **23**, 395-402.
- Yamaguchi, T., Arimoto-Tahara, I., Fujiyoshi, Y., and Doi, T. (2004). Characterization and application of monoclonal antibodies against human endothelin B receptor expressed in insect cells. *Biotechnol. Lett.* **26**, 293-99.
- Wada, K., Hashido, K., Terashima, H., Adachi, M., Fujii, Y., Hiraoka, O., Furuichi, Y., and Miyamoto, C. (1995). Ligand binding domain of the human endothelin-B subtype receptor. *Protein Expr. Purif.* **6**, 228-36.
- Wilkie, T.M., Chen, Y., Gilbert, D.J., Moore, K.J., Yu, L., Simon, M.I., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (1993). Identification, chromosomal location, and genome organization of mammalian G-protein-coupled receptors. *Genomics* **18**, 175-84.

## 2.7. Conclusions et perspectives – Article “polyclonaux”

La production d’anticorps capables de reconnaître la conformation native de protéines membranaires n’est pas une tâche facile, en particulier dans le cas des RCPGs [318]. En effet, ces récepteurs à 7 passages transmembranaires constituent des antigènes “problématiques”, difficiles à produire *in vitro* et surtout difficiles à stabiliser dans une conformation fonctionnelle. Ainsi, les anticorps reconnaissant ces récepteurs dans leur contexte physiologique sont plutôt rares et ceux capables de moduler les propriétés pharmacologiques des RCPGs sont quasiment inexistants. Cette observation contraste avec le fait que les RCPGs constituent des cibles pharmacologiques extrêmement attractives pour lesquelles le besoin de nouveaux agents pharmacologiques se fait de plus en plus sentir [318].

Dans cet article, nous proposons une méthode efficace, relativement simple et potentiellement applicable à tous les RCPGs (ou autres antigènes membranaires), pour produire des anticorps polyclonaux capables de se lier à la conformation native des RCPGs. En prenant comme modèle le récepteur ETB des endothélines, nous avons montré que la technique d’immunisation génique est particulièrement adaptée à la production d’anticorps anti-RCPGs, dans le but d’une utilisation pharmacologique. Cette approche permet d’éviter la plupart des désagréments liés à la préparation d’un immunogène membranaire puisque le récepteur est directement produit *in vivo*, ce qui favorise également une présentation au système immunitaire dans une conformation native. Ainsi, grâce à cette stratégie, des anticorps polyclonaux murins se fixant au récepteur ETB humain exprimé à la surface de plusieurs lignées cellulaires ont été obtenus. La liaison des anticorps polyclonaux, à la fois sur des cellules “saines”, transfectées avec le récepteur sauvage, et sur des cellules tumorales de mélanome, indique que certains anticorps présents dans le sérum des animaux pourraient potentiellement servir d’agents diagnostiques ou thérapeutiques. Cette hypothèse est appuyée par le fait la liaison des sera anti-ETBR est partiellement inhibée par l’ajout d’ET-1, ce qui suggère que certains anticorps pourraient être des modulateurs pharmacologiques du récepteur ETB. A la lumière de ces résultats, l’immunisation génique apparaît véritablement comme une approche très efficaces pour générer des anticorps à potentiel thérapeutique. Dans ce contexte, nous avons donc utilisé cette technique, couplée à un criblage sur cellules vivantes (non fixées) surexprimant ETBR, afin de produire et de sélectionner des anticorps monoclonaux anti-ETBR, reconnaissant spécifiquement le récepteur dans son contexte membranaire et possédant potentiellement des activités pharmacologiques.

### **3. Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux anti-ETBR**

Au cours de ces trois années, deux fusions cellulaires ont été réalisées à environ un an d'intervalle, dans le but de produire des anticorps monoclonaux anti-ETBR. Au total, un panel de 27 anticorps monoclonaux anti-ETBR a été isolé, avec une représentation de tous les isotypes d'IgG, plus trois IgM (Figure 51). Parmi les 24 IgG, une seule a été sélectionnée lors de la première fusion (le rendomab-B1) et a fait l'objet d'une caractérisation poussée. Les 23 autres IgG, obtenues plus tardivement (fin 2010), sont encore dans des phases de caractérisation préliminaires (voir paragraphes 3.3 – 3.7).

#### *3.1. Première fusion cellulaire «ETBR» : production du rendomab-B1*

La première fusion cellulaire impliquant ETBR a directement suivi le premier protocole d'immunisation, en dépit des conditions suboptimales générées par un nombre de rappels cellulaires probablement trop importants (voir paragraphe 2.4). Cette fusion a mis en jeu les deux meilleures souris (souris 1 et 10), présentant les taux d'anticorps spécifiques les plus élevés et a généré 487 puits comportant des hybridomes sur 960 au total (10 plaques de 96 puits). A la suite du premier criblage (en ELISA sur cellules), 35 puits positifs ont été détectés sur la base d'un signal mesuré 3 fois plus fort sur les cellules CHO-ETBR par rapport au signal obtenu sur des cellules CHO-WT. Cependant, après ensemencement des hybridomes positifs en plaque de 24 puits, seul un hybridome spécifique (le 3H7) a été identifié et soumis à des étapes de dilution limite (Figure 52). A la suite de trois cycles de dilutions limites, un clone « pur » d'hybridome a été obtenu, sécrétant un anticorps monoclonal spécifiquement dirigé contre le récepteur ETB. En effet, comme le montre la figure 53, le surnageant issu de l'hybridome 3H7 marque fortement les cellules CHO-ETBR alors qu'aucun marquage n'est détectable sur les cellules non transfectées. De plus, on observe une forte baisse du marquage lorsque les cellules CHO-ETBR sont préincubées avec de l'ET-1 afin d'induire l'internalisation du récepteur ETB. Ce premier anticorps ciblant spécifiquement ETBR a été produit en forte quantité, via l'induction de liquide d'ascite chez des souris irradiées, puis purifié par chromatographie d'affinité sur protéine A. D'un point de vue nomenclature, l'anticorps issu du puit 3H7 a été renommé ETBR 1 ou « rendomab-B1 ».



Figure 51. Isotypes des 27 anticorps isolés après deux campagnes d'immunisation et deux fusions ETBR.

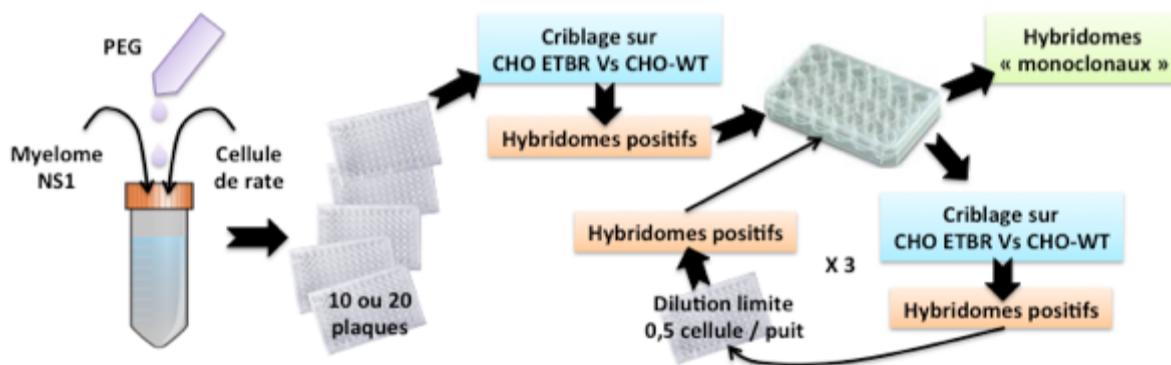


Figure 52. **Processus de criblage des hybridomes après la fusion cellulaire.** Après fusion des cellules de rate avec une lignée de myélome murin (NS1) par l'action du polyéthylène glycol (PEG), les cellules sont ensemencées dans 10 ou 20 plaques de 96 puits. Environ sept jours plus tard, les surnageants d'hybridome sont criblés pour leur spécificité vis à vis d'ETBR grâce à un test ELISA sur cellules. Les hybridomes positifs sont transférés en plaque de 24/48 puits, testés de nouveau pour valider leur réactivité contre ETBR puis ensemencés en plaque de 96 puits à de fortes dilutions afin d'isoler des clones « monoclonaux » positifs. Ce procédé est répété plusieurs fois (jusqu'à ce que tous les puits comportant des hybridomes, sur les plaques de dilution, soient positifs) avant d'isoler des clones « purs » produisant un seul et même anticorps.

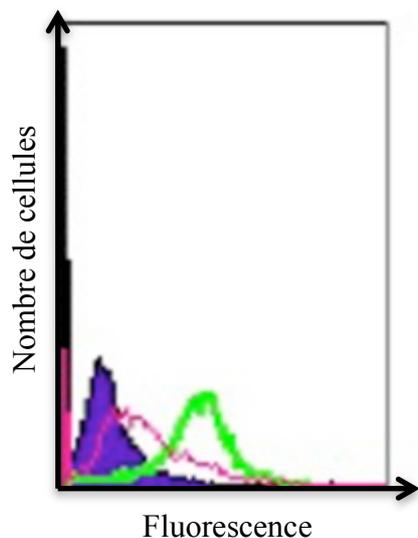


Figure 53. **Marquage spécifique du surnageant de l'hybridome 3H7 sur les cellules CHO-ETBR.** Des cellules CHO ETBR prétraitées (histogramme rose) ou non (histogramme vert) avec 100 nM d'ET-1 et des cellules CHO WT (histogramme violet) sont incubées avec le surnageant de l'hybridome 3H7. Le marquage est révélé grâce à un anticorps secondaire fluorescent et analyse par cytométrie en flux.

3.2. Article n°2: *In vitro* characterization of Rendomab-B1, a new antibody against the human endothelin B receptor, with antagonist properties: potential uses in oncology – Soumis à *EMBO J*

La production et l'étude de l'anticorps rendomab-B1 ont constitué le coeur du projet de thèse. Isolé en premier, le rendomab-B1 a fait l'objet d'une caractérisation précise qui a permis de mettre en évidence ses propriétés biochimiques et pharmacologiques prometteuses pour une future utilisation en tant qu'agent thérapeutique. L'étude du rendomab-B1 a également donné l'occasion d'explorer des aspects plus fondamentaux concernant la structure et le fonctionnement du récepteur ETB dans diverses lignées cellulaires normales ou cancéreuses. L'ensemble des résultats obtenus sur le rendomab-B1 est regroupé dans un article soumis à *EMBO Journal* en Novembre 2011 qui est exposé ci-après. Les résultats relatifs au rendomab-B1 ont également débouché sur la rédaction d'un brevet (PCT/EP2011/067390), déposé le 6 Octobre 2010.

Le rendomab-B1 est une IgG2b/κ qui a été générée grâce à la méthode d'immunisation génique. Cet anticorps est capable de lier spécifiquement le récepteur ETB à la surface cellulaire, avec une affinité subnanomolaire. En effet, des expériences utilisant des cellules CHO et HEK transfectées stablement avec ETBR, montrent une liaison forte (affinité de 0,5 nM) et très spécifique de l'anticorps. Par ailleurs, des tests de compétition démontrent que le rendomab-B1 inhibe la liaison de l'ET-1 sur ETBR, avec une meilleure efficacité que l'inhibiteur commercial de référence BQ788. De plus, les propriétés antagonistes suggérées par ces expériences de compétition sont confirmées par des tests pharmacologiques prouvant que le rendomab-B1 est capable de bloquer la voie de signalisation calcique déclenchée par les ETs. Ce blocage met en jeu deux mécanismes : (1) la compétition directe entre l'anticorps et l'ET-1 pour la fixation sur le récepteur ETB, (2) le déclenchement de l'internalisation du récepteur par le rendomab-B1 conduisant à une désensibilisation des cellules à la stimulation par l'ET-1. A notre connaissance, le rendomab-B1 est le premier anticorps anti-ETBR présentant une activité pharmacologique antagoniste. Des tests *in vitro* sur cellules HUVEC (connues pour exprimer ETBR) démontent que le rendomab-B1 est pharmacologiquement actif sur ces cellules et induit une forte baisse de la viabilité. Ces résultats suggèrent que le rendomab-B1 pourrait être utilisé pour inhiber l'axe ET-1/ETBR, dérégulé au niveau de l'endothélium vasculaire de certaines tumeurs [452].

Le rendomab-B1 a également été testé sur des lignées de mélanomes, connues pour surexprimer ETBR [447]. De façon surprenante, le rendomab-B1 se fixe faiblement et avec une mauvaise affinité à la surface des mélanomes malgré la présence de récepteurs ETB fonctionnels. Ce résultat négatif mais très intéressant suggère en fait la présence de récepteurs ETB structurellement modifiés (par rapport au récepteur sauvage) sur les mélanomes. Cette hypothèse est appuyée par l'étude comparative de la liaison de l'ET-1 et de sera polyclonaux anti-ETBR, sur des cellules transfectées et sur des lignées de mélanomes. En effet, la liaison de l'ET-1, qui illustre la présence de récepteurs membranaires fonctionnels, montre une forte différence d'expression entre les deux modèles cellulaires, alors que la fixation des sera polyclonaux (pouvant potentiellement lier des récepteurs fonctionnels ou non) indique un taux d'expression similaire. L'ensemble de ces données suggère qu'il existe une hétérogénéité structurale et fonctionnelle des récepteurs ETB exprimés à la surface des mélanomes et présente le rendomab-B1 comme un outil potentiel pour détecter et étudier ces différences structurales putatives. De plus, des résultats préliminaires sur le site de liaison du rendomab-B1 indiquent la reconnaissance d'un épitope conformationnel combinant une partie de la queue N-terminale et de la deuxième boucle extracellulaire du récepteur ETBR, ce qui permet d'émettre des hypothèses quant aux différences structurales qui pourraient exister entre les récepteurs ETB exprimés à la surface des mélanomes et ceux produits par les cellules « normales ». Pour conclure, ces résultats démontrent que le rendomab-B1 est non seulement un outil original pour étudier la structure et le rôle du récepteur ETB dans des conditions physiologiques ou pathologiques, mais aussi un agent thérapeutique potentiel par son action sur l'endothélium vasculaire.

## **ARTICLE n°2**

**In vitro characterization of Rendomab-B1, a new antagonist anti-endothelin receptor B monoclonal antibody with potential uses in oncology**

## ***In vitro* characterization of Rendomab-B1, a new antagonist anti-endothelin receptor B monoclonal antibody with potential uses in oncology**

Bertrand Allard<sup>1,a</sup>, Anne Wijkhuisen<sup>1,2,a\*</sup>, Frédérique Deshayes<sup>3</sup>, Fabienne Priam<sup>1,2</sup>, Patricia Lamourette<sup>4</sup>, Frédéric Ducancel<sup>1</sup>, Didier Boquet<sup>1</sup> and Jean-Yves Couraud<sup>1,2</sup>

a: the authors have contributed equally to the work

Running title: a novel anti-hET<sub>B</sub>R antagonist antibody

<sup>1</sup> CEA, iBiTecS, SPI, Laboratoire d'Ingénierie des Anticorps pour la Santé (LIAS), Bt. 136, CEA Saclay, F-91191 Gif sur Yvette, France.

<sup>2</sup> Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, EA 3515, F-91191 Gif sur Yvette, France.

<sup>3</sup> Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, IJM, UMR 7592 CNRS, F-75205 Paris, France.

<sup>4</sup> CEA, iBiTecS, SPI, Laboratoire d'Etudes et de Recherche en Immunoanalyse (LERI), Bt. 136, CEA Saclay, F-91191 Gif sur Yvette, France.

\* Corresponding author: Dr. Anne Wijkhuisen

CEA/DSV/iBiTec-S/SPI/LIAS

CEA Saclay, bâtiment 136

91191 Gif sur Yvette Cedex

Tel: +33 1 69 08 80 35

Fax: +33 1 69 08 59 07

## Abstract

Tumor-host interactions are an aspect of tumor biology increasingly considered as a key determinant for tumor growth and response to therapy. Tumor-associated stromal cells are often hijacked by neoplastic cells and subjected to molecular dysregulations in the aim of promoting tumor progression. Endothelin receptor B (ET<sub>B</sub>R) is a relevant candidate to influence tumor-host interplay as its overexpression and/or overactivation in the stromal compartment of some highly prevalent cancers correlates with tumor development and poor clinical outcome. Hence, ET<sub>B</sub>R blockade appears as a significant strategy for cancer therapy. In this study, we report the *in vitro* characterization of rendomab-B1, a new monoclonal antibody selectively recognizing the native form of human ET<sub>B</sub>R. Rendomab-B1 presents unprecedented characteristics compared to previously described anti-ET<sub>B</sub>R antibodies; this includes a potent antagonist property, an original epitope and inhibitory mechanism, and pharmacological activities on endothelial cells. Besides, rendomab-B1 impaired-binding on melanoma cell lines suggests the presence of “melanoma-specific” ET<sub>B</sub>R, harbouring structural differences compared to “wild-type” receptors. Collectively, our results underscore the interest of rendomab-B1 for both research and therapeutic applications dealing with ET<sub>B</sub>R.

Key words: endothelin receptor B / cancer / therapeutic antibody

## Introduction

The endothelin family is composed of three 21 amino acids isopeptides, namely ET-1, ET-2 and ET-3, which are produced by various organs including heart, kidney, intestine, lung and vascular endothelium (Rubanyi & Polokoff, 1994; Khimji & Rockey, 2010; Stojilkovic & Catt, 1996). Endothelin peptides intervene in a wide range of physiological functions such as cardiovascular homeostasis (Rodríguez-Pascual et al.; Brunner et al., 2006), neural crest development (Baynash et al., 1994; Pla & Larue, 2003), ovarian cycle (Meidan & Levy, 2007) and inflammation (Griswold et al., 1999; May et al., 1996). Among the three isoforms, ET-1 has been the most extensively studied, especially concerning its role on the local modulation of vascular tone (Masaki, 1995; Haynes & Webb, 1994). In addition to its physiological vasomodulator properties, ET-1 has been involved in a variety of pathological processes such as pulmonary hypertension (Abman, 2009), congestive heart failure (Handoko et al., 2011), cerebrovascular vasospasm (Vatter et al., 2011), chronic kidney disorders (Kohan, 2010) and more recently neoplasia (Bagnato et al., 2011; Nelson et al., 2003)

The relevance of the endothelin axis (endothelins and their cognate receptors) is now clearly established for a wide spectrum of malignancies including prostatic, ovarian, breast, colorectal, lung, bladder carcinomas, brain tumors, Kaposi's sarcoma and melanoma. Both preclinical and clinical data indicate that endothelins and/or endothelin receptors are abnormally expressed in many cancers and contribute to tumor growth (Gohji et al., 2001; Hoshi et al., 2009; Wulfing et al., 2005; Nelson et al., 1995). The molecular mechanisms and actors supporting the implication of the endothelin axis in tumorigenesis are numerous and simultaneously involve tumor cells themselves and the tumor microenvironment. Bagnato and colleagues have largely investigated these mechanisms, using various cancer models, and have shown that endothelins promote the "hallmarks of cancer" (Hanahan and Weinberg, 2011) including uncontrolled cell proliferation (Bagnato et al., 1997; Vacca et al., 2000; Bagnato et al., 1995), apoptosis resistance (Bufalo D et al., 2002; Nelson et al., 2005; Raymond et al., 2006), epithelial to mesenchymal transition (Rosanò et al., 2011; Bagnato et al., 2004), increased cell motility and invasiveness (Grimshaw et al., 2004; Spinella et al., 2007; Rosanò et al., 2002; Rosanò et al., 2009), and also angiogenesis (Bagnato & Spinella, 2003; Salani et al., 2000b; Wulfing et al., 2004; Salani et al., 2000a; Herrmann et al., 2007), lymphangiogenesis (Spinella et al., 2010; 2009), inflammatory cells recruitment (Grimshaw et al., 2002; Binder et al., 2009) and immune system escape (Buckanovich et al., 2008).

To mediate the above-mentioned pro-tumorigenic effects, endothelins activate two distinct G-protein coupled receptors: ET<sub>A</sub> receptors (ET<sub>A</sub>R) and ET<sub>B</sub> receptors (ET<sub>B</sub>R). Of the two receptor subtypes, ET<sub>B</sub>R is probably the one which harbours the most complex tumorigenic effects, and investigations dealing with its role in tumor development have been more limited. Actually, ET<sub>B</sub>R has been particularly studied in melanoma where it has been proposed as a tumor progression marker (Demunter *et al.*, 2001) as its overexpression correlates with tumor development and aggressiveness. In addition to its abnormal expression at the surface of certain cancer cells, ET<sub>B</sub>R dysregulation has been identified in the tumor stromal compartment, which is increasingly recognized as a key determinant of tumor growth (Mueller and Fusenig, 2004). Notably, ET<sub>B</sub>R expression in the tumor-surrounding endothelium of colorectal and ovarian carcinoma has been correlated with increased blood vessel formation (Egidy *et al.*, 2000) and decreased infiltration of anti-tumor immune effector cells (Buckanovich *et al.*, 2008), respectively. ET<sub>B</sub>R stromal upregulation has also been shown to promote tumor-associated macrophages (TAM) homing to breast tumors, thus favouring metalloproteinase-mediated invasiveness and metastatic dissemination (Binder *et al.*, 2009). Therefore, ET<sub>B</sub>R appears as pivotal player of the tumor-stroma interplay that regulates tumor angiogenesis, immunosurveillance and metastatic spread.

In this context, the development of new therapeutic agents potentially targeting and antagonizing the endothelin/ET<sub>B</sub>R pathway could be therapeutically useful for several highly prevalent cancers by impeding tumor-host crosstalk. For a decade, monoclonal antibodies have emerged as very attractive alternatives to conventional cancer treatments as reflected by the 12 approved monoclonal antibodies for oncology indications. Indeed, unlike « small molecules », therapeutic monoclonal antibodies are characterized by: (i) an increased specificity/selectivity allowing protein isoforms or oligomer discrimination (Kozer *et al.*, 2011), conformational change sensing (Gupta *et al.*, 2007) and thus a reduced toxicity, (ii) improved pharmacokinetics properties and a longer duration of action, (iii) additional modes of action relying on immune system recruitment, particularly interesting for cancer therapy (Ianello *et al.*, 2005), (iv) their amazing pharmacological modularity (due to the development of antibody fragments and engineering) enabling antibodies to be shaped to achieve the best therapeutic efficacy (Carter, 2006), (v) a higher success rate in late stage clinical phases (Reichert *et al.*, 2005). Therefore, monoclonal antibodies appear as ideal therapeutic molecules to interfere with cell surface targets involved in tumor development.

In this aim, we produced and characterized a new murine monoclonal antibody, named

rendomab-B1, specifically targeting human ET<sub>B</sub>R. To generate such an antibody we used an electroporation-aided DNA immunization strategy, favouring the production of pharmacologically active antibodies directed against the native form of membrane spanning proteins (Nagata *et al.*, 2003; Alexandrenne *et al.*, 2009a, 2009b ; Fujimoto *et al.*, 2009; Takatsuka *et al.*, 2010; Allard *et al.*, 2011). Rendomab-B1 *in vitro* characterization emphasized its original features compared to formerly produced anti-ET<sub>B</sub>R antibodies. Indeed, rendomab-B1 particularly stood out by its strong antagonist property, its interesting pharmacological activities on endothelial cells and its amazing ability to discriminate between ET<sub>B</sub> receptors expressed on melanoma versus non-cancerous cells, thus suggesting that melanoma-specific ET<sub>B</sub> receptors might exist. Finally, an epitope mapping allowed a preliminary prediction of rendomab-B1 binding site on hET<sub>B</sub>R. Together, these encouraging *in vitro* results present rendomab-B1 as an outstanding biological tool not only to block ET<sub>B</sub>R signalling pathway associated with tumorigenesis but also to investigate the molecular structure and role of ET<sub>B</sub>R in both normal and pathological conditions.

## Results

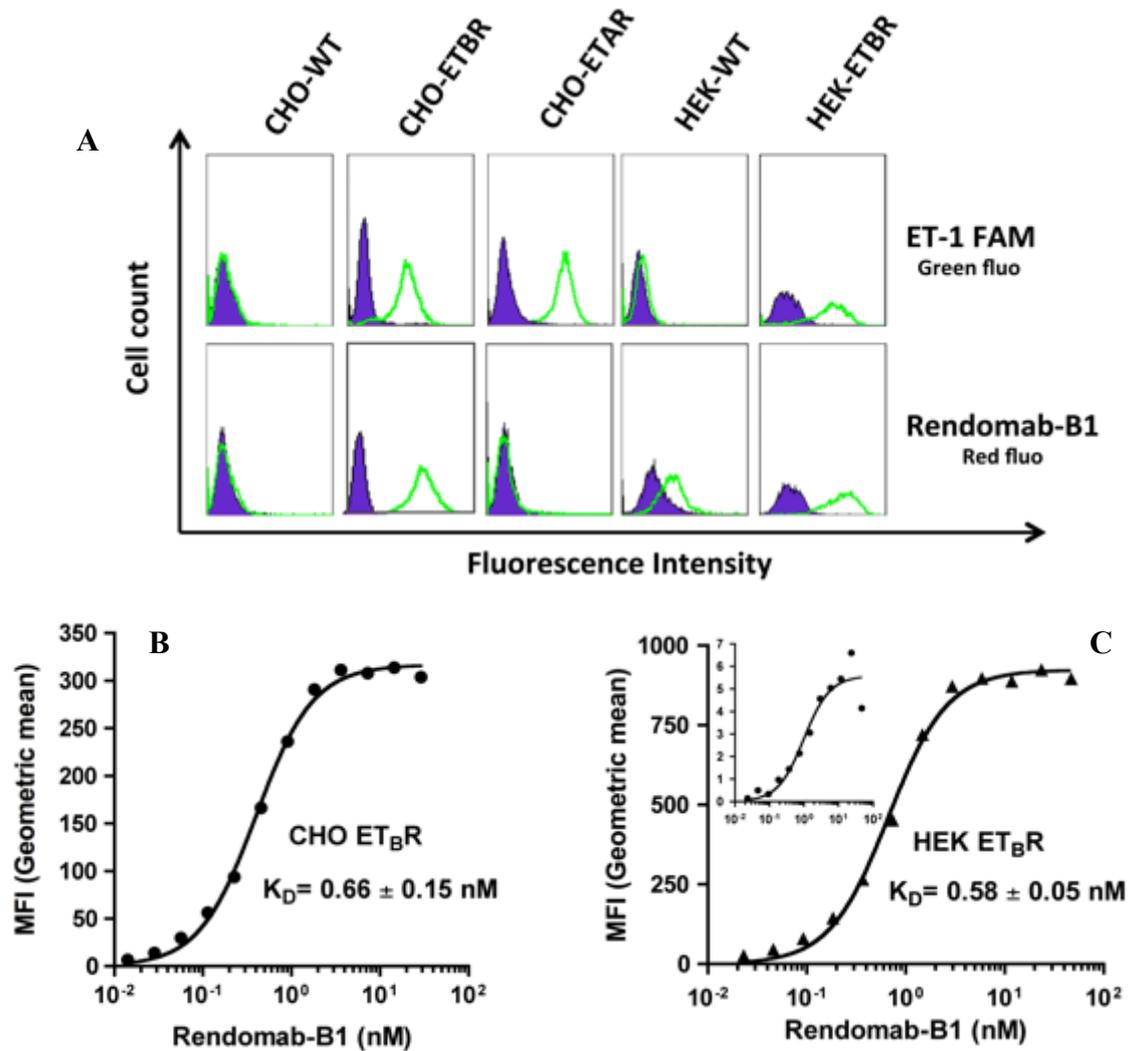
As we already demonstrated in a former paper (Allard *et al.*, 2011), DNA immunization is a powerful approach to generate specific polyclonal antibodies against hET<sub>B</sub>R (and more generally against GPCRs). Therefore, the same method of immunization was used in the present study to generate anti-hET<sub>B</sub>R monoclonal antibodies (supplementary figure 1A). Mice harbouring the highest ratio of specific antibodies (determined by flow cytometric analysis on untransfected and hET<sub>B</sub>R transfected CHO cells, supplementary figure 1B) were sacrificed and used for hybridoma production. Hybridoma supernatants were differentially screened for hET<sub>B</sub>R specificity using a cell-based ELISA with untransfected and hET<sub>B</sub>R transfected CHO cells. The reactivity and specificity of positive hybridoma were further confirmed by flow cytometric tests. This selection process led to the identification, cloning and stabilization of one pure specific hybridoma secreting a monoclonal antibody we named rendomab-B1. Rendomab-B1 was isotyped as an IgG2b/κ, produced in large quantities and purified with a protein A sepharose affinity chromatography column.

*Rendomab-B1 specifically targets native hET<sub>B</sub>R on recombinant cell lines without cross-reaction with hET<sub>A</sub>R.*

To confirm the specificity observed during the screening procedure with hybridoma supernatants, we checked the ability of the purified rendomab-B1 to recognize hET<sub>B</sub>R expressed on different cell lines. We used both hET<sub>B</sub>R stably transfected (CHO-ET<sub>B</sub>R and HEK-ET<sub>B</sub>R) and wild type cells. Using an indirect immunofluorescent staining coupled to flow cytometric analysis, we showed that rendomab-B1 specifically bound to hET<sub>B</sub>R CHO transfected cell line and not to untransfected wild type cells (Figure 1A, lower panels). We obtained similar results using hET<sub>B</sub>R and wild type HEK cells, excepted that a slight staining persisted on wild type HEK cells (known to ectopically express ET<sub>B</sub>R) indicating that rendomab-B1 was able to recognize the receptor at the surface a non-recombinant cell line. To finally validate rendomab-B1 specificity towards hET<sub>B</sub>R, we performed RNAi experiments, which revealed a specific 90 % decrease in cell surface rendomab-B1 binding in hET<sub>B</sub>R-silenced cells (pink histogram, lower panel).

Eventually, we tested the crossreactivity of rendomab-B1 with the endothelin A receptor subtype which harbours 63% amino acids identity with hET<sub>B</sub>R. Using hET<sub>A</sub>R stably transfected CHO cells, we showed that rendomab-B1 did not recognize hET<sub>A</sub>R, proving that rendomab-B1 is specifically directed against hET<sub>B</sub>R (Figure 1A, lower panel). Cross-

reactivity with rat ET<sub>B</sub>R was also negative (Supplementary figure 2). For all the above-mentioned experiments, the expression of endothelin receptors at cell surfaces was controlled using fluorescein-labeled ET-1 (ET-1 FAM, figure 1A, upper panel).



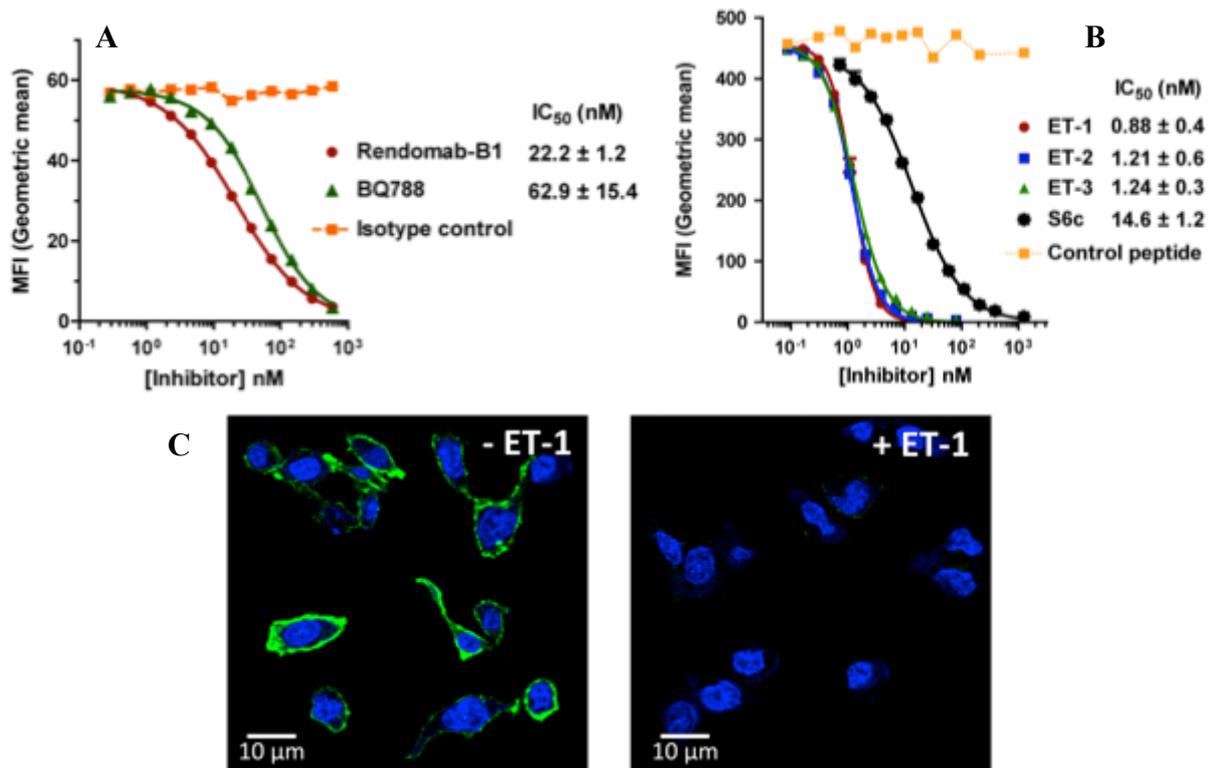
**FIGURE 1. Rendomab-B1 recognizes native hET<sub>B</sub>R on recombinant cell lines with a subnanomolar affinity.** (A) Cells were incubated with 50 nM rendomab-B1 and signals were revealed with R-PE-labeled goat anti-mouse polyclonal antibodies (green histograms, lower panel). Pink histograms stand for ET<sub>B</sub>R siRNA transfected cells. To control hET<sub>B</sub>R expression at cell surfaces, cells were exposed to ET-1-FAM (green histograms, upper panel). Shaded violet histograms correspond to cells incubated with buffer alone (upper panel) or with 50 nM of an isotype control antibody (lower panel). (B, C) To evaluate rendomab-B1 affinity, increasing concentrations of rendomab-B1 were incubated with CHO ET<sub>B</sub>R (B), HEK ET<sub>B</sub>R (C) or HEK WT (C, inset), during 24h at 4°C. Rendomab-B1 binding was measured by flow cytometry, and resulting binding curves, corresponding to Mean Fluorescence Intensities (MFI) in function of antibody concentrations, were plotted and fitted using GraphPad Prism software. Dissociation constants (K<sub>D</sub>) correspond to the mean ± s.d of five independent experiments.

*Rendomab-B1 binds to hET<sub>B</sub>R with a high affinity.*

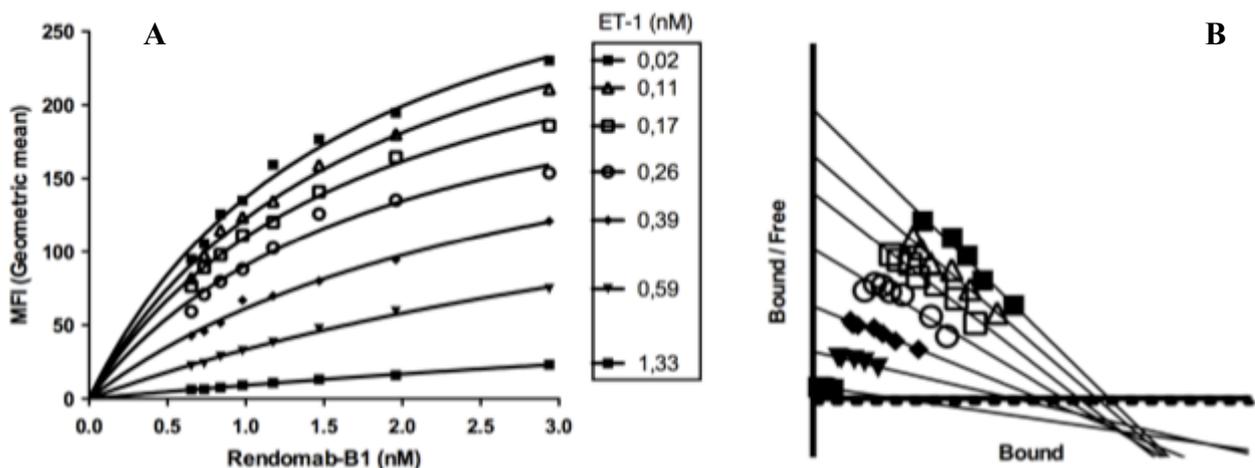
Dissociation or affinity constant ( $K_D$ ) is a very important biochemical parameter for therapeutic molecules and especially for antibodies, as it reflects compound potency, specificity and determines the relevant concentration range to use to observe potential pharmacological effects, at least *in vitro*. The precise affinity measurement of therapeutic molecules recognizing membrane embedded proteins is not an easy task, and dissociation constants determined using membrane preparations, purified proteins or epitopic fragments can sometimes be misleading compared to physiological binding parameters. Thus, we privileged flow cytometry with intact hET<sub>B</sub>R expressing cells, to assess rendomab-B1 affinity. As depicted on figure 1B and 1C, rendomab-B1 was able to bind to hET<sub>B</sub>R expressed on stably transfected CHO and HEK cells, with a remarkable affinity of  $660 \pm 150$  and  $580 \pm 50$  pM, respectively (mean  $\pm$  s.d). Moreover, despite a low but specific signal, a similar affinity constant was obtained with wild type HEK cells, showing that rendomab-B1 could recognize non recombinant hET<sub>B</sub>R expressing cells with a high affinity (Figure 1C inset). Since rendomab-B1 behaved similarly with CHO and HEK ET<sub>B</sub>R cells, characterization experiments were mainly performed on CHO ET<sub>B</sub>R cells (unless otherwise stated), which are more user-friendly than HEK ET<sub>B</sub>R cells.

*Rendomab-B1 competes with ET-1 binding to hET<sub>B</sub>R in a mixed-inhibitor fashion.*

A simple specific target recognition without any pharmacological activity, is sometimes sufficient for an antibody to be a suitable therapeutic agent. Nevertheless, in our case, an antibody that could inhibit natural ligand binding would be of particular benefit with a view to antagonizing the ET-1/ET<sub>B</sub>R signalling pathways, especially in endothelial cells. Therefore, prior to evaluate the potential activity of rendomab-B1 in pharmacological assays, we performed competition binding experiments to investigate whether it could interfere with ET-1 binding onto hET<sub>B</sub>R overexpressing cells. Still using flow cytometry, we established that rendomab-B1 could inhibit ET-1-FAM binding onto hET<sub>B</sub>R and, conversely, endothelins (ET-1, ET-2, ET-3) and sarafotoxin 6c (S6c) were able to prevent rendomab-B1 fixation (Figure 2A and 2B). Interestingly, we showed that the inhibition potency of rendomab-B1 was almost three fold superior to that of the well-described specific ET<sub>B</sub>R inhibitor peptide, BQ788 (IC<sub>50</sub> of 22 versus 63 nM approximately). The competition between rendomab-B1 and ET-1 was also demonstrated by confocal microscopy experiments in which rendomab-B1 staining on hET<sub>B</sub>R expressing CHO cells was largely attenuated by ET-1 addition (Figure 2C).



**FIGURE 2. Rendomab-B1 interferes with ET-1 binding onto hET<sub>B</sub>R and inversely.** (A) CHO-ET<sub>B</sub>R were incubated simultaneously with 10 nM ET-1-FAM and varying concentrations of rendomab-B1, BQ-788 or isotype control antibody. ET-1-FAM binding was measured using flow cytometry. (B) CHO-ET<sub>B</sub>R were incubated simultaneously with 3nM rendomab-B1 and varying concentrations of ET-1, ET-2, ET-3, Sarafotoxin 6c (S6c) or 21 amino acids control peptide. Rendomab-B1 binding was quantified by flow cytometry. For (A, B), inhibition binding curves stands for the plot of MFI values versus inhibitor concentrations. Curves were fitted using GraphPad Prism with the adequate dose-response equation and IC<sub>50</sub> ± s.d of three independent tests are presented. (C) Viable CHO-ET<sub>B</sub>R were stained with 50 nM rendomab-B1 (left picture) or with a combination of 50 nM rendomab-B1 plus 1 μM ET-1 (right picture). Nuclei were counterstained with DRAQ5 (Blue).



**FIGURE 3. Rendomab-B1 behaves like a mixed inhibitor towards hET<sub>B</sub>R.** (A, B) Both ET-1 and rendomab-B1 concentrations were varied and added simultaneously to CHO-ET<sub>B</sub>R cells. After a 24h incubation at 4°C, rendomab-B1 binding was measured by flow cytometry. Resulting binding curves are presented in (A). Scatchard representation of binding data is shown in (B). Data were analysed and fitted with the equations for linear competitive, uncompetitive, and mixed inhibition (GraphPad Prism). Statistical analyses (F test and Akaike's information criterion) were performed to identify the best fitting model. This experiment was repeated three times.

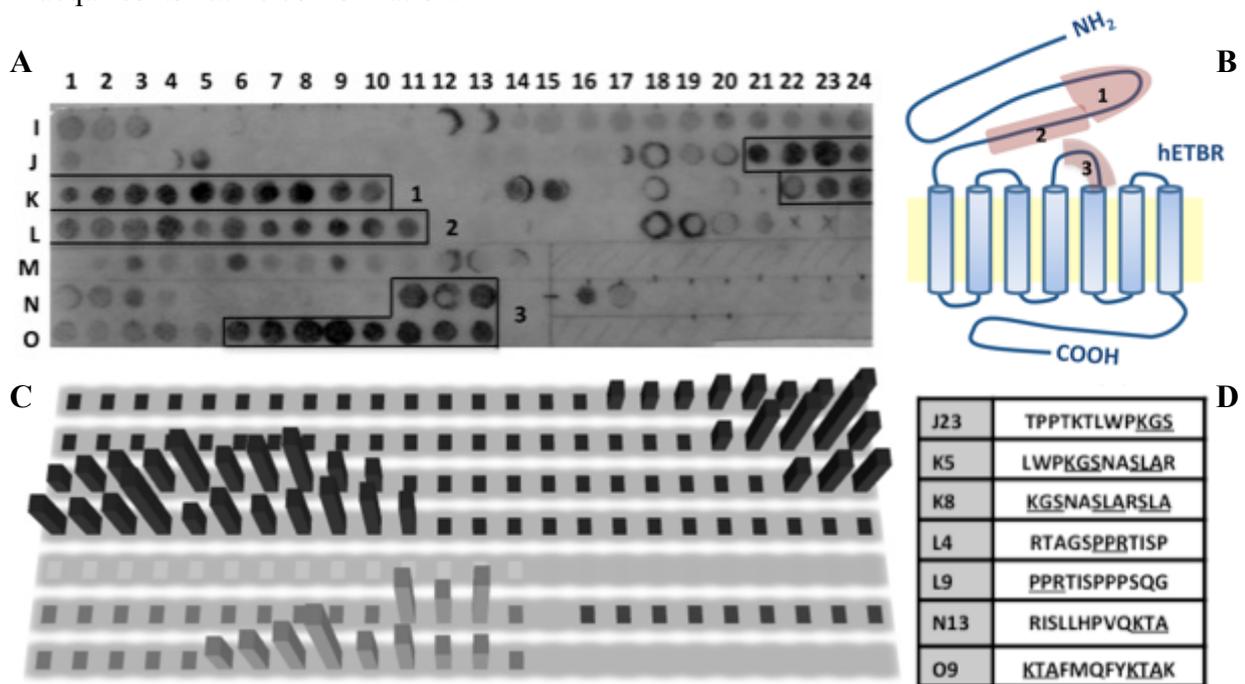
Most of small chemical inhibitors, as BQ788, are ligand analogues that compete with natural ligands for the same binding site in a mutually exclusive fashion. Accordingly, we wondered whether rendomab-B1 inhibitory mechanism was similar to that of BQ788 (a competitive inhibition mechanism). In this regard, we performed flow cytometric binding experiments in which both rendomab-B1 and ET-1 concentrations were varied. Resulting binding curves presented in figure 3A showed that ET-1 had a negative effect on both rendomab-B1 apparent affinity and maximal saturation. Therefore, corresponding Scatchard plots (Figure 3B inset) displayed a pattern of intersecting lines at a single point located below the x axis, indicating that rendomab-B1 and ET-1 compete for ET<sub>B</sub>R binding in a mixed inhibitor fashion. This mechanism was confirmed by statistical analyses (F-test and AIC criterion) and suggests that rendomab-B1 recognizes an epitope distinct from the receptor orthosteric site.

*Rendomab-B1 recognizes a discontinuous epitope composed of three extracellular sequences of hET<sub>B</sub>R.*

To get more insight into rendomab-B1 binding site on hET<sub>B</sub>R, we undertook an epitope mapping analysis using a set of 147 overlapping dodecapeptides, frameshifted by one amino acid, and corresponding to the hET<sub>B</sub>R three extracellular loops (E1, E2 and E3) and N-terminal tail. This peptide library was directly synthesized on a cellulose membrane by SPOT<sup>TM</sup> synthesis and peptides were considered as antigenically relevant if they were part of a consecutive serie of reactive spots, presenting at least one peak of signal three times higher than background (Shimizu *et al.*, 2004). Incubation of the membrane with rendomab-B1 revealed three discontinuous linear immunoreactive regions: two located within the N-terminal tail and one covering the main part of the second extracellular loop (Figure 4A, 4B and 4C). More precisely, immunoreactive spots J<sub>21</sub> to K<sub>10</sub> and K<sub>22</sub> to L<sub>11</sub> matched with amino acids residues 45-70 and 70-95 of the N-terminal domain whereas spots N<sub>11</sub> to N<sub>13</sub> and O<sub>6</sub> to O<sub>13</sub> corresponded to amino acids 251-277 of the loop E2. Interestingly, the most intensely stained consecutive spot serie (O<sub>6</sub> to O<sub>13</sub>), encompassing residues 259-PVQKTAFMQFYKTAKWWL<sub>-281</sub>, showed a correlation between the staining intensity and the apparition of the “KTA” sequence, with a maximum peak of signal (spot O9) when the two motifs “KTA” and “KTAK” were present in the dodecapeptide (Figure 4D). Thus, the peptidic sequence corresponding to the spot O9 and especially the “KTA” motif seems to be a major determinant for rendomab-B1 binding. More importantly, the fact that rendomab-B1 interacted with three linear regions located within distinct extracellular domains (N-terminal tail and E2 loop) without any sequence similarity, suggested that rendomab-B1 might

recognize a conformational epitope. This assumption was reinforced by binding experiments showing that rendomab-B1 affinity for hET<sub>B</sub>R was strongly impaired when cells overexpressing the receptor were fixed by 4% paraformaldehyde (supplementary figure 3). Eventually, rendomab-B1 proved to be ineffective to probe hET<sub>B</sub>R in western blot tests using hET<sub>B</sub>R overexpressing cell lysates (data not shown).

Collectively, these data indicate that rendomab-B1 binding onto hET<sub>B</sub>R involves a conformational epitope, probably composed of discontinuous segments of the N-terminal and E2 loop primary structure, that might be brought into close proximity when the receptor acquires its native conformation.



**FIGURE 4. Rendomab-B1 recognizes a conformational epitope involving hET<sub>B</sub>R N-terminal tail and E2 loop regions.** (A) Rendomab-B1 epitope was investigated using a peptide array spotted with dodecapeptides (frameshifted by one amino acid) covering the entire hET<sub>B</sub>R extracellular regions. Interacting peptides were revealed using an alkaline phosphatase conjugated secondary antibody. (B) Schematic localization of the regions recognized by rendomab-B1 on hET<sub>B</sub>R. (C) Spot signals obtained on the membrane were quantified by densitometry. Isolated (no more than two consecutive spots) spots, as well spot series not presenting any signal peak higher than three times the background, are not represented and considered as irrelevant. (D) Table mentioning the sequence of most intensely stained spots on the membrane; underlined motifs correspond to putative key residues for rendomab-B1 binding. This experiment was realized twice with two independent membranes. An isotype control antibody did not generate any staining.

*Rendomab-B1 can block the ET-1-induced calcium influx by two mechanisms.*

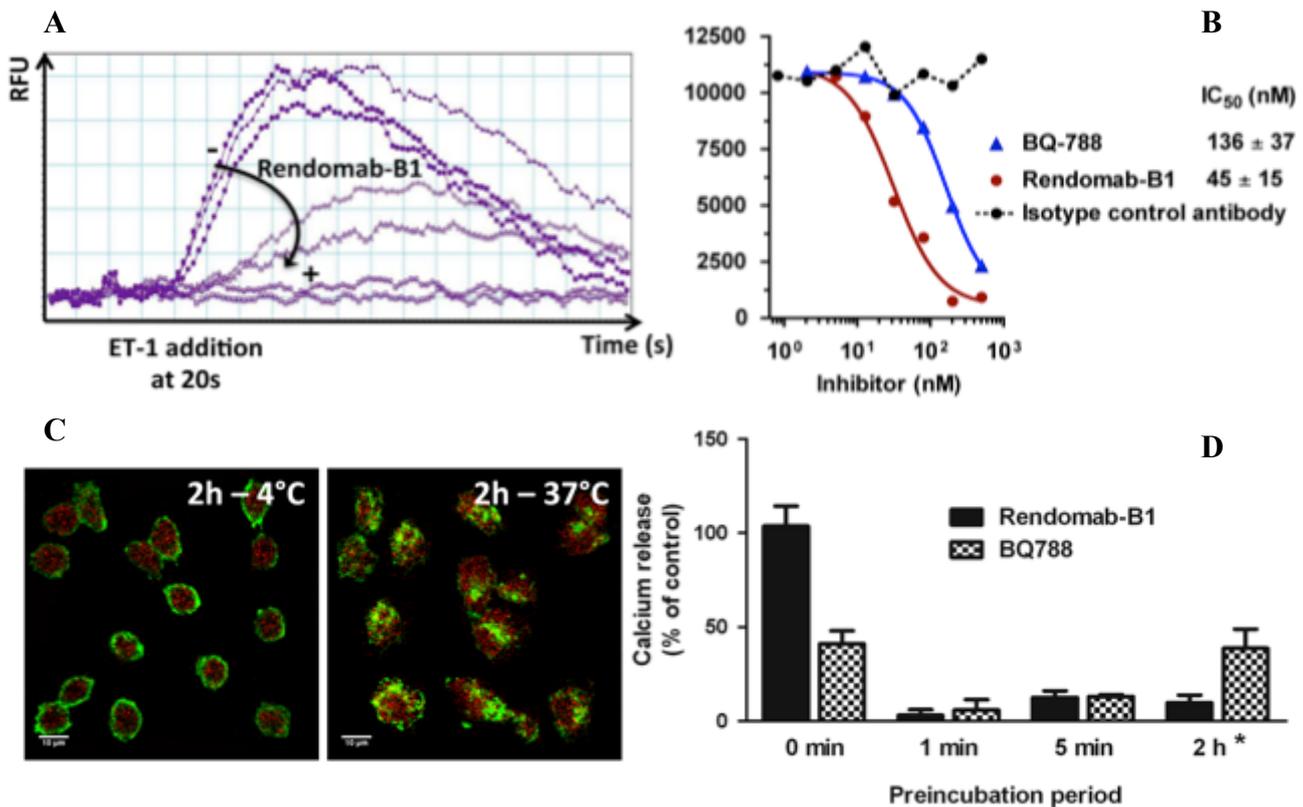
The above-described competition binding experiments clearly showed that rendomab-B1 could inhibit ET-1 binding onto hET<sub>B</sub>R. Consequently, we next tested whether rendomab-B1 was able to antagonize the signalling pathway triggered by ET-1 fixation onto hET<sub>B</sub>R. To this end, we monitored the ET-1-induced calcium influx in presence of variable rendomab-B1 (or BQ-788) concentrations. As illustrated by figure 5A and 5B, rendomab-B1 potently antagonized the calcium influx induced by 2 nM ET-1, and even completely blocked it at a concentration of 200 nM. Interestingly, rendomab-B1 concentration leading to 50% loss in calcium mobilization (IC<sub>50</sub>) was three times lower than BQ788 one (45 versus 136 nM).

In these experiments, it is important to note that the inhibitors (rendomab-B1 or BQ788) were preincubated with cells at 37°C, two hours before ET-1 stimulation. As a consequence, we could not exclude that rendomab-B1 antagonistic property was due, at least in part, to the induction of hET<sub>B</sub>R internalization. To address this issue, we performed confocal microscopy experiments to localize hET<sub>B</sub>R in cells, following rendomab-B1 addition and subsequent incubation at 37°C or at 4°C for two hours. As shown on figure 5C the localization of rendomab-B1 staining varied depending on the incubation temperature. Indeed, when rendomab-B1 was incubated 2h at 4°C (left panel), the staining was essentially membrane-located. On the contrary, an incubation at 37°C led to the massive apparition of intracellular spots which partly colocalized with both the early endosomal marker EEA1 (figure 5C, right panel) and the lysosomal marker LAMP-1 (supplementary figure 4). Therefore, these data indicated that the inhibition observed in the calcium influx assay (with a two-hour preincubation), was mainly due to rendomab-B1-induced ET<sub>B</sub>R internalization, which desensitized cells to ET-1.

To assess whether rendomab-B1 was able to block the ET-1-induced calcium signalling pathway, independently of its capacity to induce ET<sub>B</sub>R internalization, we varied its preincubation time on cells preceding ET-1 addition (Figure 5D). Interestingly, a preincubation time as short as one minute, was sufficient to strongly inhibit the intracellular calcium release (90 % loss), similarly to the two-hour preincubation condition. This one-minute preincubation period with rendomab-B1 (not sufficient to induce ET<sub>B</sub>R internalization) proved that rendomab-B1 was able to block ET-1-induced calcium influx regardless of the receptor internalization. However, in contrast to BQ788, we did not observe any inhibition when rendomab-B1 and ET-1 were simultaneously added to the cells. This result could be explained by the large size of the antibody compared to BQ788 (150 kDa

versus 664 Da), which prevented rendomab-B1 from reaching the receptor before ET-1 and antagonizing the signalling pathway.

Together, these findings demonstrate that rendomab-B1 is able to completely block the ET-1-induced calcium signalling pathway, not only by directly competing with ET-1 binding onto ET<sub>B</sub>R, but also by triggering ET<sub>B</sub>R endocytosis leading to cell desensitization to ET-1 stimulation.

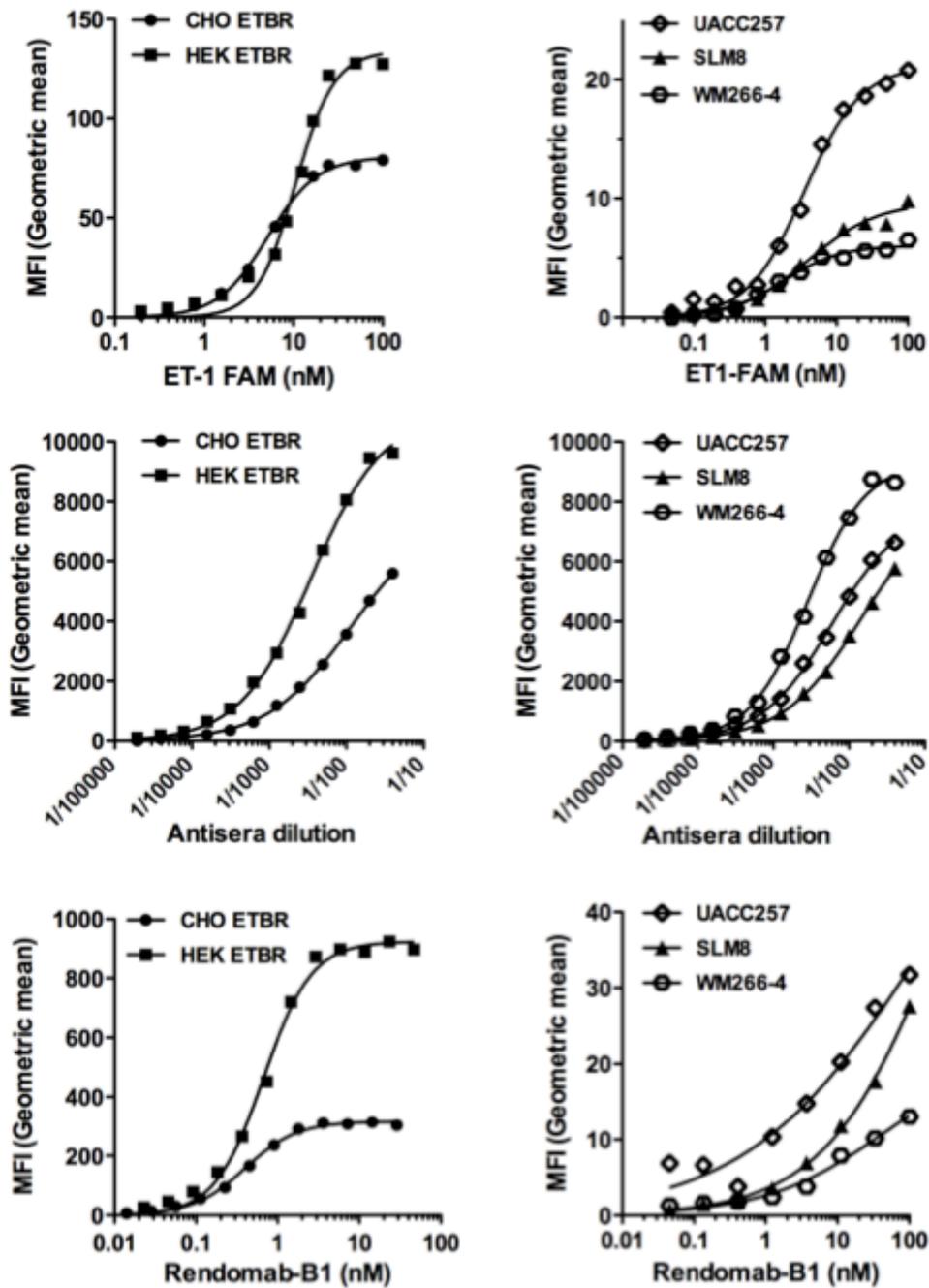


**FIGURE 5. Rendomab-B1 is able to block the ET-1 induced intracellular calcium mobilization by two mechanisms.** (A) CHO-ET<sub>B</sub>R cells were loaded with a calcium sensitive dye for 1h. One hour before dye loading, cells were treated with various concentration of rendomab-B1, BQ788 or isotype control antibody. At the end of the dye incubation period, cells were stimulated with 2 nM ET-1 and intracellular calcium fluxes were monitored with a FLEXStation 2 multi-mode reading system. The picture illustrates calcium flux variations obtained with varying concentrations rendomab-B1. (B) Data obtained from the FLEXStation (area under curve) were plotted versus inhibitor concentrations and fitted with an adequate dose-response equation (GraphPad Prism). IC<sub>50</sub> ± s.d stand for three independent assays. (C) Viable CHO ET<sub>B</sub>R cells were stained with 100 nM of fluorescently-labeled-rendomab-B1 (green signal). Red fluorescence corresponds to Early Endosomal Antigen 1 (EEA1) staining. Merged images are presented. Nuclear staining with DRAQ5 is not displayed. (D) CHO-ET<sub>B</sub>R cells were treated similarly to A excepted that the preincubation period of inhibitors was varied and only one inhibitor concentration of 200 nM was used. Error bars stands for mean ± s.d of three independent experiments. \* for the 2h preincubation condition, culture medium containing inhibitors was removed before dye loading.

### *Rendomab-B1 affinity for ET<sub>B</sub>R is greatly impaired on melanoma cell lines*

In the oncology field, ET<sub>B</sub>R has been particularly studied in melanoma, where its overexpression is often encountered and correlates with tumor progression (Demunter *et al.*, 2001; Asundi *et al.*, 2011). Accordingly, rendomab-B1 binding was tested on three human melanoma cell lines: UACC257, SLM8 and WM266-4. We first evaluated ET<sub>B</sub>R cell surface expression on these cells by flow cytometry, using ET-1 FAM. As shown on figure 6B, ET-1 FAM labelled the three cell lines in a saturable fashion, with similar affinities to ones obtained with ET<sub>B</sub>R transfected cell lines (Figure 6A and table), demonstrating the presence of functional endothelin receptors at the cell surface, but in a lower quantities compared to hET<sub>B</sub>R stably expressing cell lines. To ensure that this binding was effectively due to ET<sub>B</sub>R expression, ET-1 fam binding was successfully inhibited with BQ788 and S6c but not by FR139317, an ET<sub>A</sub>R specific antagonist (supplementary figure 5). Amazingly, rendomab-B1 binding curves on melanoma cells displayed very low signals and did not present any plateau, contrary to ones obtained with hET<sub>B</sub>R transfected cells, reflecting a poor affinity and rendering K<sub>D</sub> calculations imprecise (Figure 6E, 6F and table). The hypothesis of a possible competition between rendomab-B1 and endothelins secreted by melanoma cells was very unlikely since no endothelin peptide immuno-reactivity was detected using a picomolar range sensitive endothelin ELISA assay (supplementary figure 6). To better understand the unexpected rendomab-B1 behaviour on melanoma cells, we used anti-ET<sub>B</sub>R polyclonal antisera generated during the immunization procedure. As displayed on figure 6C and 6D, specific anti-ET<sub>B</sub>R polyclonal antibodies recognized similarly transfected and melanoma cells, indicating that with rendomab-B1, we selected a very particular case compared to the major part of the antibodies present in the anti-sera. It is also worth noting that in sharp contradiction with ET-1 FAM binding experiments, polyclonal anti-sera saturating signals (B<sub>MAX</sub>) obtained with transfected and melanoma cells were similar, implying comparable amounts of cell surface ET<sub>B</sub>R (supplementary figure 7A and 7B).

Therefore, in spite of the presence of functional ET<sub>B</sub> receptors on both transfected and melanoma cell lines, rendomab-B1 did not behaved similarly on these cells suggesting that the melanoma-expressed ET<sub>B</sub>R probably harbours atypical structural features (compared to the wild type recombinantly expressed ET<sub>B</sub>R), impairing rendomab-B1 fixation onto the receptor.



	$K_D$ (nM)		Antisera titer
	ET-1 FAM	Rendo	
CHO ETBR	$5.3 \pm 2.1$	$0.7 \pm 0.15$	1/40 - 1/96
HEK ETBR	$9.4 \pm 3.3$	$0.6 \pm 0.05$	1/159 - 1/307
UACC 257	$3 \pm 1.3$	> 100	1/104 - 1/188
SLM8	$5.8 \pm 3.8$	> 100	1/33 - 1/71
WM266-4	$1.5 \pm 0.7$	> 100	1/202 - 1/342

**FIGURE 6. Rendomab-B1 poorly recognizes ET<sub>B</sub>R expressed by human melanoma cell lines.** (A, B) ET<sub>B</sub>R transfected cells and human melanoma cells (UACC257, SLM8, WM266-4) were incubated with varying dilutions of ET-1 FAM for 24 h and analyzed by flow cytometry. (C, D) Cells were stained with varying dilutions of anti-ET<sub>B</sub>R polyclonal sera before flow cytometry analysis. (E, F) Cells were stained with varying concentrations of rendomab-B1 and resulting fluorescence was measured by

flow cytometry. All binding curves (MFI versus concentrations) were analyzed with GraphPad Prism to collect binding parameters presented in the table. Dissociation constants represent the mean  $\pm$  s.d of at least 3 independent experiments.

*Rendomab-B1 reduces HUVEC viability, and entails ET<sub>B</sub>R mRNA downmodulation.*

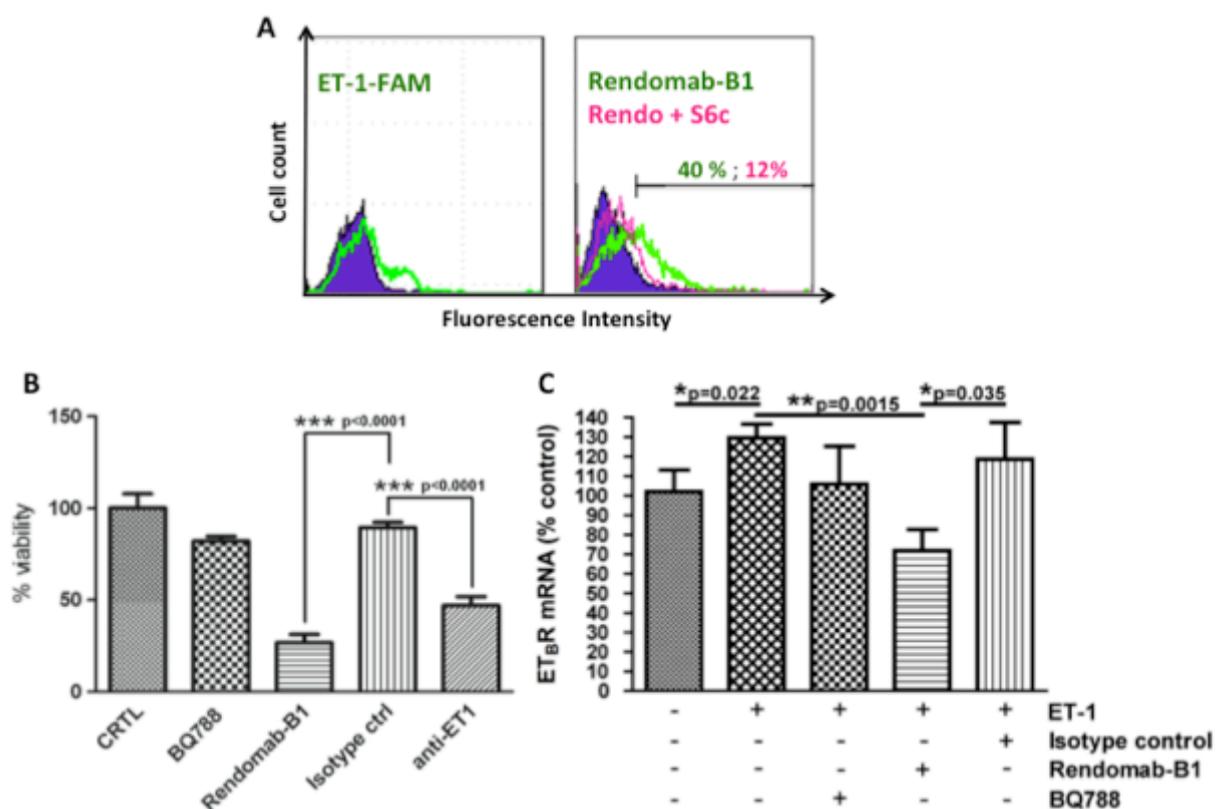
Apart from its overexpression at the surface of some tumor cells such as melanoma, ET<sub>B</sub>R biosynthesis and activation is frequently dysregulated in tumor surrounding endothelial cells in various cancer types (Egidy *et al.*, 2000; Buckanovich *et al.*, 2008). Hence, an inhibition of the ET-1/ET<sub>B</sub>R pathway in that particular situation would be beneficial for the therapy of certain cancers. As a first step, we tested whether rendomab-B1 was able to bind efficiently to ET<sub>B</sub>R expressed by Human Umbilical Endothelial Cells (HUVEC). As illustrated on figure 7A, rendomab-B1 significantly stained HUVEC; a staining completely repressed when cells were preincubated with S6c indicating the specific binding of rendomab-B1 onto ET<sub>B</sub>R. We next sought to determine rendomab-B1 affinity for hET<sub>B</sub>R expressed on HUVEC. Surprisingly, and similarly to melanoma cell lines, rendomab-B1 staining did not reach any plateau (supplementary figure 8), even at high concentrations 100 times over the K<sub>D</sub> determined with CHO and HEK ET<sub>B</sub>R cell lines. However, unlike human melanoma cell lines, our HUVEC released very high amounts of endothelin peptides (up to 100 pM) as revealed by a specific ELISA test (supplementary figure 6). This high quantity of secreted endothelin peptides (probably ET-1) was compatible with ET<sub>B</sub>R saturation, since dissociation constants as low as 17 pM have been reported (Fujitani *et al.*, 1992), and could explain the fact that rendomab-B1 saturation binding curves did not reach any plateau.

HUVEC have previously been used to investigate ET<sub>B</sub>R role in angiogenesis (Salani *et al.*, 2000b). Of note, ET-1, through ET<sub>B</sub>R activation, has been described as a pro-survival and mitogenic factor for HUVEC (Pedram *et al.*, 1997; Shichiri *et al.*, 1997). In accordance with the high amounts of secreted endothelin peptides we detected, our HUVEC were unresponsive to exogenous ET-1 stimulation under our experimental conditions, an observation already reported by other groups (Clozel *et al.*, 1993; Eguchi *et al.*, 1995). Therefore, we hypothesized that in our case, the pro-survival and mitogenic autocrine ET-1 loop on HUVEC could not be further enhanced by ET-1, but on contrary could be interrupted by the addition of a large concentration of ET<sub>B</sub>R antagonists for a long period. Consequently, we tested whether rendomab-B1 was able to impact on HUVEC proliferation/survival by incubating cells with 500 nM rendomab-B1 (or BQ788) for several days, before assessing cell viability using the MTT dye. As illustrated on figure 7B, rendomab-B1 induced a sharp decrease in cell viability compared to BQ788 (65% loss versus 20%). Moreover, visual inspection of the wells treated with rendomab-B1 revealed numerous floating cells displaying characteristic features of apoptosis such as membrane blebbing, cellular shrinkage or

intracellular vacuolization. A similar result was obtained using an anti-ET-1 monoclonal antibody, confirming the ET-1 autocrine survival role in HUVEC.

In connection with rendomab-B1 ability to induce ET<sub>B</sub>R internalization, we sought to know whether rendomab-B1 could additionally entail a downmodulation of ET<sub>B</sub>R expression in HUVEC. As shown in Figure 7C, exposure of HUVEC to rendomab-B1 for 24 h not only blocked the ET-1 induced ET<sub>B</sub>R mRNA upregulation but also resulted in a significant 25 % reduction of ET<sub>B</sub>R mRNA quantity compared to untreated control cells. This decrease was not observed when cells were incubated with BQ788.

Thus, these data indicate that rendomab-B1 pharmacological activities observed with hET<sub>B</sub>R stably transfected cell lines are applicable, at least in part, to endothelial cells naturally expressing ET<sub>B</sub>R. More interestingly, rendomab-B1 activities on HUVEC emphasize the potential therapeutic interest of rendomab-B1 in the aim of blocking the dysregulated ET-1/ET<sub>B</sub>R pathway in the tumor-surrounding endothelium.



**FIGURE 7. Rendomab-B1 impairs HUVEC viability and triggers ET<sub>B</sub>R mRNA downmodulation. (A)** Slight but specific rendomab-B1 binding onto HUVEC as revealed by flow cytometry. HUVEC were incubated with 100 nM rendomab-B1 (green histogram) or isotype control antibody (violet histogram). Staining specificity was controlled pretreating cells 1 h at 37°C with 500 nM S6c. **(B)** HUVEC were grown 4 days in a reduced-serum media containing 500 nM rendomab-B1, BQ788, anti-ET-1 antibody or isotype control antibody. Cell viability was then determined using the MTT assay. Data are presented as percent of viability compared to untreated control cells. **(C)** HUVEC were treated for 24 h with 500 nM rendomab-B1, BQ788 or isotype control antibody, in combination with 10 nM ET-1. ET<sub>B</sub>R expression was analyzed by RT-PCR. Obtained bands were quantified by densitometry and values normalized to control conditions. Error bars represent the mean ± s.d of three independent experiments. \*, \*\*, \*\*\* stand for P< 0.05, 0.01 and 0.001 respectively for a Student's t test.

## Discussion

G protein coupled receptors (GPCRs) constitute the largest family of cell surface signalling proteins, with approximately 900 members, accounting for more than 2% of the genes identified in the human genome (Pierce *et al.*, 2002). These receptors have a pivotal role in a broad range of physiological functions as well as in some of the most prevalent human disorders, as reflected by the fact that about one third of all marketed therapeutics act on GPCRs (Schlyer and Horuk, 2005; Lagerstrom and Schioth, 2008). Emerging clinical and experimental data support the significant, but often underestimated, involvement of GPCRs in both initiation and late stages of cancer progression (Lappano and Maggiolini, 2011). Notably, GPCRs, have been proved to be crucial for the communication between cancer cells and their benign adjacent counterparts; an essential process which allows the tumor to recruit new blood vessels, to evade immune detection, to invade surrounding tissues and disseminate to other organs (Dorsam and Gutkind, 2007). Despite their relevant role in tumor development and their high drugability, only a few pharmaceuticals directed at GPCRs are effectively used for cancer treatments (Innamorati *et al.*, 2011). Moreover, no GPCR-targeting therapeutic antibodies have been approved so far for oncology indications, in spite of the increasing interest for therapeutic antibodies in the development of targeted cancer therapies (Hutchings *et al.*, 2010). In this study, we describe the production and the characterisation of a new monoclonal antibody targeting a therapeutically relevant GPCR, the endothelin receptor B, which has been implicated in the key steps of tumorigenesis by establishing a tumor-promoting crosstalk between neoplastic cells and their stromal surroundings (Egidy *et al.*, 2000; Salani *et al.*, 2000a and b; Buckanovich *et al.*, 2008; Binder *et al.*, 2009; Spinella *et al.* 2009).

The generation of pharmacologically active antibodies recognizing the native conformation of GPCRs is not an easy task, and peptidic immunizations using GPCRs extracellular fragments or purified receptors often result in antibodies unable to bind the receptor in its membrane context (Kirkpatrick, 2009). To bypass the major problem, arising from the difficulty to produce large quantities of stable and correctly folded GPCRs, we used an electroporation-aided DNA immunization approach involving the *in vivo* immunogene production and folding. As previously described by different groups (Costagliola *et al.*, 1998; Kaptein *et al.*, 2008; Fujimoto *et al.*, 2009; Takatsuka *et al.*, 2010) including ours (Tymciu *et al.*, 2002; Allard *et al.*, 2011), this technique has been successfully used to generate polyclonal and monoclonal antibodies against the native conformation of GPCRs. Thus, this

immunization procedure allowed us to generate a new monoclonal antibody, named rendomab-B1, able of recognizing native hET<sub>B</sub>R at the surface of different cell lines.

Preliminary characterization experiments using flow cytometry and hET<sub>B</sub>R stably transfected cell lines, demonstrated that rendomab-B1 was highly specific for human ET<sub>B</sub>R and did not cross-react with hET<sub>A</sub>R, the second endothelin receptor subtype identified in mammals. This restrictive specificity is an interesting feature that supports the use of monoclonal antibodies to selectively target GPCRs without interfering with other family members, a problem often encountered with small molecules directed against GPCRs (Schlyer and Horuk, 2005; Hutchings *et al.*, 2010). Rendomab-B1 affinity for hET<sub>B</sub>R was found to be remarkably high (around 600 pM) and, even more importantly, we demonstrated that it competed with ET-1 binding onto ET<sub>B</sub>R. Our data indicate that rendomab-B1 can inhibit ET-1 fixation on ET<sub>B</sub>R, with a better efficacy than BQ788, the reference ET<sub>B</sub>R specific inhibitory compound. Moreover, pharmacological assays revealed that rendomab-B1 was a potent ET<sub>B</sub>R antagonist (better than BQ788 once again), able of completely silencing ET-1 induced IP3-calcium signalling pathway.

To further investigate the inhibitory mechanism of rendomab-B1, we undertook competitive binding experiments, frequently used to characterize enzymatic inhibitors mechanism (Erdmann *et al.*, 2008), and transposed in our case to study membrane receptor antagonists. Our results demonstrate that rendomab-B1 behaves as a mixed inhibitor, implying that it possibly recognizes an extracellular region of ET<sub>B</sub>R structurally distinct but functionally related to the ET-1 binding site. In fact, using a Pepscan analysis, rendomab-B1 epitope was preliminary mapped to three discontinuous ET<sub>B</sub>R extracellular regions, located within the N-terminal tail and the E2 loop. This discontinuous epitope indicates that rendomab-B1 actually recognizes a conformational epitope that might arises from the interaction between the N-terminal tail and the E2 loop in the folded ET<sub>B</sub> receptor (as already suggested for other monoclonal antibodies recognizing different non contiguous regions on their respective membrane targets: Shimizu *et al.*, 2004; Ruf *et al.*, 2007; Daumer *et al.*, 2011). Collectively, these findings highlight the interest of rendomab-B1 to investigate ET<sub>B</sub>R structure, and more importantly to delineate endothelins binding sites, which are still unclear despite several recent publications tackling the issue (Aubin *et al.*, 2008; Lättig *et al.*, 2009). Furthermore, the original mixed inhibitory mechanism, rarely found for small inhibitory molecules like BQ788 that generally compete with natural ligands for the receptor orthosteric site, underlines the interest of developing therapeutic antibodies which offer the possibility to

target original epitopes on GPCRs, potentially linked to new pharmacological activities and better receptor selectivity (Hutchings *et al.*, 2010).

To our knowledge, this is the first time that an antagonist monoclonal antibody targeting hET<sub>B</sub>R is described. Several groups have already reported the production of ET<sub>B</sub>R specific monoclonal antibodies (Kondoh *et al.*, 1990; Yamaguschi *et al.*, 2004; Asundi *et al.*, 2011), but none of them presented any direct pharmacological activity on ET<sub>B</sub>R. Kondoh and colleagues were the first to produce ET<sub>B</sub>R (and also ET<sub>A</sub>R) specific monoclonal antibodies using rat lung membranes as immunogene; however no proof of hET<sub>B</sub>R cell surface labelling was mentioned. More than 10 years after, Yamaguschi and colleagues reported the production of five monoclonal antibodies recognizing hET<sub>B</sub>R in its membrane context, with subnanomolar affinities similar to rendomab-B1 one. Nevertheless, the authors did not comment on any competition with natural ligands. Finally, a very recent publication by Asundi and colleagues from Genentech Incorporation, nicely presents the production and the characterization of an antibody-drug conjugate targeting hET<sub>B</sub>R for melanoma treatment. Their monoclonal antibody, designated 5E9, was demonstrated to specifically bind to hET<sub>B</sub>R irrespective of ET-1 fixation and to entail rapid receptor internalization. Consequently, the antitumoral activity of 5E9 observed on melanoma xenografts, depended entirely on its conjugation with a cytotoxic compound. More interestingly, they also described another monoclonal antibody, raised during their first attempts to generate hET<sub>B</sub>R therapeutic antibodies. This antibody, named 24C7 and obtained through mice immunization with hET<sub>B</sub>R overexpressing HEK cells, presented some characteristics partially similar to those of rendomab-B1. Indeed, increasing ET-1 concentrations inhibited 24C7 binding onto ET<sub>B</sub>R, cross-reaction with ET<sub>A</sub>R was not observed and 24C7 epitope was mapped into the second extracellular loop of ET<sub>B</sub>R. However, although the binding of ET-1 and 24C7 was mutually exclusive, the antibody probably lacked sufficient affinity to compete with ET-1 and consequently remained pharmacologically unable to inhibit ET<sub>B</sub>R activation. Together, these observations clearly show that rendomab-B1 is a unique molecular tool, harbouring original and unprecedented pharmacological properties in the field of anti-ET<sub>B</sub>R monoclonal antibodies.

It is also worth noting that, unlike rendomab-B1, monoclonal antibodies described by Asundi and colleagues did not discriminate between ET<sub>B</sub>R expressed by melanoma cell lines and by transfected HEK cells. On one side, the fact that rendomab-B1 poorly recognizes ET<sub>B</sub>R on melanoma cell lines is obviously disappointing with a view to develop an ET<sub>B</sub>R-based melanoma therapy. On the other side, this interesting result strongly suggests that ET<sub>B</sub>R

expressed by melanoma cells presents tumor-specific structural characteristics, which could be sensed by rendomab-B1. The poor affinity of rendomab-B1 for ET<sub>B</sub>R in the melanoma context could be explained by the N-terminal proteolysis of hET<sub>B</sub>R (Akiyama *et al.*, 1992). Indeed, hET<sub>B</sub>R has been shown to undergo a ligand-induced metalloproteinase cleavage at R64-S65 in transfected HEK and Vascular smooth muscle cells (Grantcharova *et al.*, 2002 and 2006). Under our experimental conditions, no endothelin secretion by melanoma cell lines was detected, thus precluding a massive agonist-induced cleavage of the ET<sub>B</sub>R pool at the cell surface. However, it would not be surprising that these highly invasive cells overexpress some metalloproteinases (Giricz *et al.*, 2010) that could subsequently cut the hET<sub>B</sub>R N-terminal extremity and impair rendomab-B1 binding. This hypothesis is supported by the fact that rendomab-B1 epitope probably involves a region located in the N-terminal truncated portion (I45 to A67). Moreover, it is worth noting that none of the three hET<sub>B</sub>R extracellular regions mapped by rendomab-B1, do match with the major epitopic motif of anti-ET<sub>B</sub>R polyclonal antibodies raised during the immunization procedure, which actually strongly stained melanoma cells (Allard *et al.*, 2011). Interestingly, the epitope of ET<sub>B</sub>R specific polyclonal antisera (S65 to P81) was located just after the proteolytic site. Therefore, ET<sub>B</sub>R cleavage, which might occur in highly invasive melanoma cells, seems to be a relevant hypothesis to account for the poor rendomab-B1 fixation on these cells. Nevertheless, other hypotheses involving ET<sub>B</sub>R splicing variants (Tsutsumi *et al.*, 1999; Pao *et al.*, 2001), oligomerization (Evans *et al.*, 2008) or abnormal glycosylation pattern could also explain this result. To our knowledge, this is the first time that ET<sub>B</sub>R, at the protein level, is reported to be structurally different between melanoma cells and non-cancerous cells. Our results also suggest that the ET<sub>B</sub>R pool at the surface of a melanoma cell is heterogeneous, with a relatively small proportion of functional receptors (evidenced by ET-1 FAM binding) and high amounts of non-functional receptors (revealed with polyclonal anti-sera), reflecting comparable or even superior expression rate than recombinant cell lines.

ET<sub>B</sub>R is mainly expressed by the vascular endothelium and mediates the ET-1 pro-survival and mitogenic effects in an autocrine-paracrine fashion. More recently, ET<sub>B</sub>R expression in the tumor-surrounding vasculature, and more generally in stromal cells neighbouring tumors, has been involved in pivotal steps of cancer progression including neovascularization (Salani *et al.*, 2000a and 2000b), immune system escape (Buckanovich *et al.*, 2008) and metastatic spread (Binder *et al.*, 2009). Besides, multiple cancer cells overexpress ET-1 (Kusuhara *et al.*, 1990; Bagnato *et al.*, 1995) thus establishing an important paracrine loop promoting stromal ET<sub>B</sub>R pro-tumorigenic effects. Interestingly, our data using

model endothelial cells (HUVEC), demonstrate that rendomab-B1 is able to antagonize the ET-1/ET<sub>B</sub>R-mediated effects in these cells, as reflected by the drastic drop in HUVEC viability when exposed to rendomab-B1. Our findings also suggest that rendomab-B1 could downmodulate ET<sub>B</sub>R expression at the surface of endothelial cells. Together, these results emphasize the therapeutic potential of rendomab-B1 to block the vascular ET<sub>B</sub>R-mediated tumor-promoting effects. Indeed, all the beneficial anti-tumor effects previously described utilizing BQ788, could conceivably be transposed to rendomab-B1, possibly with a better efficacy, as suggested by our *in vitro* experiments. Therefore, it can be expected that rendomab-B1 might enhance anti-tumor immune therapy (Buckanovich *et al.*, 2008), reduce angiogenesis and lymphangiogenesis (Salani *et al.* 2000a and 2000b; Spinella *et al.* 2009), and decrease metastatic dissemination (Binder *et al.*, 2009). These crucial points are presently under investigation.

In conclusion, this study has presented the production and the characterization of a new monoclonal antibody, selectively recognizing hET<sub>B</sub>R, a relevant but yet underexploited therapeutic target for cancer treatments. Our results highlight the fact that Rendomab-B1 harbours very original characteristics compared to previously reported anti-ET<sub>B</sub>R antibodies. To our knowledge rendomab-B1 is the first pharmacologically active anti-ET<sub>B</sub>R monoclonal antibody presenting strong antagonist properties. Notably, rendomab-B1 blocking activities observed with HUVEC open the way to its potential utilization for therapeutic indications where endothelium ET<sub>B</sub>R blockade would be beneficial, as in ovarian or colorectal cancers (Egidy *et al.*, 2000; Buckanovich *et al.*, 2008). Furthermore, rendomab-B1 characterization uncovered the fact that ET<sub>B</sub>R is likely structurally different when expressed at the surface of melanoma cells versus non-cancerous ones. This very interesting finding emphasizes the interest of rendomab-B1 to detect and further characterize the structural features of melanoma-expressed ET<sub>B</sub>R, but also paves the way for the development of monoclonal antibodies specifically recognizing the “melanoma-specific” (may be extendable to other cancers) form of ET<sub>B</sub>R. Therefore, rendomab-B1 appears as a very attractive molecular tool, not only to antagonize stromal ET<sub>B</sub>R tumor-promoting effects, but also to investigate ET<sub>B</sub>R molecular structures and roles in both normal and pathological conditions.

## **Materials and methods**

### ***Animals***

Six-week-old female C57BL/6 mice from Janvier (Le Genest-St-Isle, France) were kept in a specific pathogen-free animal facility. All animal experiments complied with French animal experimentation regulations.

### ***Plasmids***

The cDNA clone of the human ET<sub>B</sub> receptor (a generous gift from Dr. M.J. Brownstein, Bethesda, USA) was subcloned in pcDNA3.1 vector (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The integrity of the construct was confirmed by sequence analysis. Silencer select siRNA targeting ET<sub>B</sub>R were purchased from Ambion (Austin, USA). Dr P. Robin (Orsay, France) kindly provided the plasmid containing the cDNA of the rat ET<sub>B</sub> receptor.

### ***Transfection experiments and cell cultures***

CHO cells (obtained from ECACC, Wiltshire, UK) were cultured in Ham-F12 medium, HEK293T (EACC) in DMEM medium and Human Umbilical Vascular Endothelila Cells (HUVEC, obtained from Lonza, Verviers, Belgium) in EBM-2 medium containing endothelial cell growth supplements. Melanoma cell lines HT144, SLM-8, 888mel and A375 were a kind gift of Dr F. Deshayes. UACC257, RPMI7951, Skmel28, and WM266-4 cell lines were from NCI-60 (Frederick, MD, USA), DSMZ (Braunschweig, Germany), Cell line service (Eppelheim, Germany) and ECACC respectively. All melanoma cell lines were cultured in DMEM/F-12 medium excepted UACC257 in RPMI1640. All media were supplemented with 10% fetal calf serum, 1 mM pyruvate, 1% nonessential amino acids, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/mL streptomycin and cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. All media and cell culture supplements were from Invitrogen. The cDNA for hET<sub>B</sub>R was transfected and stably overexpressed in CHO and HEK cells using FUGENE HD reagent (Roche Diagnostic, Meylan, France). hET<sub>A</sub>R stably transfected CHO cells were kindly provided by Dr M. Iglarz (Actelion, Basel, Switzerland).

### ***DNA immunization protocol and production of monoclonal antibodies***

DNA immunizations were realized according to a previously described protocol (Allard *et al.*, 2011). For monoclonal antibody production, the two mice presenting the highest rate of specific antibody, received three final cellular boosts with hET<sub>B</sub>R overexpressing HEK cells (5x10<sup>6</sup> cells in 200µl i.p, one boost per day) 3 days prior to sacrifice. Collected splenocytes

were fused to NS1 mouse myeloma cells as previously described (Grassi *et al.*, 1988). Hybridoma supernatants were screened for production of anti-ET<sub>B</sub>R specific antibodies by a cell-based ELISA test (Allard *et al.*, 2011), using both untransfected and ET<sub>B</sub>R-transfected CHO cells as targets. Specificity and reactivity of antibodies was further confirmed by flow cytometry. One specific hybridoma (Rendomab-B1) was identified and subcloned by limiting dilutions. Rendomab-B1 was isotyped using a mouse immunoglobulin isotyping kit according to the manufacturer's (Pierce, Rockford, USA) instructions and purified by affinity chromatography on Protein A sepharose (Millipore, Molsheim, France).

### ***Flow cytometric analysis***

#### *- Rendomab-B1 specificity and cross-reactions*

For the determination of hET<sub>B</sub>R specific antibody binding, flow cytometric analysis was performed on seven cell culture models: the wild type (WT), hET<sub>B</sub>R, rat ET<sub>B</sub>R and hET<sub>A</sub>R CHO cells, the WT and hET<sub>B</sub>R HEK cells, and the HUVEC cell line. Confluent cells in 75-cm<sup>2</sup> flasks were washed with phosphate buffer saline (D-PBS, Invitrogen) and collected after incubation at 37°C for 15 min with 3 mL of versene buffer (D-PBS/8 mM EDTA). Cells were then seeded (100 000 cells/well) onto V-shaped 96-well plates (Greiner Bio One, Courtaboeuf, France); plates were centrifuged, supernatant was discarded and cells were incubated for 2 h at 4°C with 100 µL of D-PBS/0.1% BSA/5% normal goat serum (NGS, Invitrogen) containing 50nM Rendomab-B1. After two washes with 150 µl of ice-cold D-PBS/0.1% BSA/1% NGS, cells were incubated for 1 hr at 4°C in the dark with R-phycoerythrin (R-PE)-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK). Cells were washed twice again and resuspended in 100 µL of D-PBS/0.1% BSA. The fluorescence was finally assayed using a GUAVA flow cytometer (Guava EasyCyte Plus, Millipore) and mean fluorescence intensity (MFI) of samples was measured. To control hET<sub>B</sub>R expression at cell surfaces, fluorescein-labelled ET-1 (ET-1 FAM, phoenix pharmaceuticals, Strasbourg, France) was used. In some experiments, cells (melanoma cell lines) were preincubated with the specific ET<sub>A</sub>R antagonist FR139317 (Tocris, Bristol, UK) to measure ET<sub>B</sub>R binding.

#### *- Affinity determination and competition experiments*

For affinity measurements, saturation binding experiments were performed with increasing concentrations of Rendomab-B1. Concerning competition tests, hET<sub>B</sub>R CHO cells were incubated either with (i) fixed Rendomab-B1 concentration (3nM) and varying concentration of competitor peptides ET-1, ET-2, ET-3 or Sarafotoxin 6c (Phoenix Pharmaceuticals) or

with (ii) fixed ET-1 FAM concentration (10nM) and varying concentration of Rendomab-B1 or BQ788 (Phoenix Pharmaceuticals). For experiments investigating the rendomab-B1 competition mechanism, cells were incubated with varying concentration of both Rendomab-B1 and ET-1. Experiments were realized at 4°C to avoid receptor internalization and overnight incubations permitted to reach equilibrium.

### ***Confocal microscopy analysis***

Confocal microscopy analysis was performed on two cell culture models: the hET<sub>B</sub>R-CHO and the hET<sub>B</sub>R-HEK cells, following the method described by Allard *et al.* (2011). For competition experiments, 50 nM Rendomab-B1 was incubated simultaneously with 1µM ET-1. For internalization experiments, unfixed cells were incubated à 4°C for 1h with 100 nM of Dylight-488-labeled Rendomab-B1, washed twice with D-PBS, and either kept at 4°C or replaced at 37°C for 2h before a fixation step with 4% PFA. Cells were next permeabilized with 0,5% saponin (Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) to stain endosomal or lysosomal compartments, using anti-EEA1 and anti-LAMP-1 antibodies (Millipore) respectively.

### ***Calcium influx assays***

For calcium influx, 35000 hET<sub>B</sub>R CHO cells were plated on 96-well black sided plates with clear bottom and incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. After 24h, medium was aspirated and cells were loaded with dye for 1hr à 37°C using the Fluo8 NW assay kit (AAT Bioquest, Sunnyvale, USA). Inhibitors (Rendomab-B1, BQ788, isotype control antibody) were added 1h before dye loading. The plate was then loaded onto the FLEXStation 2 multi-mode microplate reader (Molecular Devices, St. Grégoire, France) to obtain real time monitoring of the calcium mobilization upon addition of 2nM ET-1.

### ***Viability assay on endothelial cells (HUVEC)***

2500 HUVEC were seeded in a 96 well plate and incubated 24h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Cells were washed twice with D-PBS and incubated 4 days in a reduced serum medium containing 500 nM of rendomab-B1, isotype control antibody or BQ788. At the end of the incubation period, cells were observed with a microscope and viability was assayed with the MTT tetrazolium salt (Sigma).

### ***mRNA PCR***

mRNA were prepared, reverse transcribed and amplified as previously described (Allard et al., 2011). Primer sequences for human ET<sub>B</sub>R were : 5'-GCACATCGTCATTGACATCC-3' and 5'-CAGAGGGCAAAGACAAGGAC-3'.

### ***Peptide synthesis and hET<sub>B</sub>R-binding epitope mapping***

Overlapping 12-mer peptides, frameshifted by one residue, covering the entire extracellular amino acid sequence of hET<sub>B</sub>R receptor, were synthesized on a cellulose membrane using the SPOT technique described by Laune *et al.* (2002). Rendomab-B1 epitope mapping was performed according to the protocol described by Allard *et al.* (2011).

### ***Supplementary data***

Supplementary data are available at *The EMBO Journal Online* (<http://www.embojournal.org>)

## **Acknowledgments**

We thank Drs Marc Iglarz for ET<sub>A</sub>R overexpressing CHO cells, Philippe Robin and Zahra Tanfin for rat ET<sub>B</sub>R containing plasmid, Denis Servent for calcium influx assays, Patricia Lamourette, Karine Moreau and Marc Plaisance for their expert assistance with monoclonal antibody production, Jean-Charles Robillard for animal experiments and David Marsh for correcting the manuscript. This work was supported by bioMérieux and institutional funds from the Commissariat à l’Energie Atomique (CEA, France) and from the Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche (EA 3515, Université Paris Diderot and Ecole Doctorale ED 425, Université Paris Sud 11)

## **Author Contribution**

Bertrand Allard (PhD student), and Anne Wijkhuisen (permanent researcher) designed, realized the experiments, interpreted the data and wrote the manuscript. Frédérique Deshayes (permanent researcher) performed RNA analysis experiments and brought her expertise on HUVEC and melanoma. Fabienne Priam (postdoctoral fellow) essentially developed the cell ELISA used for screening procedures. Patricia Lamourette supervised the hybridoma technology. Jean-Yves Couraud (team leader), Didier Boquet (team leader) and Frédéric Ducancel (laboratory head) supervised all steps of the study, i.e initiated the “cancer immunotherapy” research program, proposed the “endothelin axis” as a model, acquired institutional (University and CEA) and private (BioMérieux) funding, promoted collaborations, and critically reviewed the manuscript.

## **Conflict of Interest**

The authors report no conflict of interest.

## References

- Abman SH (2009) Role of Endothelin Receptor Antagonists in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Annu. Rev. Med.* **60**: 13-23
- Alexandrenne C, Wijkhuisen A, Dkhissi F, Hanoux V, Priam F, Allard B, Boquet D, Couraud JY (2010) Electrotransfer of cDNA coding for a heterologous prion protein generates autoantibodies against native murine prion protein in wild-type mice. *DNA Cell Biol.* **29**: 121-31
- Alexandrenne C, Wijkhuisen A, Dkhissi F, Hanoux V, Créminon C, Boquet D, Couraud JY (2009) Generating antibodies against the native form of the human prion protein (hPrP) in wild-type animals: a comparison between DNA and protein immunizations. *J Immunol Methods* **341**: 41-49
- Allard B, Priam F, Deshayes F, Ducancel F, Boquet D, Wijkhuisen A, Couraud JY (2011) Electroporation-aided DNA immunization generates polyclonal antibodies against the native conformation of human endothelin B receptor. *DNA Cell Biol.* **30**: 13-23
- Akiyama N, Hiraoka O, Fujii Y, Terashima H, Satoh M, Wada K, Furuichi Y (1992) Biotin derivatives of endothelin: Utilization for affinity purification of endothelin receptor. *Protein Expression and Purification* **3**: 427-433
- Asundi J, Reed C, Arca J, McCutcheon K, Ferrando R, Clark S, Luis E, Tien J, Firestein R, Polakis P (2011) An Antibody–Drug Conjugate Targeting the Endothelin B Receptor for the Treatment of Melanoma. *Clinical Cancer Research* **17**: 965 -975
- Aubin J, Létourneau M, Francoeur E, Burgeon E, Fournier A (2008) Identification of ETA and ETB binding domains using ET-derived photoprobes. *Biochimie* **90**: 918-929
- Abman SH (2009) Role of Endothelin Receptor Antagonists in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Annu. Rev. Med.* **60**: 13-23
- Arbabi-Ghahroudi M, Tanha J & MacKenzie R (2005) Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metastasis Rev* **24**: 501-519
- Badache A & Hynes NE (2004) A new therapeutic antibody masks ErbB2 to its partners. *Cancer Cell* **5**: 299-301
- Bagnato A, Tecce R, Moretti C, Di Castro V, Spergel D & Catt KJ (1995) Autocrine actions of endothelin-1 as a growth factor in human ovarian carcinoma cells. *Clinical Cancer Research* **1**: 1059 -1066
- Bagnato A, Loizidou M, Pflug BR, Curwen J & Growcott J (2011) Role of the endothelin axis and its antagonists in the treatment of cancer. *British Journal of Pharmacology* **163**: 220-233
- Bagnato A, Rosanò L, Spinella F, Di Castro V, Tecce R & Natali PG (2004) Endothelin B receptor blockade inhibits dynamics of cell interactions and communications in melanoma cell progression. *Cancer research* **64**: 1436
- Bagnato A, Tecce R, Di Castro V & Catt KJ (1997) Activation of mitogenic signaling by endothelin 1 in ovarian carcinoma cells. *Cancer research* **57**: 1306
- Bagnato A & Spinella F (2003) Emerging role of endothelin-1 in tumor angiogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **14**: 44-50
- Baselga J (2001) The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur. J. Cancer* **37 Suppl 4**: S16-22
- Baudouin V, Crusiaux A, Haddad E, Schandene L, Goldman M, Loirat C & Abramowicz D (2003) Anaphylactic shock caused by immunoglobulin E sensitization after retreatment with the chimeric anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody basiliximab. *Transplantation* **76**: 459-463
- Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE & Yanagisawa M (1994) Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* **79**: 1277-1285
- Beck A, Wagner-Rousset E, Wurch T & Corvaia N (2009) [Therapeutic antibodies and related products: choosing the right structure for success]. *Med Sci (Paris)* **25**: 1024-1032
- Beck KE, Blansfield JA, Tran KQ, Feldman AL, Hughes MS, Royal RE, Kammula US, Topalian SL, Sherry RM, Kleiner D, Quezado M, Lowy I, Yellin M, Rosenberg SA & Yang JC (2006) Enterocolitis in Patients With Cancer After Antibody Blockade of Cytotoxic T-Lymphocyte–Associated Antigen 4. *J Clin Oncol* **24**: 2283-2289
- Beckman RA, Weiner LM & Davis HM (2007) Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. *Cancer* **109**: 170-179
- Binder C, Hagemann T, Sperling S, Schulz M, Pukrop T, Grimshaw MJ & Ehrenreich H (2009) Stromal endothelin B receptor–deficiency inhibits breast cancer growth and metastasis. *Molecular cancer therapeutics* **8**: 2452
- Bisikirska B, Colgan J, Luban J, Bluestone JA & Herold KC (2005) TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs. *J Clin Invest* **115**: 2904-2913

- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK & Ang KK (2006) Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med* **354**: 567-578
- Brumlik MJ, Daniel BJ, Waehler R, Curiel DT, Giles FJ & Curiel TJ (2008) Trends in immunoconjugate and ligand-receptor based targeting development for cancer therapy. *Expert Opin Drug Deliv* **5**: 87-103
- Brunner F, Brás-Silva C, Cerdeira AS & Leite-Moreira AF (2006) Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacology & therapeutics* **111**: 508–531
- Buckanovich RJ, Facciabene A, Kim S, Benencia F, Sasaroli D, Balint K, Katsaros D, O'Brien-Jenkins A, Gimotty PA & Coukos G (2008) Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. *Nat Med* **14**: 28-36
- Bufalo D, Castro V & Biroccio A, Salani D, Rosano L, Spinella F & Bagnato A (2002) Endothelin-1 acts as a survival factor in ovarian carcinoma cells. *Clin Sci (Lond)*. **103 Suppl 48**: 302S-305S.
- Capon DJ, Chamow SM, Mordenti J, Marsters SA, Gregory T, Mitsuya H, Byrn RA, Lucas C, Wurm FM, Groopman JE, Broder S & Smith DH (1989) Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy. *Nature* **337**: 525-531
- Carson KR, Focosi D, Major EO, Petrini M, Richey EA, West DP & Bennett CL (2009) Monoclonal antibody-associated progressive multifocal leucoencephalopathy in patients treated with rituximab, natalizumab, and efalizumab: a Review from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) Project. *Lancet Oncol* **10**: 816-824
- Cartron G & Rossi J-F (2009) [Therapeutic monoclonal antibodies in onco-hematology]. *Med Sci (Paris)* **25**: 1085-1089
- Cartron G, Watier H, Golay J & Solal-Celigny P (2004) From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* **104**: 2635-2642
- Chatenoud L, Ferran C, Legendre C, Thouard I, Merite S, Reuter A, Gevaert Y, Kreis H, Franchimont P & Bach JF (1990) In vivo cell activation following OKT3 administration. Systemic cytokine release and modulation by corticosteroids. *Transplantation* **49**: 697-702
- Chen MH, Kerkelä R & Force T (2008) Mechanisms of cardiac dysfunction associated with tyrosine kinase inhibitor cancer therapeutics. *Circulation* **118**: 84-95
- Chung CH, Mirakhur B, Chan E, Le Q-T, Berlin J, Morse M, Murphy BA, Satinover SM, Hosen J, Mauro D, Slebos RJ, Zhou Q, Gold D, Hatley T, Hicklin DJ & Platts-Mills TAE (2008) Cetuximab-Induced Anaphylaxis and IgE Specific for Galactose- $\alpha$ -1,3-Galactose. *N Engl J Med* **358**: 1109-1117
- Cochet O & Chartrain M (2009) [Producing several hundred of kilograms of monoclonal antibodies for therapy: a constant challenge]. *Med Sci (Paris)* **25**: 1078-1084
- Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P, Reyes F, Lederlin P & Gisselbrecht C (2002) CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med* **346**: 235-242
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I & Van Cutsem E (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med* **351**: 337-345
- Dayan CM & Wraith DC (2008) Preparing for first-in-man studies: the challenges for translational immunology post-TGN1412. *Clin Exp Immunol* **151**: 231-234
- Dhodapkar KM, Krasovskiy J, Williamson B & Dhodapkar MV (2002) Antitumor Monoclonal Antibodies Enhance Cross-Presentation of Cellular Antigens and the Generation of Myeloma-specific Killer T Cells by Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine* **195**: 125 -133
- Ebel W, Routhier EL, Foley B, Jacob S, McDonough JM, Patel RK, Turchin HA, Chao Q, Kline JB, Old LJ, Phillips MD, Nicolaides NC, Sass PM & Grasso L Preclinical evaluation of MORAb-003, a humanized monoclonal antibody antagonizing folate receptor-alpha. *Cancer Immun* **7**:
- Edelman L, Margaritte C, Chaabihi H, Monchâtre E, Blanchard D, Cardona A, Morin F, Dumas G, Petres S & Kaczorek M (1997) Obtaining a functional recombinant anti-rhesus (D) antibody using the baculovirus–insect cell expression system. *Immunology* **91**: 13-19
- Force T, Krause DS & Van Etten RA (2007) Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nat. Rev. Cancer* **7**: 332-344
- Gohji K, Kitazawa S, Tamada H, Katsuoka Y & Nakajima M (2001) Expression of endothelin receptor a associated with prostate cancer progression. *The Journal of urology* **165**: 1033–1036
- Grimshaw MJ, Hagemann T, Ayhan A, Gillett CE, Binder C & Balkwill FR (2004) A role for endothelin-2 and its receptors in breast tumor cell invasion. *Cancer research* **64**: 2461
- Grimshaw MJ, Wilson JL & Balkwill FR (2002) Endothelin-2 is a macrophage chemoattractant: implications for macrophage distribution in tumors. *European Journal of Immunology* **32**: 2393-2400

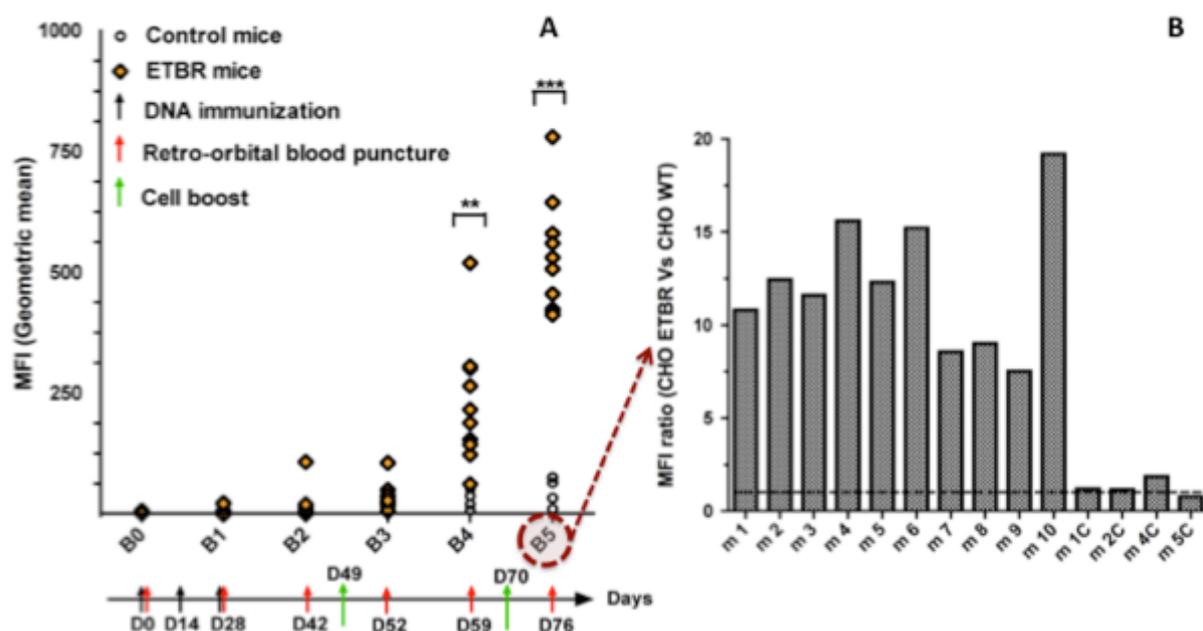
- Griswold DE, Douglas SA, Martin LD, Davis TG, Davis L, Ao Z, Luttmann MA, Pullen M, Nambi P, Hay DWP & Ohlstein EH (1999) Endothelin B Receptor Modulates Inflammatory Pain and Cutaneous Inflammation. *Molecular Pharmacology* **56**: 807-812
- Handoko ML, de Man FS & Vonk-Noordegraaf A (2011) The rise and fall of endothelin receptor antagonists in congestive heart failure. *European Respiratory Journal* **37**: 484-485
- Harding FA, Stickler MM, Razo J & DuBridgè RB (2010) The immunogenicity of humanized and fully human antibodies. *MAbs* **2**: 256-265
- Harmsen MM & De Haard HJ (2007) Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **77**: 13-22
- Harrison RL & Jarvis DL (2006) Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce « mammalianized » recombinant glycoproteins. *Adv. Virus Res* **68**: 159-191
- Haynes WG & Webb DJ (1994) Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *The Lancet* **344**: 852-854
- Herrmann E, B\ogemann M, Bierer S, Eltze E, Toma MI, K\oepke T, Hertle L & W\ulfing C (2007) The role of the endothelin axis and microvessel density in bladder cancer-: correlation with tumor angiogenesis and clinical prognosis. *Oncology reports* **18**: 133-138
- Hoffmann TK, Meidenbauer N, Dworacki G, Kanaya H & Whiteside TL (2000) Generation of Tumor-specific T Lymphocytes by Cross-Priming with Human Dendritic Cells Ingesting Apoptotic Tumor Cells. *Cancer Research* **60**: 3542-3549
- Hoshi N, Sugino T & Suzuki T (2009) Expression of endothelin system in neuroblastic tumors: close association of endothelin-1 and endothelin B receptor expression with differentiation of tumor cells. *Med Mol Morphol* **42**: 110-117
- Huang K, Incognito L, Cheng X, Ulbrandt ND & Wu H (2010) Respiratory Syncytial Virus-Neutralizing Monoclonal Antibodies Motavizumab and Palivizumab Inhibit Fusion. *J. Virol.* **84**: 8132-8140
- Hudis CA (2007) Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N. Engl. J. Med* **357**: 39-51
- Jiang X-R, Song A, Bergelson S, Arroll T, Parekh B, May K, Chung S, Strouse R, Mire-Sluis A & Schenerman M (2011) Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies. *Nat Rev Drug Discov* **10**: 101-111
- Jigami Y (2008) Yeast glycobiology and its application. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **72**: 637-648
- Keane J (2005) TNF-blocking agents and tuberculosis: new drugs illuminate an old topic. *Rheumatology (Oxford)* **44**: 714-720
- Kenter MJH & Cohen AF (2006) Establishing risk of human experimentation with drugs: lessons from TGN1412. *Lancet* **368**: 1387-1391
- Khimji A & Rockey DC (2010) Endothelin--Biology and disease. *Cellular signalling* **22**: 1615-1625
- Kiewe P, Hasm\uller S, Kahlert S, Heinrigs M, Rack B, Marm\é A, Korfel A, J\ager M, Lindhofer H, Sommer H, Thiel E & Untch M (2006) Phase I trial of the trifunctional anti-HER2 x anti-CD3 antibody ertumaxomab in metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res* **12**: 3085-3091
- Kirk AD, Hale DA, Swanson SJ & Mannon RB (2006) Autoimmune thyroid disease after renal transplantation using depletion induction with alemtuzumab. *Am. J. Transplant* **6**: 1084-1085
- Kirkpatrick P (2009) Specificity concerns with antibodies for receptor mapping. *Nat Rev Drug Discov* **8**: 278
- Kohan DE (2010) Endothelin, Hypertension, and Chronic Kidney Disease: New insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **19**: 134-139
- Lai H, Engle M, Fuchs A, Keller T, Johnson S, Gorlatov S, Diamond MS & Chen Q (2010) Monoclonal antibody produced in plants efficiently treats West Nile virus infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 2419-2424
- Major EO (2009) Reemergence of PML in natalizumab-treated patients--new cases, same concerns. *N. Engl. J. Med* **361**: 1041-1043
- Martin SI, Marty FM, Fiumara K, Treon SP, Gribben JG & Baden LR (2006) Infectious complications associated with alemtuzumab use for lymphoproliferative disorders. *Clin. Infect. Dis* **43**: 16-24
- Masaki T (1995) Possible Role of Endothelin in Endothelial Regulation of Vascular Tone. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**: 235-255
- May A, Gijsman HJ, Wallnofer A, Jones R, Diener HC & Ferrari MD (1996) Endothelin antagonist bosentan blocks neurogenic inflammation, but is not effective in aborting migraine attacks. *Pain* **67**: 375-378
- McLaughlin P, Grillo-L\opez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D & Dallarè BK (1998) Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J. Clin. Oncol* **16**: 2825-2833
- Meidan R & Levy N (2007) The ovarian endothelin network: an evolving story. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **18**: 379-385

- Muller PY & Brennan FR (2009) Safety assessment and dose selection for first-in-human clinical trials with immunomodulatory monoclonal antibodies. *Clin. Pharmacol. Ther* **85**: 247-258
- Nelson JB, Udan MS, Guruli G & Pflug BR (2005) Endothelin-1 inhibits apoptosis in prostate cancer. *Neoplasia (New York, NY)* **7**: 631
- Nelson JB, Hedican SP, George DJ, Reddi AH, Piantadosi S, Eisenberger MA & Simons JW (1995) Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat Med* **1**: 944-949
- Nelson J, Bagnato A, Battistini B & Nisen P (2003) The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer* **3**: 110-116
- O'Brien SM, Kantarjian H, Thomas DA, Giles FJ, Freireich EJ, Cortes J, Lerner S & Keating MJ (2001a) Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol* **19**: 2165-2170
- O'Brien SM, Kantarjian H, Thomas DA, Giles FJ, Freireich EJ, Cortes J, Lerner S & Keating MJ (2001b) Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol* **19**: 2165-2170
- Ogunjimi AA, Chandler JM, Gooding CM, III AR & Choudary PV (1999) High-level secretory expression of immunologically active intact antibody from the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters* **21**: 561-567
- Olivier S, Jacoby M, Brillon C, Bouletreau S, Mollet T, Nerriere O, Angel A, Danet S, Souttou B, Guehenneux F, Gauthier L, Berthomé M, Vié H, Beltraminelli N & Mehtali M (2010) EB66 cell line, a duck embryonic stem cell-derived substrate for the industrial production of therapeutic monoclonal antibodies with enhanced ADCC activity. *MAbs* **2**: [Epub ahead of print]
- Olivier S & Mehtali M (2009) [Alternative production systems for therapeutic monoclonal antibodies]. *Med Sci (Paris)* **25**: 1163-1168
- Osterborg A, Karlsson C, Lundin J, Kimby E & Mellstedt H (2006) Strategies in the management of alemtuzumab-related side effects. *Semin. Oncol* **33**: S29-35
- Pallardy M (2009) [Toxic effects and use of therapeutic monoclonal antibodies]. *Med Sci (Paris)* **25**: 1130-1134
- Peréz-Soler R & Saltz L (2005) Cutaneous adverse effects with HER1/EGFR-targeted agents: is there a silver lining? *J. Clin. Oncol* **23**: 5235-5246
- Pla P & Larue L (2003) Involvement of endothelin receptors in normal and pathological development of neural crest cells. *International Journal of Developmental Biology* **47**: 315-326
- Pukac L, Kanakaraj P, Humphreys R, Alderson R, Bloom M, Sung C, Riccobene T, Johnson R, Fiscella M, Mahoney A, Carrell J, Boyd E, Yao XT, Zhang L, Zhong L, von Kerczek A, Shepard L, Vaughan T, Edwards B, Dobson C, et al. (0000) HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types in vitro and in vivo. *Br J Cancer* **92**: 1430-1441
- Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Muñoz S, Soria N, Galiana D, Bertolaccini L, Cuadrado M-J & Khamashta MA (2007) Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies: analysis of 233 cases. *Medicine (Baltimore)* **86**: 242-251
- Rask-Andersen M, Almén MS & Schiöth HB (2011) Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov* **10**: 579-590
- Raymond M-N, Bole-Feyssot C, Banno Y, Tanfin Z & Robin P (2006) Endothelin-1 Inhibits Apoptosis through a Sphingosine Kinase 1-Dependent Mechanism in Uterine Leiomyoma ELT3 Cells. *Endocrinology* **147**: 5873-5882
- Reichert JM (2011) Antibody-based therapeutics to watch in 2011. *MAbs* **3**: 76-99
- Reichert JM, Beck A & Iyer H (2009) European Medicines Agency workshop on biosimilar monoclonal antibodies: July 2, 2009, London, UK. *MAbs* **1**: 394-416
- Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB & Dewitz MC (2005) Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat. Biotechnol* **23**: 1073-1078
- Rigal E, Gateault P, Lebranchu Y & Hoarau C (2009) [Therapeutic monoclonal antibodies: update on the risk of opportunistic infections]. *Med Sci (Paris)* **25**: 1135-1140
- Rodríguez-Pascual F, Busnadiego O, Lagares D & Lamas S Role of endothelin in the cardiovascular system. *Pharmacological Research* **63**: 463-72.
- Rosanò L, Salani D, Di Castro V, Spinella F, Natali PG & Bagnato A (2002) Endothelin-1 promotes proteolytic activity of ovarian carcinoma. *Clinical Science* **103**: 306
- Rosanò L, Cianfrocca R, Masi S, Spinella F, Di Castro V, Biroccio A, Salvati E, Nicotra MR, Natali PG & Bagnato A (2009)  $\beta$ -Arrestin links endothelin A receptor to  $\beta$ -catenin signaling to induce ovarian cancer cell invasion and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 2806 -2811
- Rosanò L, Cianfrocca R, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Lucidi A, Ferrandina G, Natali PG & Bagnato A (2011) Acquisition of Chemoresistance and EMT Phenotype Is Linked with Activation of the Endothelin A Receptor Pathway in Ovarian Carcinoma Cells. *Clinical Cancer Research* **17**: 2350 -2360
- Rubanyi GM & Polokoff MA (1994) Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacological Reviews* **46**: 325 -415

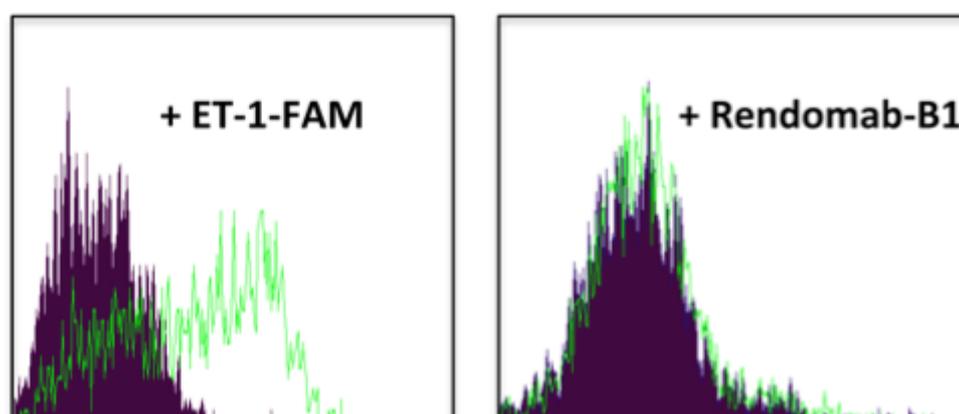
- Rudnick SI & Adams GP (2009) Affinity and avidity in antibody-based tumor targeting. *Cancer Biother. Radiopharm* **24**: 155-161
- Saif MW & Kim R (2007) Incidence and management of cutaneous toxicities associated with cetuximab. *Expert Opin Drug Saf* **6**: 175-182
- Salani D, Di Castro V, Nicotra MR, Rosanò L, Tecce R, Venuti A, Natali PG & Bagnato A (2000a) Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *American Journal of Pathology* **157**: 1537
- Salani D, Taraboletti G, Rosanò L, Di Castro V, Borsotti P, Giavazzi R & Bagnato A (2000b) Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *American Journal of Pathology* **157**: 1703
- Scartozzi M, Bianconi M, Maccaroni E, Giampieri R, Berardi R & Cascinu S (2010) Dalotuzumab, a recombinant humanized mAb targeted against IGFR1 for the treatment of cancer. *Curr. Opin. Mol. Ther* **12**: 361-371
- Shen J & Zhu Z (2008) Catumaxomab, a rat/murine hybrid trifunctional bispecific monoclonal antibody for the treatment of cancer. *Curr. Opin. Mol. Ther* **10**: 273-284
- Spinella F, Caprara V, Garrafa E, Di Castro V, Rosano L, Natali PG & Bagnato A (2010) Endothelin axis induces metalloproteinase activation and invasiveness in human lymphatic endothelial cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **88**: 782-787
- Spinella F, Garrafa E, Di Castro V, Rosanò L, Nicotra MR, Caruso A, Natali PG & Bagnato A (2009) Endothelin-1 stimulates lymphatic endothelial cells and lymphatic vessels to grow and invade. *Cancer research* **69**: 2669
- Spinella F, Rosanò L, Di Castro V, Decandia S, Nicotra MR, Natali PG & Bagnato A (2007) Endothelin-1 and endothelin-3 promote invasive behavior via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in human melanoma cells. *Cancer research* **67**: 1725
- Stojilkovic SS & Catt KJ (1996) Expression and signal transduction pathways of endothelin receptors in neuroendocrine cells. *Front Neuroendocrinol* **17**: 327-369
- Strohl WR (2009) Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. *Curr. Opin. Biotechnol* **20**: 685-691
- Strohl WR Therapeutic Monoclonal Antibodies: Past, Present, and Future. : 1-50
- Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD & Panoskaltsis N (2006) Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N. Engl. J. Med* **355**: 1018-1028
- Tang B, Yu S, Zheng M, Ding F, Zhao R, Zhao J, Dai Y & Li N (2008) High level expression of a functional human/mouse chimeric anti-CD20 monoclonal antibody in milk of transgenic mice. *Transgenic Res* **17**: 727-732
- Thurber GM, Schmidt MM & Wittrup KD (2008) Factors determining antibody distribution in tumors. *Trends Pharmacol Sci* **29**: 57
- Thursky KA, Worth LJ, Seymour JF, Miles Prince H & Slavin MA (2006) Spectrum of infection, risk and recommendations for prophylaxis and screening among patients with lymphoproliferative disorders treated with alemtuzumab\*. *Br. J. Haematol* **132**: 3-12
- Vacca F, Bagnato A, Catt KJ & Tecce R (2000) Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signaling in human ovarian carcinoma cells. *Cancer research* **60**: 5310
- Vatter H, Konczalla J & Seifert V (2011) Endothelin related pathophysiology in cerebral vasospasm: what happens to the cerebral vessels? *Acta Neurochir. Suppl* **110**: 177-180
- Vézina L-P, Faye L, Lerouge P, D'Aoust M-A, Marquet-Blouin E, Burel C, Lavoie P-O, Bardor M & Gomord V (2009) Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants. *Plant Biotechnol. J* **7**: 442-455
- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ & Press M (2002) Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol* **20**: 719-726
- Wülfing P, Kersting C, Tio J, Fischer RJ, Wülfing C, Poremba C, Diallo R, Böcker W & Kiesel L (2004) Endothelin-1-, endothelin-A-, and endothelin-B-receptor expression is correlated with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in breast cancer. *Clinical cancer research* **10**: 2393
- Ward M, Lin C, Victoria DC, Fox BP, Fox JA, Wong DL, Meerman HJ, Pucci JP, Fong RB, Heng MH, Tsurushita N, Gieswein C, Park M & Wang H (2004) Characterization of Humanized Antibodies Secreted by *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2567-2576
- Weber J (2009) Ipilimumab: controversies in its development, utility and autoimmune adverse events. *Cancer Immunol. Immunother* **58**: 823-830

- Wing MG, Moreau T, Greenwood J, Smith RM, Hale G, Isaacs J, Waldmann H, Lachmann PJ & Compston A (1996) Mechanism of first-dose cytokine-release syndrome by CAMPATH 1-H: involvement of CD16 (Fcγ<sub>3</sub>) and CD11a/CD18 (LFA-1) on NK cells. *J Clin Invest* **98**: 2819-2826
- Wing M (2008) Monoclonal antibody first dose cytokine release syndromes-mechanisms and prediction. *J Immunotoxicol* **5**: 11-15
- Winkler U, Jensen M, Manzke O, Schulz H, Diehl V & Engert A (1999) Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8). *Blood* **94**: 2217-2224
- Wulfing C, Eltze E, Yamini J, Wulfing P, Bierer S, Bocker W, Hertle L, Semjonow A & Sievert KD (2005) Expression of the endothelin axis in bladder cancer: relationship to clinicopathologic parameters and long-term survival. *European urology* **47**: 593-600
- Yousry TA, Major EO, Ryschkewitsch C, Fahle G, Fischer S, Hou J, Curfman B, Miszkiel K, Mueller-Lenke N, Sanchez E, Barkhof F, Radue E-W, Jäger HR & Clifford DB (2006) Evaluation of Patients Treated with Natalizumab for Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *N Engl J Med* **354**: 924-933
- Zeng Y, Wu XX, Fiscella M, Shimada O, Humphreys R, Albert V & Kakehi Y (2006) Monoclonal antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2 (TRAIL-R2) induces apoptosis in primary renal cell carcinoma cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Int. J. Oncol* **28**: 421-430

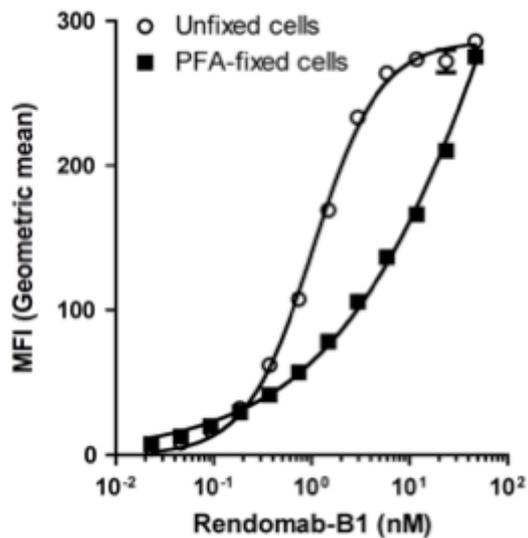
## Supplementary figures and legends



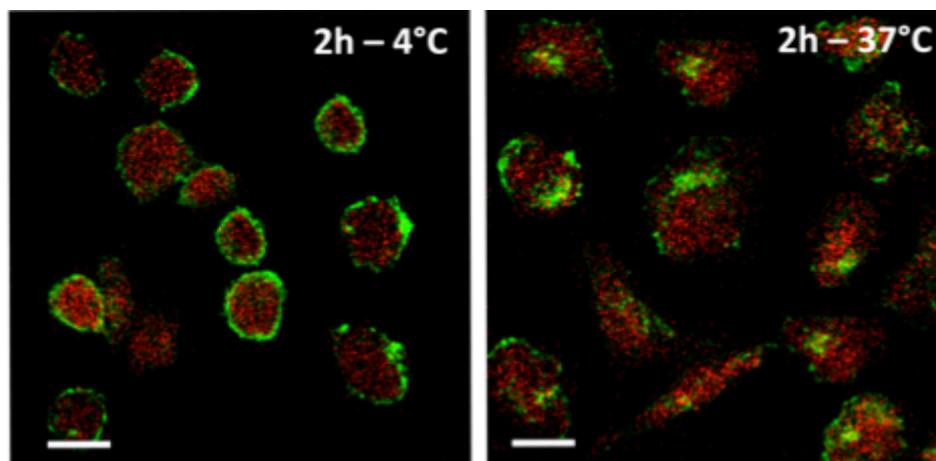
**FIGURE S1. DNA immunization generates specific anti-ET<sub>B</sub>R polyclonal antibodies.** (A) The anti-ET<sub>B</sub>R polyclonal immune response was monitored along the immunization procedure. Sera (B<sub>x</sub>) were collected before and after the DNA immunizations and cell boosts, and then assayed by flow cytometry on hET<sub>B</sub>R transfected CHO cells. (B) Sera corresponding to the fifth blood puncture (B<sub>5</sub>) were analyzed for their specificity towards ET<sub>B</sub>R, using flow cytometry on transfected and untransfected cells. Fluorescence ratio between ET<sub>B</sub>R-transfected and untransfected cells is reported for each serum and stands for the specificity of the serum. mx = ET<sub>B</sub>R immunized mouse n<sup>o</sup>x ; mxC = empty plasmid immunized mouse n<sup>o</sup>x. \*, \*\*, \*\*\* stand for P < 0.05, 0.01 and 0.001 respectively for a Student's t test (comparison between ET<sub>B</sub>R and control mice group).



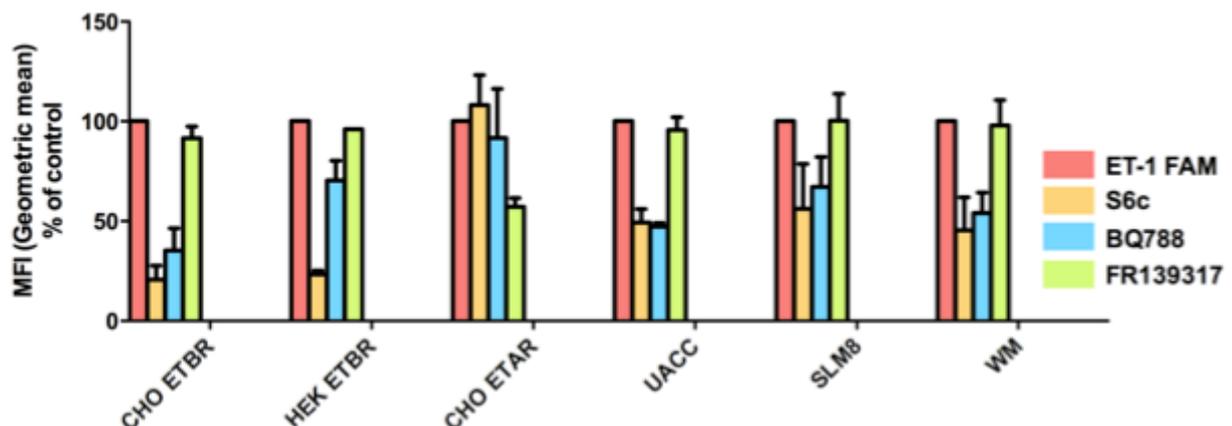
**FIGURE S2. Rendomab-B1 does not cross-react with rat ET<sub>B</sub>R.** CHO cells were transiently transfected with a rat ET<sub>B</sub>R plasmid and then incubated with 100 nM ET-1 FAM or 50 nM Rendomab-B1. Staining was analyzed by flow cytometry. Violet histograms represent cell incubated with buffer (left panel) or with an isotype control antibody (right panel). Green histograms stand for cells exposed to ET-1 FAM (left panel) or Rendomab-B1 (right panel).



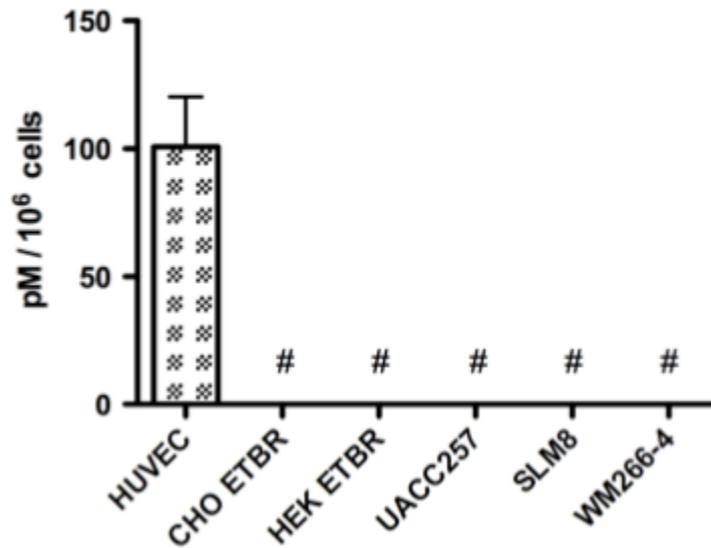
**FIGURE S3. Rendomab-B1 affinity for ET<sub>B</sub>R is impaired when cells are fixed with 4% paraformaldehyde.** CHO-ET<sub>B</sub>R cells were fixed (or not) in 4% PFA for 10 minutes at room temperature and then incubated with varying concentrations of rendomab-B1 for 24 h at 4°C. Rendomab-B1 staining was measured by flow cytometry and binding curves were generated by plotting MFI values versus antibody concentrations. Curves were fitted with the adequate saturation binding equation in GraphPad Prism software. A dissociation constant of approximately 1 nM was obtained for unfixed cells whereas the KD for PFA-treated cells was superior to 100 nM.



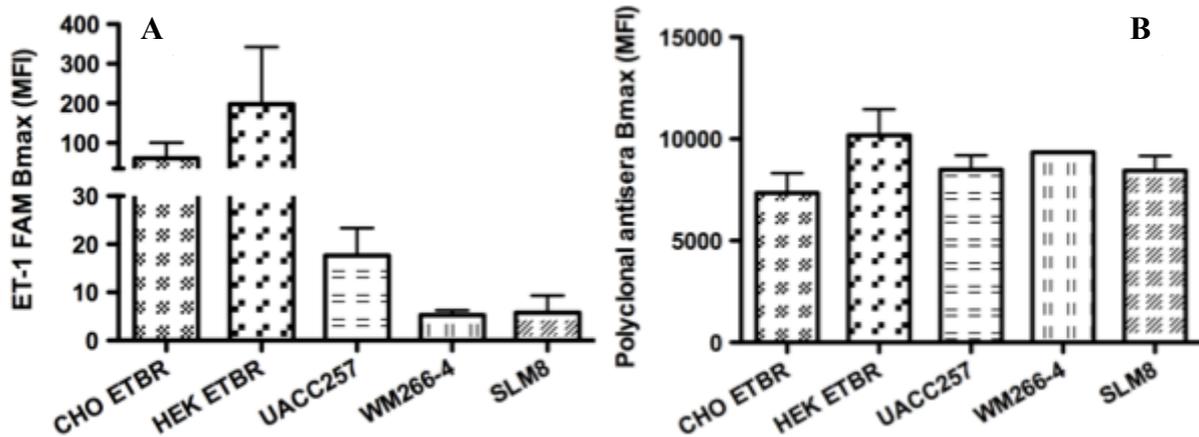
**FIGURE S4. Rendomab-B1 triggers ET<sub>B</sub>R internalization at physiological temperatures.** Viable CHO ET<sub>B</sub>R cells were stained with 100 nM of fluorescently-labeled-rendomab-B1 (green signal) for 2 h at 4° or 37°C. Afterwards, cells were permeabilized to allow Lysosomal Associated Membrane Protein 1 (LAMP1, Red fluorescence) staining. Merged images are presented. Nuclear staining with DRAQ5 is not displayed. The white bars in bottom left corners stand for ten micrometers.



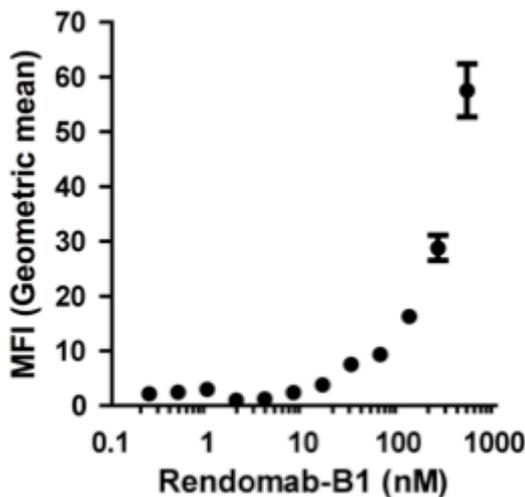
**FIGURE S5. ET-1 FAM labeling of human melanoma cells is due to functional ET<sub>B</sub>R expression and localization at the cell membrane.** Indicated cell lines were pre-incubated for 1 h at 37°C with 500 nM S6c, BQ788 or FR139317, and then exposed to 100 nM ET-1 FAM, overnight at 4°C. The following day ET-1 fluorescence was measured using a flow cytometer. Data are represented as percent of the signal obtained with ET-1 FAM alone (without pre-incubation). Error bars stand for the standard deviation of three independent experiments.



**FIGURE S6. Human melanoma cell lines do not produce detectable amounts of endothelin peptides whereas HUVEC synthesize high quantities of endothelins.** Cells were grown on 100 mm petri dishes, in 10 ml medium, until confluence. 1 ml of medium was sampled and snap-frozen into liquid nitrogen until use in the ELISA assay. Cells were numbered to express results in pM of produced endothelins per million cells. The assay sensitivity is around 1 pg/ml. Error bars correspond to the standard deviation of at least three independent samples. #: undetectable.



**FIGURE S7. ETBR expressed at the surface of melanoma cells are heterogeneous with a high proportion of non-functional receptors.** Cell lines were incubated overnight with increasing concentrations of ET-1 FAM (A) or increasing dilutions of specific anti-ETBR polyclonal antisera (B). Resulting binding curves (presented in figure 6) were analysed using GraphPad Prism software and calculated saturating concentrations (B<sub>MAX</sub>) were collected and displayed here as bar graphes. Error bars correspond to the standard deviation of at least three independent experiments.



**FIGURE S8. Rendomab-B1 binding onto HUVEC is not saturable.** HUVEC were incubated with varying concentrations of rendomab-B1 for 24 h at 4°C, before analysis by flow cytometry. Binding curves were fitted with the appropriate equation using GraphPad Prism software. Presented figure is representative of three independent experime

### 3.3. Conclusions et perspectives de l'article

Cet article décrit la production et la caractérisation d'un nouvel anticorps monoclonal ciblant le récepteur ETB, un RCPG impliqué dans la progression tumorale de divers cancers. Cet anticorps, nommé rendomab-B1, présente des propriétés intéressantes et originales permettant d'envisager une application potentielle pour la thérapie des cancers. En effet, grâce à son action antagoniste, le rendomab-B1 est capable de bloquer l'interaction entre l'ET-1 et le récepteur ETB, empêchant ainsi le déclenchement de voies de signalisation pro-tumorigènes, en particulier dans les cellules endothéliales avoisinant les tumeurs. A notre connaissance, le rendomab-B1 est le premier anticorps anti-ETBR possédant une activité antagoniste. D'après nos résultats, le rendomab-B1 permet d'interrompre la stimulation autocrine des cellules HUVEC par l'ET-1, entraînant ainsi une forte baisse de la viabilité cellulaire. Par conséquent, le rendomab-B1 pourrait se révéler particulièrement utile pour bloquer les effets pro-angiogéniques de l'ET-1 [516], qui est par ailleurs abondamment sécrétée par certaines tumeurs (e.g. ovaire, prostate), entraînant ainsi une hyperstimulation des cellules endothéliales environnantes et la production de nouveaux vaisseaux sanguins. La fixation du rendomab-B1 sur le récepteur ETB, surexprimé et hyperstimulé au niveau de l'endothélium tumoral de cancers ovariens en particulier, pourrait également favoriser l'infiltration de lymphocytes T cytotoxiques au sein de la masse tumorale et ainsi améliorer l'efficacité de vaccins antitumoraux, comme cela a été montré récemment par Buckanovich et son équipe en utilisant du BQ788 [452], un antagoniste spécifique du récepteur ETB, moins efficace que le rendomab-B1 dans nos conditions expérimentales. Ces hypothèses sont actuellement évaluées *in vitro* au laboratoire grâce à des tests d'inhibition de la prolifération des HUVEC, d'inhibition de la formation de tubes par les HUVEC, ou des expériences de migration de lymphocytes T à travers une barrière endothéliale. Par ailleurs, à cause de l'absence de réaction croisée du rendomab-B1 avec le récepteur ETB murin, des expériences *in vivo* chez la souris ou le rat sont difficilement envisageables.

Le deuxième aspect de l'étude du rendomab-B1 a porté sur la caractérisation du site de liaison de l'anticorps sur le récepteur ETB. L'épitope du rendomab-B1 n'a pas été déterminé avec certitude. Cependant, une combinaison de techniques et de résultats permet d'affirmer que l'épitope reconnu est conformationnel (tests de reconnaissance en western blot, fixation des cellules au PFA) et qu'il pourrait impliquer une partie de la queue N-terminale et de la deuxième boucle extracellulaire du récepteur ETB (expériences de Pepscan). Quoiqu'il en soit, cet épitope est très étroitement lié au site de liaison des endothélines, comme le prouvent

les expériences de compétition, mais ne correspond pas à la zone exacte de fixation des endothélines puisque d'autres tests nous ont permis d'établir que le rendomab-B1 est un inhibiteur allostérique de la liaison de l'ET-1. La génération de récepteurs ETB chimères, pour lesquels chaque boucle extracellulaire est substituée séquentiellement avec une boucle appartenant à un autre RCPG (e.g. ETAR) [331], devrait permettre de confirmer ou non les résultats obtenus par la méthode Pepsan. La détermination précise du site de liaison du rendomab-B1 sur le récepteur ETB pourrait apporter de nouveaux indices concernant la localisation des sites de liaison des endothélines sur leurs récepteurs [348].

La production d'anticorps anti-ETBR dans l'optique d'une utilisation en thérapie anticancéreuse, inclut forcément l'étude de la fixation des anticorps produits sur des lignées de mélanomes. En effet, les mélanomes sont connus pour surexprimer fortement le récepteur ETB et la majeure partie des publications scientifiques dédiées au rôle de ce récepteur en oncologie concerne ce type de tumeurs [331, 447, 535]. Par conséquent, la fixation du rendomab-B1 a été étudiée sur plusieurs lignées de mélanomes humains. De façon surprenante, et malgré la présence de récepteurs ETB fonctionnels à la surface des mélanomes, la liaison du rendomab-B1 est grandement altérée par rapport à celle observée sur les lignées cellulaires transfectées avec le récepteur ETB sauvage. Cette liaison différentielle entre les deux modèles cellulaires n'est pas retrouvée si on utilise de l'ET-1 ou des sera polyclonaux anti-ETBR. Ainsi, ces données suggèrent que le récepteur ETB exprimé par les cellules tumorales de mélanomes présente des modifications structurales n'affectant pas la liaison de l'ET-1 mais, par contre, altérant fortement la fixation du rendomab-B1. Ce résultat surprenant décrit pour la première fois la présence potentielle à la surface des mélanomes, de récepteurs ETB « tumoraux » structurellement différents des récepteurs « normaux ». Le rendomab-B1 pourrait donc constituer une sonde moléculaire de choix pour étudier les caractéristiques structurales des récepteurs ETB à la surface des mélanomes. Ces données ouvrent également la voie à la production d'anticorps monoclonaux spécifiques de la forme « tumorale » du récepteur ETB, une structure moléculaire retrouvée dans les mélanomes mais qui pourrait tout à fait être présente dans d'autres types de cancers (e.g. les glioblastomes).

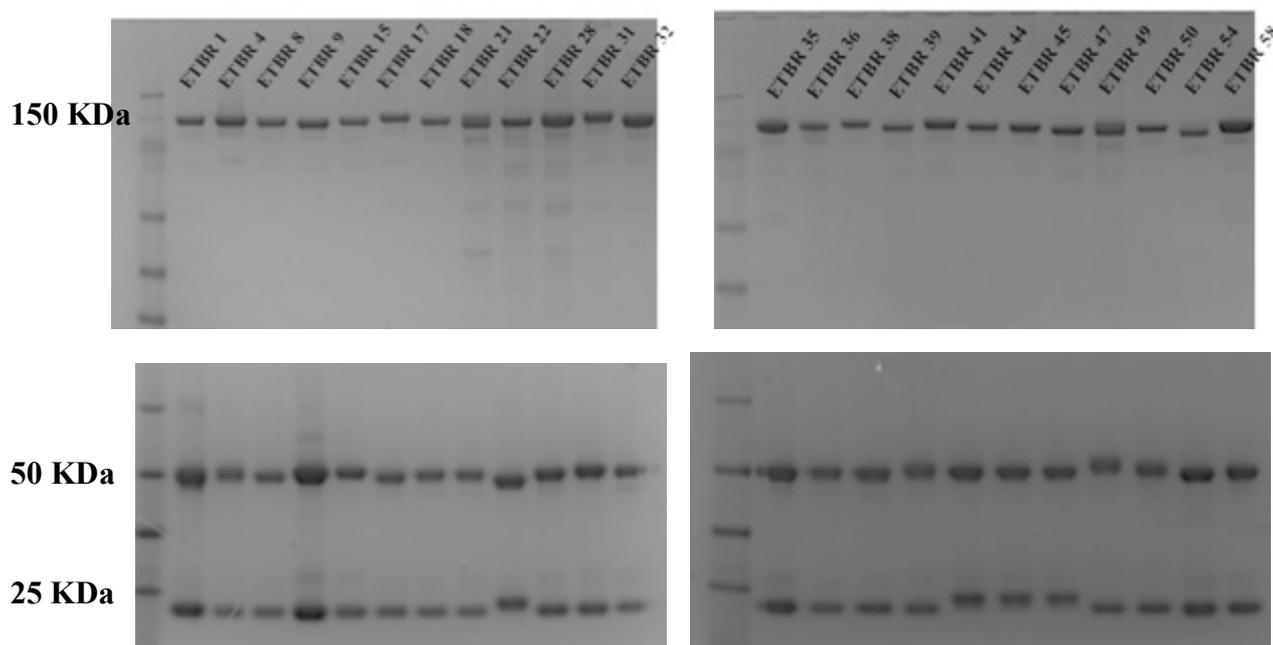
### *3.4. Deuxième fusion cellulaire « ETBR » : production et caractérisation de 26 anticorps monoclonaux anti-ETBR*

La première fusion n'ayant abouti à la sélection que d'un seul anticorps monoclonal, une deuxième campagne d'immunisation suivie d'une fusion cellulaire a été réalisée. Pour cette seconde tentative, nous avons amélioré les conditions expérimentales de la première fusion qui ne nous avait permis d'obtenir qu'un seul clone d'hybridome spécifique. Le problème majeur lors de la première fusion était le nombre trop important de rappels cellulaires conduisant à une production non négligeable d'anticorps non spécifiques. Ainsi, pour cette seconde campagne d'immunisation, seulement deux rappels cellulaires ont été effectués avant l'étape de fusion.

Le rendement de cette seconde fusion a été très bon puisque 1610 puits sur 1920 (20 plaques de 96 puits) ont donné lieu à la formation d'hybridomes. A la suite du premier criblage, toujours en ELISA sur cellules vivantes, 169 hybridomes se sont révélés positifs (i.e. donnant un signal significatif sur des cellules CHO ET<sub>B</sub>R) et ont donc été transférés en plaques de 48 puits. Après expansion en plaques de 48 puits, les surnageants des hybridomes positifs identifiés lors du premier criblage ont été analysés par cytométrie en flux et ELISA cellulaire sur différentes lignées de cellules afin de s'assurer de la spécificité des anticorps pour ETBR. Cette analyse a mis en jeu des cellules non transfectées (CHO-WT), des cellules transfectées avec un RCPG non pertinent (CHO-NK1), des cellules transfectées avec le récepteur ETB (CHO ETBR) et des cellules CHO ETBR préincubées avec de l'ET-1 à 37°C afin d'induire l'internalisation des récepteur à la surface de ces cellules. Le marquage fluorescent différentiel des surnageants sur ces quatre types cellulaires a donné lieu à la sélection de 59 hybridomes, présentant un marquage au moins deux fois plus fort sur les CHO ETBR par rapport à celui observé sur les autres types cellulaires. Ces 59 hybridomes positifs et spécifiques ont ensuite été soumis au processus de dilution limite [583], permettant d'obtenir des clones purs monoclonaux et aussi d'éliminer les hybridomes instables dans le temps. A la suite de cette étape, 26 clones purs se sont maintenus ; les anticorps ont été isotypés (voir figure 51 – page 146) puis les 23 gamma globulines ont été purifiées. La purification des anticorps (à partir de liquide d'ascite) par chromatographie d'affinité a permis d'obtenir une pureté maximale (figure 54), compatible avec de futures analyses biochimiques et pharmacologiques.

Cette deuxième fusion a donc été bien plus efficace que la première, et ce probablement grâce au nombre limité de rappels cellulaires. On notera également

l'importance du test de criblage différentiel en ELISA sur cellules vivantes [584, 585], réalisé sur plusieurs types cellulaires, qui a permis de sélectionner le plus rapidement possible des hybridomes sécrétant des anticorps spécifiques de la cible dans son contexte physiologique.

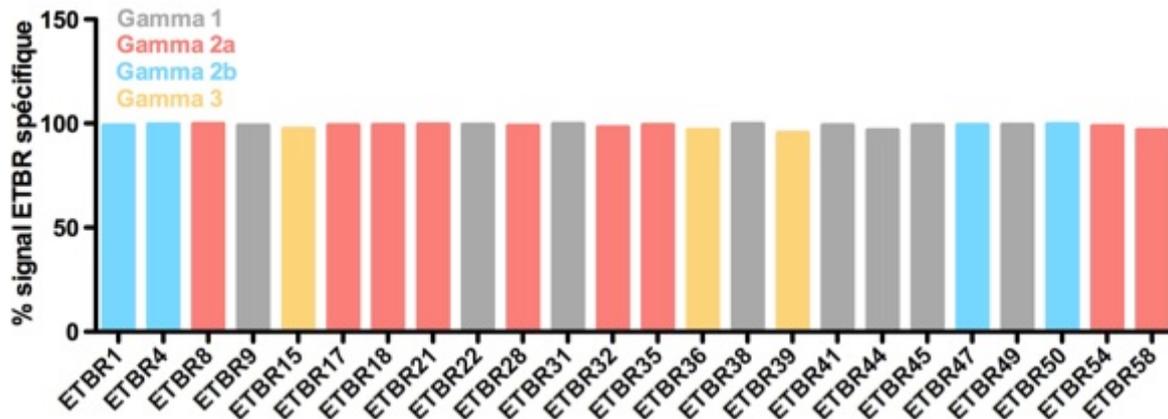


**Figure 54. Analyse des anticorps sur gel après purification par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine A.** Les deux images du haut correspondent à un gel SDS-PAGE en conditions non réductrices permettant de conserver l'anticorps entier, alors que les deux photos du bas présentent une migration en conditions réductrices entraînant la dissociation des chaînes lourdes et des chaînes légères. Les différentes gamma globulines obtenues sont nommée ETBR xx. Le remomab-B1 correspond à ETBR 1.

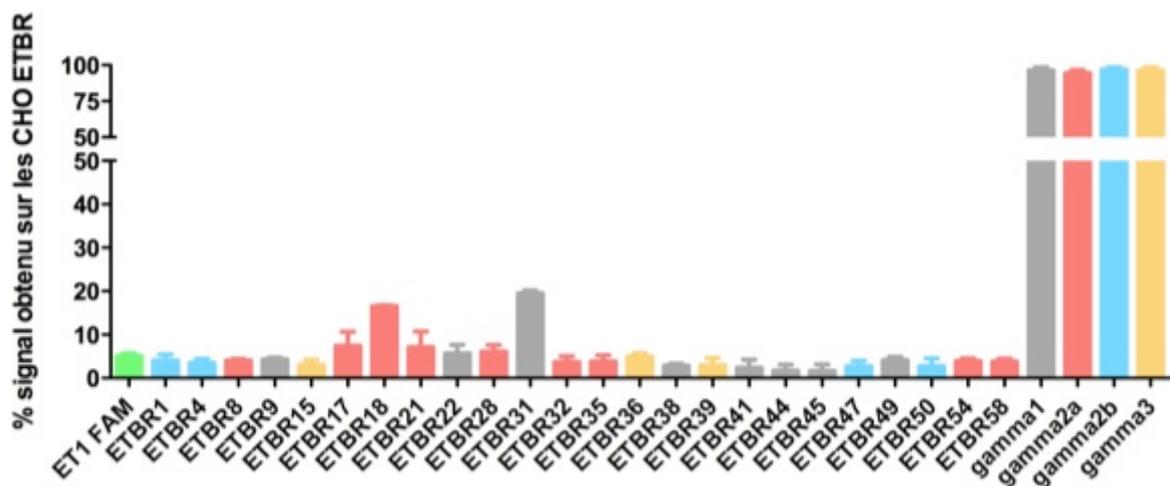
### 3.5. Les anticorps produits ciblent spécifiquement le récepteur ETB

Après avoir vérifié la pureté et l'intégrité des différents anticorps monoclonaux par électrophorèse, leur spécificité vis à vis du récepteur ETB à été étudiée, ce qui a également permis de valider la méthode de criblage en ELISA cellulaire utilisée pour la sélection des anticorps.

Les anticorps purifiés ont tous été analysés par cytométrie en flux sur différents types cellulaires : des cellules CHO WT, CHO ETBR, et des cellules CHO ETBR transfectées transitoirement avec un siRNA ciblant le transcrit ETBR. Comme le montrent les figures 55 et 56, les 24 anticorps analysés sont spécifiques du récepteur ETB. La figure 55 indique que les anticorps monoclonaux ne se fixent quasiment pas sur les cellules CHO WT et présentent donc une spécificité proche de 100 % vis à vis du récepteur ETB. En effet, tous les anticorps présentent un marquage au moins 30 fois plus fort sur les CHO ETBR par rapport à celui observé sur les cellules CHO WT (sachant que les marquages obtenus pour les CHO WT sont tous proches de zéro). Néanmoins, ce résultat n'exclut pas la possibilité que les anticorps



**Figure 55. Comparaison de la fixation des anticorps monoclonaux entre les CHO WT et les CHO ETBR.** Les anticorps (100 nM) sont incubés avec des CHO WT ou des CHO ETBR. Le marquage des cellules est ensuite révélé par cytométrie en flux grâce à un anticorps secondaire. Les intensités moyennes de fluorescence sont collectées et le pourcentage de signal spécifique est déterminé comme suit :  $[MFI (CHO ETBR) - MFI (CHO WT)] / MFI (CHO ETBR) * 100$ .



**Figure 56. Comparaison de la fixation des anticorps monoclonaux sur des cellules CHO ETBR transfectées ou non avec un siRNA spécifique du transcrit ETBR.** La fixation des anticorps sur les différents types cellulaires est évaluée comme mentionné dans la légende de la figure précédente. Les fixations des anticorps sur les cellules traitées avec le siRNA sont présentées comme le pourcentage du signal obtenu sur les cellules non transfectées. Le contrôle positif permettant d'évaluer l'extinction du récepteur ETB à la surface des cellules consiste à incuber les cellules avec de l'ET-1 FAM. Les colonnes nommées « gamma1 », « gamma2a », « gamma2b » et « gamma3 » correspondent à l'utilisation d'anticorps témoins possédant l'isotype mentionné.

puissent se fixer sur une autre protéine membranaire exprimée par les CHO ETBR et non présente sur les CHO WT. Ainsi, afin de vraiment s'assurer de la spécificité des anticorps pour le récepteur ETB, leur fixation a été étudiée sur des cellules CHO ETBR préalablement transfectées avec un siRNA ciblant l'ARNm codant ETBR, et comparée à celle obtenue sur des cellules non transfectées. Comme on peut l'observer sur la figure 56, les 24 anticorps présentent un marquage beaucoup moins fort lorsque l'expression du récepteur ETB est diminuée par l'action du siRNA: on constate une perte d'au moins 80% du signal observé sur les cellules non transfectées et de 90% si on exclut les anticorps 18 et 31. De plus, la diminution du signal observée pour tous les anticorps est parfaitement corrélée avec la baisse

d'expression du récepteur ETB estimée à environ 95% grâce au marquage des cellules avec de l'ET-1 FAM. La perte de signal moins importante observée pour les anticorps 18 et 31 suggère que ces deux anticorps pourraient se fixer faiblement à d'autres protéines membranaires présentes à la surface des cellules CHO ETBR. Par conséquent, ces résultats démontrent la spécificité de l'ensemble des anticorps produits vis à vis du récepteur ETB. Ces données valident également la méthode d'immunisation ainsi que le test de criblage, qui apparaissent donc comme des procédés particulièrement intéressants pour générer et sélectionner des anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement la conformation native de cibles membranaires comme les RCPGs.

### 3.6. Les anticorps reconnaissent le récepteur ETB avec une forte affinité

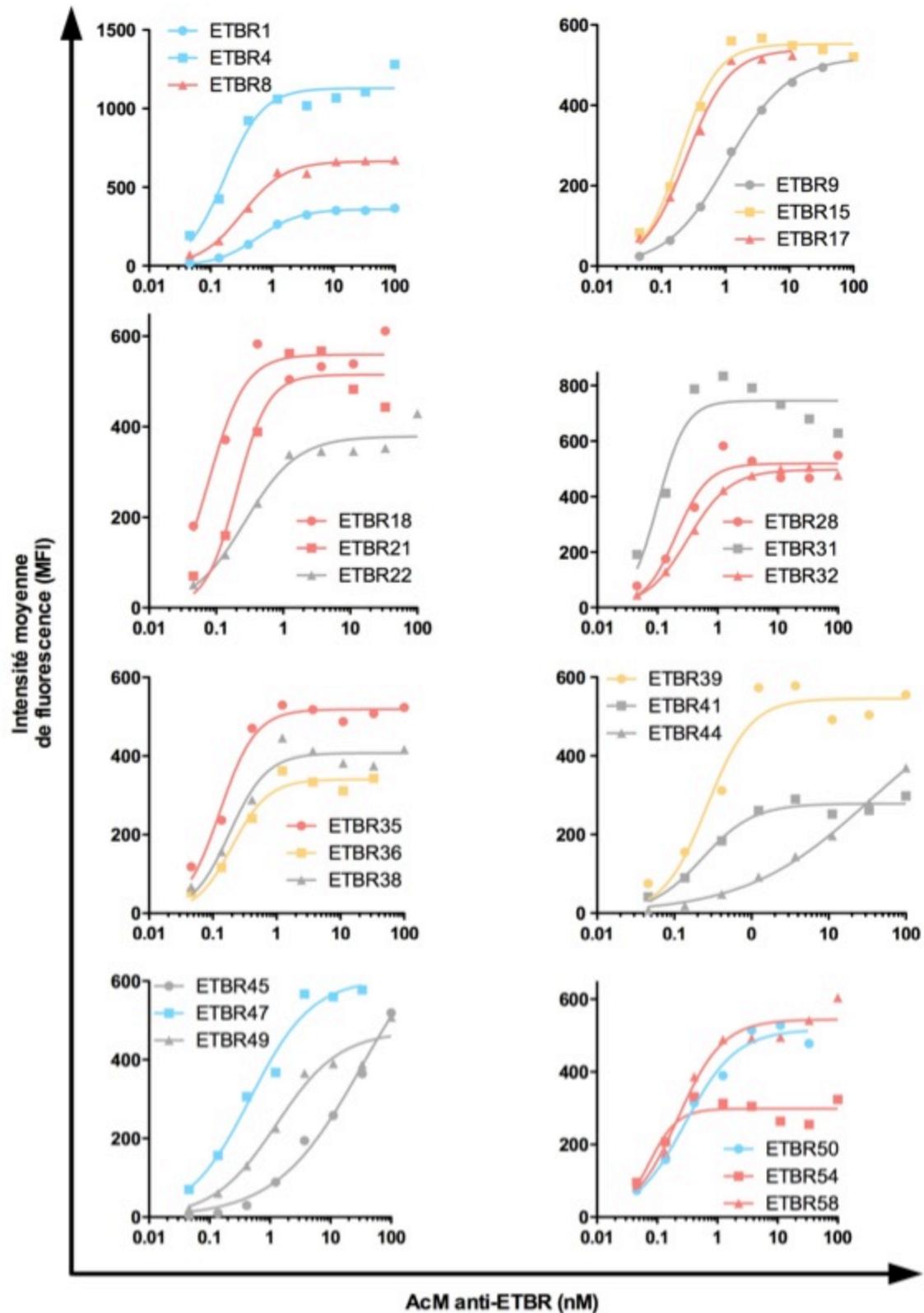
L'affinité ou constante de dissociation ( $K_D$ ) pour sa cible est un paramètre clé pour un agent thérapeutique quelle que soit sa nature (protéique ou chimique). En effet, l'affinité reflète la spécificité du composé, permet de le comparer à d'autres molécules reconnaissant la même cible et donne une indication sur la concentration à utiliser pour observer des effets pharmacologiques, au moins *in vitro*. Par conséquent, les constantes de dissociation de tous les anticorps ont été déterminées sur les deux modèles cellulaires surexprimant ETBR dont nous disposons. Des expériences de saturation de la liaison à équilibre ont été réalisées et analysées par cytométrie en flux sur cellules intactes (non fixées) afin d'évaluer l'affinité des anticorps pour un récepteur ETB natif, dans son contexte membranaire. Comme le montre la figure 57, les anticorps présentent une liaison saturable sur les cellules CHO ETBR (les courbes présentées dans la figure sont représentatives des résultats obtenus avec tous les anticorps sur les cellules CHO et HEK ETBR). Les affinités calculées par modélisation mathématique des courbes de liaison sont majoritairement inférieures au nanomolaire (tableau 9), indiquant une interaction très forte entre les anticorps et le récepteur ETB. On note tout de même quelques anticorps ayant une affinité moins forte (plusieurs dizaines de nanomolaires), comme ETBR 44 ou 45 sur les CHO ETBR ; néanmoins, pour ces deux anticorps, une affinité de l'ordre du nanomolaire est retrouvée avec les HEK ETBR. Pour tous les anticorps, excepté ETBR 44, 45 et 49, les affinités pour le récepteur ETB sont similaires pour les cellules CHO ETBR et HEK ETBR.

Si on s'intéresse aux intensités maximales de fluorescence obtenues (correspondant aux plateaux ou  $B_{MAX}$ ), on constate que, de manière surprenante, les  $B_{MAX}$  ne sont pas similaires entre les différents anticorps, sur une même expérience avec le même lot de cellules (figure 57). Ceci pourrait être dû aux différents isotypes des anticorps, reconnus chacun d'une

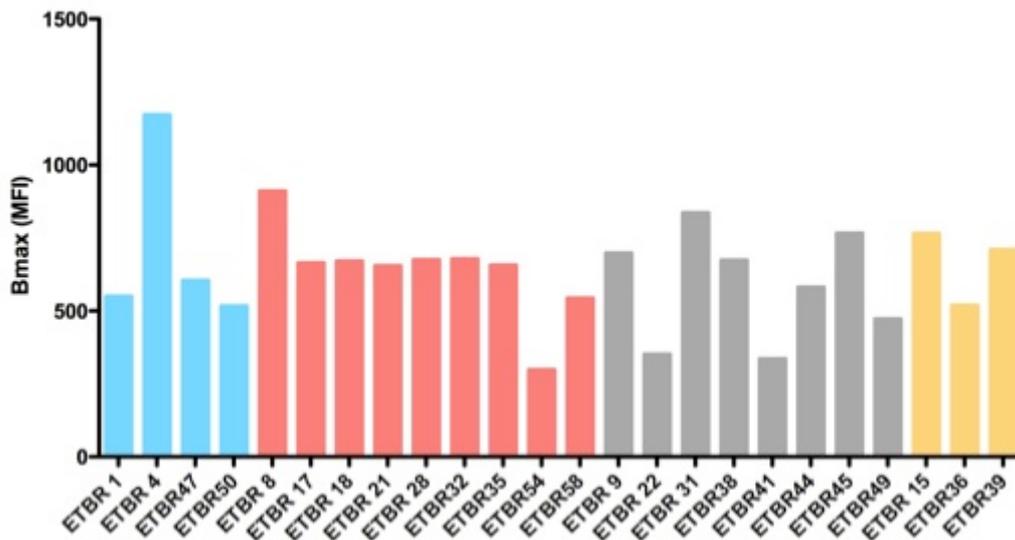
façon spécifique par l'anticorps secondaire utilisé pour révéler le marquage. Cependant, si on regroupe les anticorps par isotype, on observe encore de grandes variations de  $B_{MAX}$  (Figure 58). Cette observation suggère que les épitopes reconnus par les anticorps sont différents et plus ou moins accessibles, entraînant ainsi des  $B_{MAX}$  différents malgré un nombre de récepteurs identique à la surface des cellules. Si cette hypothèse est vraie cela impliquerait que cellules transfectées stablement avec ETBR (CHO ou HEK) expriment le récepteur d'une manière hétérogène, une hétérogénéité qui pourrait refléter une exposition différentielle des épitopes à la surface des cellules. En effet, on peut imaginer par exemple qu'une fraction des récepteurs à la surface des cellules soit présentée sous forme de dimères, entraînant ainsi le masquage ou au contraire l'apparition de nouveaux épitopes pour certains anticorps et donc un  $B_{MAX}$  plus faible ou plus élevé. L'hétérogénéité des récepteurs pourrait tout aussi bien résulter de la présence de différentes glycoformes, de variants d'épissage, de différents conformères ou de la localisation de certains récepteurs dans des zones membranaires particulières (e.g. des rafts), tous ces facteurs pouvant moduler la structure moléculaire du récepteur et donc l'accessibilité de certains épitopes [586-588].

	Affinité – KD (nM)		
	CHO ETBR	HEK ETBR	CHO ETAR
ETBR1	0,55 ± 0,05	0,60 ± 0,02	> 100
ETBR4	0,15 ± 0,03	0,42 ± 0,02	> 100
ETBR8	0,33 ± 0,01	0,35 ± 0,04	> 100
ETBR9	2,16 ± 1,36	0,52 ± 0,05	> 100
ETBR15	0,24 ± 0,06	0,46 ± 0,06	> 100
ETBR17	0,38 ± 0,13	0,50 ± 0,05	> 100
ETBR18	0,08 ± 0,01	0,19 ± 0,03	> 100
ETBR21	0,17 ± 0,02	0,30 ± 0,06	46
ETBR22	0,30 ± 0,05	0,55 ± 0,08	> 100
ETBR28	0,19 ± 0,01	0,34 ± 0,03	18.6
ETBR31	0,09 ± 0,01	0,20 ± 0,01	> 100
ETBR32	0,47 ± 0,22	0,41 ± 0,03	> 50
ETBR35	0,15 ± 0,03	0,33 ± 0,08	> 100
ETBR36	0,32 ± 0,17	0,27 ± 0,12	> 100
ETBR38	0,26 ± 0,11	0,20 ± 0,09	> 100
ETBR39	0,25 ± 0,03	0,33 ± 0,15	> 100
ETBR41	0,27 ± 0,04	0,38 ± 0,13	> 100
ETBR44	25,2 ± 11,7	0,49 ± 0,06	> 100
ETBR45	> 50	1,29 ± 0,01	> 100
ETBR47	0,66 ± 0,27	0,33 ± 0,05	> 100
ETBR49	4,47 ± 0,13	0,71 ± 0,03	> 100
ETBR50	0,41 ± 0,12	0,22 ± 0,08	> 100
ETBR54	0,10 ± 0,05	0,17 ± 0,07	> 100
ETBR58	0,32 ± 0,14	0,35 ± 0,11	> 100

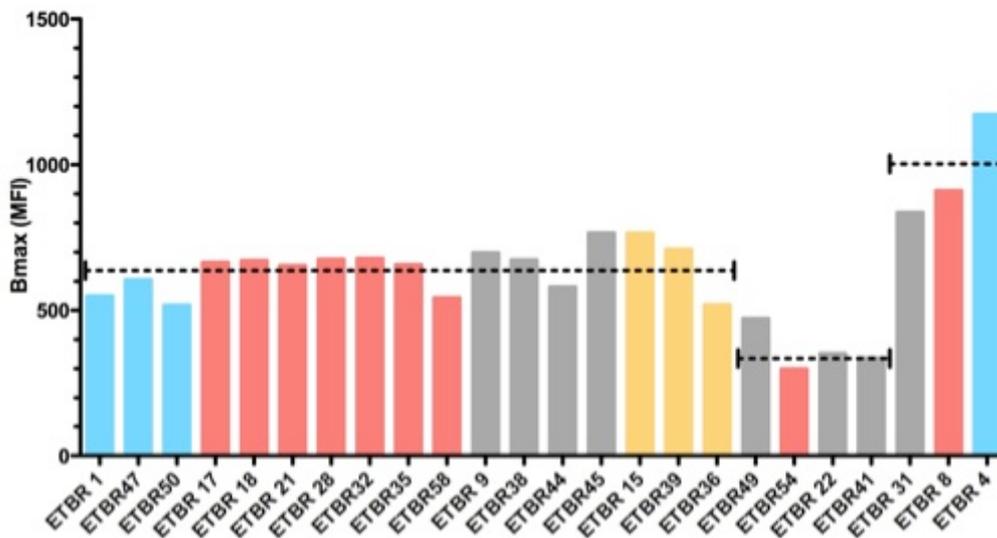
**Tableau 9. Affinité des différents anticorps pour ETBR et ETAR.** Les  $K_D$  sont calculés à partir des courbes de saturation obtenues après analyse par cytométrie en flux. Les valeurs présentées représentent la moyenne ± SD de deux expériences indépendantes.



**Figure 57. Saturation de la liaison à l'équilibre des différents anticorps anti-ETBR.** Des concentrations croissantes d'anticorps sont incubées 24 h avec des CHO ETBR. Le marquage est analysé par cytométrie en flux avec un anticorps secondaire. Les courbes sont tracées avec le logiciel GraphPad Prism en modélisant les données avec une équation appropriée. Les affinités calculées par le logiciel sont présentées dans le tableau 9. Les courbes présentées dans cette figure relatent les résultats obtenus avec les cellules CHO ETBR. On obtient des résultats similaires avec des cellules HEK ETBR. Les courbes grises, rouges, bleues et jaunes correspondent respectivement aux isotypes : IgG1, 2a, 2b et 3.



**Figure 58.  $B_{MAX}$  des différents anticorps groupés par isotype.** Les  $B_{MAX}$  sont déterminés grâce aux expériences de saturation à l'équilibre sur les CHO ETBR. Les anticorps sont groupés par isotype : bleu =  $\gamma 2b$  ; rouge =  $\gamma 2a$  ; gris =  $\gamma 1$  ; orange =  $\gamma 3$ .



**Figure 59.  $B_{MAX}$  des différents « groupes » d'anticorps.** Les anticorps sont rassemblés par  $B_{MAX}$  similaires. On peut distinguer trois groupes :  $B_{MAX}$  faibles, moyens et forts. Les groupes sont délimités par les segments pointillés qui indiquent en même temps les valeurs moyennes des  $B_{MAX}$  : 329, 633 et 1006 pour les différents groupes.

L'hétérogénéité des récepteurs au sein d'une même lignée cellulaire existe aussi probablement entre les deux lignées CHO et HEK ETBR, ce qui pourrait expliquer les différences d'affinité observées entre les deux lignées cellulaires, pour les anticorps ETBR 44, 45 et 49. On peut également imaginer que les différences de  $B_{MAX}$  soient dues à la fixation de plusieurs anticorps sur un même récepteur. Si on groupe les anticorps par valeur de  $B_{MAX}$ , on peut distinguer trois ensembles : les  $B_{MAX}$  faibles, moyens ou forts ; les groupes « faibles » et « forts » présentant des  $B_{MAX}$  grossièrement 2 fois inférieurs ou supérieurs à ceux du groupe « moyens » (Figure 59). Cette observation pourrait indiquer plusieurs sites de fixation pour

certaines anticorps et la présence de trois zones épitopiques majeures dans la population des 24 anticorps.

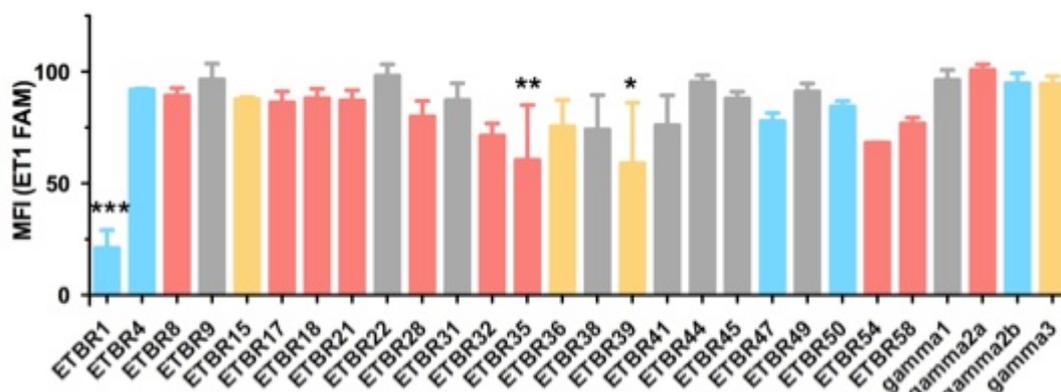
Enfin, les anticorps ont également été testés sur des cellules surexprimant le récepteur ETA (qui possède 63 % de similarité en acides aminés avec ETBR) pour mettre en évidence de possibles réactions croisées avec ce second sous-type de récepteur des endothélines. Dans l'ensemble, les anticorps sont sélectifs du sous-type ETB avec des  $K_D$  au moins supérieurs de deux logs à ceux mesurés sur les CHO ETAR (tableau 9). Seuls, les anticorps ETBR 21 et 28 semblent se fixer significativement sur les récepteurs ETA.

Pour résumer, la très grande majorité des anticorps produits ciblent spécifiquement ETBR et lient le récepteur avec une forte affinité, une condition indispensable permettant d'envisager une possible utilisation en thérapie.

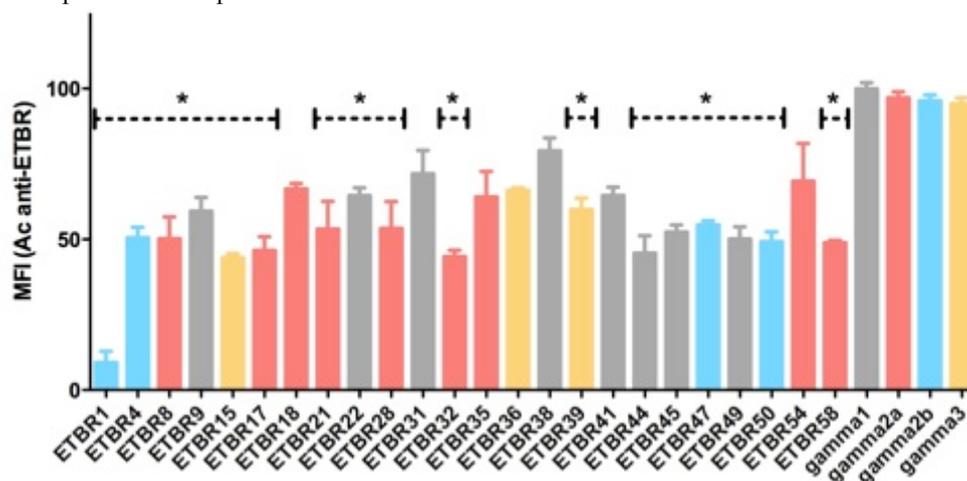
### *3.7. Certains anticorps entrent en compétition avec l'ET-1*

Même dépourvus d'activité pharmacologique, les anticorps produits pourraient être des agents thérapeutiques ou diagnostique efficaces via le recrutement du système immunitaire ou le couplage à des composés chimiques. Cependant, l'obtention d'anticorps capables d'inhiber la liaison des endothélines sur le récepteur ETB serait particulièrement intéressante, au vu de l'impact des voies de signalisation associées à ce récepteur dans le développement tumoral [589]. Par conséquent, nous avons évalué la capacité des différents anticorps à entrer en compétition avec l'ET-1 pour la fixation sur le récepteur ETB. Pour ce faire, des cellules CHO ETBR ont été exposées simultanément à 100 nM d'anticorps et 10 nM d'ET-1 FAM. Le marquage consécutif à la fixation de l'ET-1 fluorescente a ensuite été mesuré par cytométrie en flux. Comme on peut l'observer sur la figure 60, dans les conditions expérimentales testées, la majorité des anticorps est incapable d'inhiber significativement la liaison de l'ET-1 FAM. Les seuls anticorps inhibant significativement la liaison de l'ET-1 FAM sont les anticorps ETBR 1, 35 et 39, avec une inhibition forte, d'environ 75 %, pour ETBR1 (le rendomab-B1, voir partie 3.2). L'inhibition observée pour les anticorps ETBR 35 et 39 est significative mais relativement faible (entre 20 et 40%). L'expérience inverse, à savoir l'inhibition de la liaison des anticorps par l'ET-1, a également été réalisée (figure 61). On observe que la fixation de la grande majorité des anticorps est affectée négativement par la présence d'ET-1 : la baisse du marquage est comprise entre 25 et 50% sauf pour le rendomab-B1 (ETBR1) dont la fixation est inhibée d'environ 90% (voir partie 3.2).

Ces résultats démontrent que les anticorps nouvellement obtenus se comportent globalement de la même façon concernant la compétition avec l'ET-1, à savoir une inhibition de la liaison de l'ET-1 plutôt faible. Seul le rendomab-B1 se démarque significativement des autres et semble présenter des caractéristiques inhibitrices intéressantes. La forte inhibition obtenue dans les deux expériences avec le rendomab-B1 indique un épitope vraiment particulier par rapport aux autres anticorps, probablement en association étroite (directe ou indirecte) avec le site de liaison de l'ET-1. Les autres anticorps restent néanmoins intéressants car leur fixation non ou peu exclusive avec l'ET-1 n'est pas incompatible avec la présence d'activités pharmacologiques et leur utilisation potentielle en thérapie (activité agoniste pro-apoptotique, internalisation du récepteur, couplage des anticorps avec des toxines ou radionucléides). Ces anticorps pourraient également être utilisés pour des études plus fondamentales de co-cristallisation récepteur-ligand-anticorps [590].



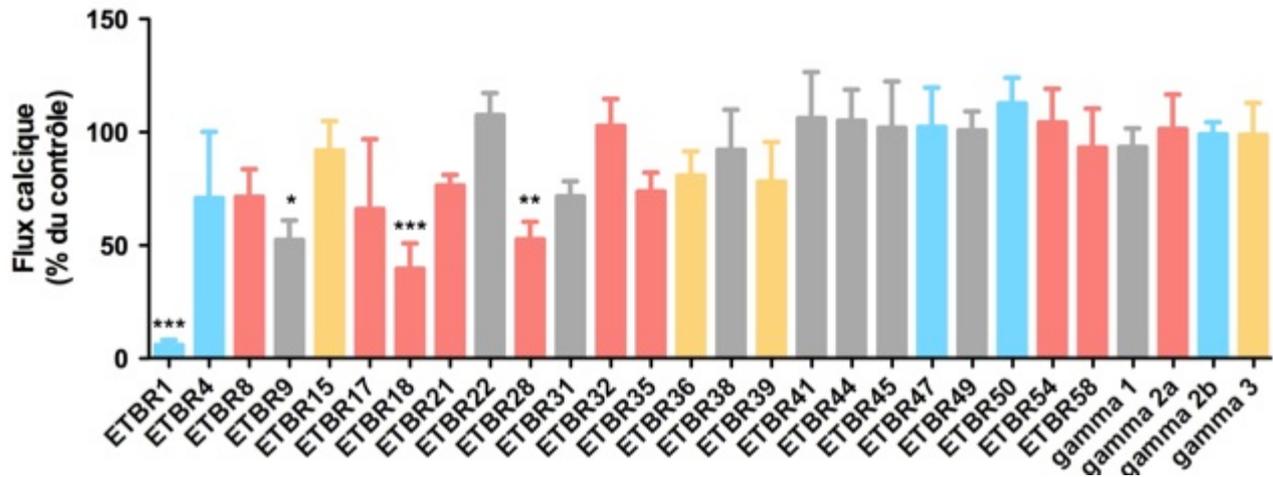
**Figure 60. Compétition de la liaison de l'ET-1 FAM avec les anticorps anti-ETBR.** Les cellules CHO ETBR ont été incubées pendant 24 h avec 10 nM d'ET-1 FAM et 100 nM des différents anticorps. Le marquage dû à l'ET-1 FAM est révélé par cytométrie en flux. \*, \*\*, \*\*\* :  $p < 0,05$  ;  $0,01$  ;  $0,001$  en comparaison avec l'anticorps témoin de même isotype (ANOVA puis test de Tukey). Les barres d'erreurs représentent la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes.



**Figure 61. Compétition de la liaison des anticorps anti-ETBR avec l'ET-1.** Les cellules CHO ETBR ont été incubées pendant 24 h avec 100 nM d'ET-1 et 100 nM des différents anticorps. Le marquage dû aux anticorps est révélé par cytométrie en flux. \* :  $p < 0,05$  au moins, en comparaison avec l'anticorps témoin de même isotype (ANOVA puis test de Tukey). Les barres d'erreurs représentent la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes.

### *3.8. Certains anticorps sont capables de bloquer la voie de signalisation calcique déclenchée par l'interaction ET-1/ETBR*

Le blocage des voies de signalisation déclenchées par l'interaction ET-1/ETBR représente une stratégie prometteuse pour enrayer le développement de certains cancers [452, 535, 559, 591]. En dépit des faibles capacités inhibitrices des anticorps nouvellement produits vis à vis de la fixation de l'ET-1 sur le récepteur ETB (voir figure 60), une activité antagoniste indirecte, consécutive à l'internalisation des récepteurs ETB présents à la membrane, est toujours envisageable. Ainsi, les anticorps ont été testés pour leur capacité à bloquer le flux calcique intracellulaire dû à la fixation de l'ET-1 sur le récepteur ETB. Bien entendu, avant de réaliser les expériences d'inhibition, les anticorps ont été évalués pour leur éventuelle activité agoniste ; aucun anticorps n'a déclenché le relargage de calcium intracellulaire. Les conditions expérimentales mises en oeuvre dans le test d'inhibition sont compatibles avec l'internalisation du récepteur (incubation à 37°C), ce qui permet donc d'observer des inhibitions indirectes causées par une diminution du nombre de récepteurs ETB à la surface cellulaire. Comme on peut l'observer sur la figure 62, 4 anticorps (dont le rendomab-B1, voir partie 3.2) diminuent significativement le flux calcique déclenché par l'ET-1. Une inhibition proche de 100% est obtenue pour le rendomab-B1, en accord avec les résultats précédemment décrits, et également en accord avec les expériences de compétition. Concernant les 3 autres anticorps, ETBR 9, 18 et 28, rien ne présageait de leur activité, au vu de leur incapacité à inhiber la liaison de l'ET-1 sur le récepteur ETB (voir figure 60). L'activité pharmacologique de ces trois anticorps est donc probablement due à leur capacité à induire l'internalisation du récepteur ETB, désensibilisant ainsi les cellules à une stimulation par l'ET-1. On notera que l'inhibition de la liaison de l'ET-1 par les deux anticorps ETBR 35 et 39 (voir Figure 60), ne se confirme pas dans ces expériences pharmacologiques puisqu' aucune baisse significative du flux calcique n'est détectée avec ces deux anticorps. Ce résultat contradictoire résulte sans doute des conditions expérimentales très différentes entre les tests de liaison et les tests pharmacologiques.



**Figure 62. Inhibition du flux calcique intracellulaire déclenché par l'ET-1.** Les cellules CHO ETBR sont incubées pendant 2 h avec 200 nM de chacun de anticorps anti-ETBR avant d'être stimulées par 2 nM d'ET-1. La condition témoin correspond aux cellules incubées en présence de tampon. \*, \*\*, \*\*\* :  $p < 0,05$  ;  $0,01$  ;  $0,001$  en comparaison avec l'anticorps témoin de même isotype (ANOVA puis test de Tukey). Les barres d'erreurs représentent la moyenne  $\pm$  SD de quatre expériences indépendantes.

### 3.9. Perspectives

Les anticorps anti-ETBR nouvellement produits restent encore à caractériser. Grâce aux données déjà obtenues, certains anticorps comme ETBR 9, 18 et 28 seront soumis à des tests plus précis afin de mieux évaluer leur potentiel pharmacologique: détermination de l'IC50 dans les expériences de flux calcique, microscopie confocale pour étudier leur capacité d'internalisation. Tous les anticorps seront également couplés à un marqueur fluorescent et ensuite associés deux à deux (un anticorps marqué versus un anticorps non marqué) dans des expériences de cytométrie en flux afin de déterminer des classes d'anticorps en fonction des épitopes reconnus sur le récepteur ETB. Les épitopes des différents anticorps pourront également être précisés par la technique Pepscan (comme cela a été réalisé pour le rendomab-B1 – voir partie 3.2) et/ou l'élaboration de récepteurs ETB chimères (i.e. en remplaçant une à une les boucles extracellulaires par celles d'un RCPG non pertinent) [325, 331].

Ces anticorps seront ensuite testés sur différentes lignées cellulaires exprimant un récepteur ETB non recombinant : cellules HUVEC, lignées tumorales de mélanomes et de glioblastomes. Concernant ce dernier point, des expériences préliminaires suggèrent déjà que, comme le rendomab-B1, la majorité des anticorps nouvellement produits se lient avec une mauvaise affinité sur les lignées cellulaires de mélanomes. Néanmoins, parmi les 23 nouveaux anticorps, certains semblent se fixer plus fortement que le rendomab-B1, toutefois avec des affinités au moins 10 fois inférieures à celle obtenue sur les cellules CHO et HEK ETBR. Ces résultats nécessitent d'être confirmés sur un panel de lignées de mélanome.

D'ores et déjà, ces données préliminaires semblent confirmer la présence à la surface des mélanomes, de récepteurs ETB « tumoraux » structurellement différents des récepteurs sauvages, comme cela a été fortement suggéré grâce au rendomab-B1.

De toute évidence, l'ensemble des anticorps monoclonaux produits au cours de cette étude, constituent des outils particulièrement intéressants pour l'étude structurale et fonctionnelle du récepteur ETB, et représentent une source potentielle de molécules thérapeutiques pour des pathologies impliquant le récepteur ETB comme le cancer ou certaines maladies cardiovasculaires.

## IV. DISCUSSION GENERALE - CONCLUSION

Les RCPGs représentent des cibles pharmacologiques particulièrement attractives pour développer des traitements contre de nombreuses pathologies [592]. Dès l'origine, les industries pharmaceutiques ont porté un grand intérêt aux RCPGs qui représentent un immense réservoir de cibles thérapeutiques et dont la fonction est modulée par plus de 30 % des médicaments actuellement sur le marché [314]. Néanmoins, depuis une dizaine d'années, le ciblage pharmacologique de nouveaux RCPGs (ou le développement de nouveaux agents originaux contre des RCPGs déjà ciblés) est en diminution et l'on compte à ce jour moins d'une dizaine de nouveaux récepteurs ciblés par des composés ayant atteint la commercialisation [317, 318]. De plus, de manière contradictoire, cette baisse intervient alors que la recherche sur les RCPGs est en plein essor, démontrant ou validant leur implication dans des pathologies comme le cancer [327]. En réalité, ce ralentissement provient du fait que les techniques classiquement employées pour découvrir de nouveaux médicaments sont inappropriées pour de nombreux RCPGs d'intérêt thérapeutique. Certains RCPGs, dont les ligands sont des petits peptides, constituent des cibles adaptées aux méthodes de criblages à haut débit *in silico* ou par chimie combinatoire. C'est le cas de nombreux RCPGs de la famille A, comme les récepteurs de l'adrénaline, des opioïdes, de certains neurotransmetteurs (sérotonine, acétylcholine) et des endothélines, pour lesquels des agents chimiques pharmacologiquement actifs ont pu être produits (souvent en se basant sur la structure moléculaire des ligands naturels). Par contre, pour d'autres RCPGs, dont certains émergent aujourd'hui comme des cibles thérapeutiques intéressantes, les méthodes de criblage de composés chimiques ne sont pas adaptées. Ceci est principalement dû au fait que ces récepteurs sont orphelins ou qu'ils possèdent des ligands protéiques de grande taille (e.g. des chimiokines, les protéines Wnt), difficiles à modéliser *in silico* (de plus, les pharmacophores ne sont pas connus) et à utiliser dans des approches de chimie combinatoire [318]. Ainsi, pour des RCPGs de la famille B ou de la famille « frizzled » par exemple, le taux de succès de ces stratégies est quasiment nul, alors qu'il peut atteindre 50% pour certains membres de la famille A [317].

Dans ce contexte, la production d'anticorps anti-RCPGs représente une alternative intéressante par rapport au développement de petites molécules chimiques [318]. En effet, elle permettrait d'une part, de cibler de nouveaux RCPGs réfractaires aux méthodes classiques de criblage à haut débit, et d'autre part, d'obtenir de nouveaux agents moléculaires, plus spécifiques, plus modulables et potentiellement dotés de propriétés pharmacologiques

originales indépendantes du site orthostérique du récepteur (e.g. fonctionnement allostérique, activation de nouvelles réponses biologiques). Cependant, la production d'anticorps thérapeutiques contre les RCPGs n'est pas dénuée de problèmes. En effet, les RCPGs, qui sont normalement insérés dans la membrane plasmique, sont des protéines très difficiles à manipuler *in vitro*, généralement instables et majoritairement non fonctionnelles [321, 562]. L'obstacle principal au développement d'anticorps contre ces récepteurs réside donc dans l'obtention d'une quantité suffisante d'antigènes pour réaliser les immunisations et, qui plus est, d'antigène correctement structuré afin de favoriser la production d'anticorps capables de reconnaître la conformation native des RCPGs (ce dernier point est véritablement crucial pour avoir une chance de sélectionner des anticorps compatibles avec une utilisation thérapeutique). A l'heure actuelle, plusieurs méthodologies impliquant différents formats d'immunogènes ont permis de générer des anticorps interagissant avec des RCPGs dans leur contexte physiologique (figure 63) [318]. La technique la plus simple mais la moins susceptible de fonctionner consiste à utiliser des fragments peptidiques de récepteur (e.g. des fragments de la partie N-terminale ou des boucles extracellulaires). Cette méthode permet de disposer de fortes quantités d'immunogènes pour les étapes d'immunisation, mais les anticorps produits ne reconnaissent que rarement le RCPG entier, exprimé à la surface cellulaire [322]. L'utilisation de fragments peptidiques plus longs, cycliques ou maintenus dans une conformation donnée peut permettre de reproduire (au moins en partie) la structure tridimensionnelle retrouvée dans le récepteur complet, et ainsi favoriser la production d'anticorps se fixant au récepteur natif [593]. Malgré son faible taux de réussite, l'immunisation à l'aide de fragments polypeptidiques a été à l'origine, entre autres, de la production d'anticorps monoclonaux fonctionnels anti-CCR5 et anti-CXCR7 [594]. Par ailleurs, certains groupes de recherche se sont axés sur l'utilisation de RCPGs entiers et purifiés comme immunogènes. Cette approche est complexe et nécessite la mise au point de conditions expérimentales spécifiques à chaque RCPG étudié pour les étapes de production, de purification et de renaturation. De plus, malgré les progrès réalisés dans les procédés de renaturation, notamment avec l'utilisation de nouveaux agents stabilisateurs (e.g. les amphipols), la fraction de récepteur correctement renaturée reste généralement faible [321]. Néanmoins, une nouvelle méthode de production et de thermostabilisation des RCPGs, nommée StaR<sup>TM</sup>, et développée par la société Heptares Therapeutics, donne des résultats prometteurs [595]. Cette technologie consiste à introduire quelques mutations ponctuelles

Antigen format	Company/Organisation	Purity	Utility	Advantages	Disadvantages
DNA	Kyowa Hakko Kirin, Genovac, University of Maastricht	Native expression in cell membrane	In vivo only	Simple method with no requirement for protein	Increased efficiency often required May be limited by expression level
Cell and cell membrane proteins	Many, e.g., Multispan, Dyax, Abbott, Amgen, Progenics, Millenium	Multiple antigens	Phage screening In vivo		Often low level of expression Poorly immunogenic High non-specific background
Liposomes and magnetic nanoparticles	MSM Protein Technologies/Cambridge Antibody Technology, Dr. Wayne Marasco (Harvard Medical School)	Mixture of folded and unfolded protein	Phage screening In vivo	High levels of receptor compared to cells Low background	Difficult to formulate May result in unfolded protein Internal epitopes will be exposed as mixture of orientations in vesicles
Constrained peptides	Pepscan, National Institutes of Health (NIH)	100% purity	Phage screening In vivo	Can mimic conformation specific domains	Conformation may not replicate loop in complete structure
Synthetic peptides	Many, e.g., Dyax, Amgen, Abbott, Rockefeller, NIH, Pfizer	100% purity	Phage screening In vivo	Targets specific epitopes	Linear epitope will not replicate loop in complete structure
StaR	Heptares Therapeutics	>95% purity Simple detergents High expression	Phage screening In vivo	Correctly folded, stable reagent Conformationally biased Good stability	Antibodies obtained to intracellular epitopes not suitable for therapeutics
Purified receptor	VIB/Thrombogenics	Mixture of folded/ unfolded	Phage screening In vivo		Difficult to purify reliably in sufficient quantity Short lifetime in folded form

**Figure 63.** Différents formats d'immunogènes utilisés pour produire des anticorps anti-RCPGs. Les avantages et les inconvénients de chacun des formats sont présentés. D'après [318].

dans la séquence des RCPGs afin d'en faciliter la production et la stabilisation dans une conformation tridimensionnelle donnée. Cette technique a été appliquée à plusieurs RCPGs différents et a permis de collecter plusieurs milligrammes de récepteurs fonctionnels. Le seul défaut de cette approche provient du fait que des anticorps contre des épitopes de la portion intracellulaire des récepteurs peuvent être obtenus, ce qui n'a généralement pas d'intérêt pour le développement d'anticorps thérapeutiques. Enfin, d'autres méthodes d'immunisation utilisant des cellules entières surexprimant des RCPGs ou des préparations membranaires issues de ces dernières ont également été testées. Ces stratégies présentent l'avantage de fournir un immunogène d'intérêt majoritairement natif, mais qui est malheureusement entouré par de multiples autres antigènes qui vont induire la production d'anticorps non spécifiques lors des immunisations. En dépit de cette importante limitation, des anticorps monoclonaux pharmacologiquement actifs ciblant CXCR4 ou le récepteur du glucagon GCGR ont été obtenus par le biais de ces méthodes d'immunisation [596, 597].

Dans notre cas, pour l'étude réalisée dans cette thèse concernant le récepteur ETB, une approche par immunisation génique a été préférée aux méthodes décrites ci-dessus. L'immunisation génique est une technique qui se base sur la biosynthèse *in vivo* de l'immunogène, ce qui, dans le cas des RCPGs, permet une expression de ces récepteurs dans leur contexte physiologique, à savoir à la membrane plasmique des cellules. D'un point de vue pratique, les animaux sont donc immunisés avec un plasmide codant l'immunogène (dans

notre cas ETBR) qui est capté puis exprimé par divers types cellulaires de l'hôte [323]. Par rapport aux autres méthodologies présentées dans la figure 63, l'immunisation génique a l'unique avantage de ne nécessiter à aucun moment la production protéique *in vitro* de l'immunogène, une production particulièrement difficile voire incertaine lorsque l'antigène est un RCPG (voir plus haut). De plus, l'immunisation génique assure également une biosynthèse et une renaturation optimale de l'immunogène puisque son expression est réalisée directement *in vivo*, ce qui permet par ailleurs de stimuler le système immunitaire de l'hôte contre la conformation native de l'antigène. Cependant, il existe tout de même des limites à cette stratégie. En effet, l'injection seule d'ADN n'est parfois pas suffisante pour induire une réponse immunitaire compatible avec la production d'anticorps monoclonaux. De plus, en fonction du RCPG étudié, les niveaux d'expression *in vivo* après l'immunisation peuvent parfois être faibles, ce qui ne favorise pas non plus le déclenchement d'une réponse immune humorale. Pour pallier ces problèmes, de multiples optimisations du protocole d'immunisation génique sont possibles [323]. Par exemple, pour favoriser l'expression, le plasmide contenant l'ADNc de l'immunogène peut être modifié (e.g. promoteurs fort, tissu spécifique, séquence Kozak, optimisation des codons) afin d'améliorer la transcription et la traduction. De même, différents modes et/ou sites d'administration peuvent être envisagés afin d'augmenter l'expression mais aussi l'immunogénicité dans le cas d'antigènes très conservés à travers les espèces. Grâce à cette multiplicité de protocoles, l'immunisation génique apparaît donc comme une approche idéale pour produire des anticorps monoclonaux à potentiel thérapeutique contre des immunogènes « problématiques » comme les RCPGs.

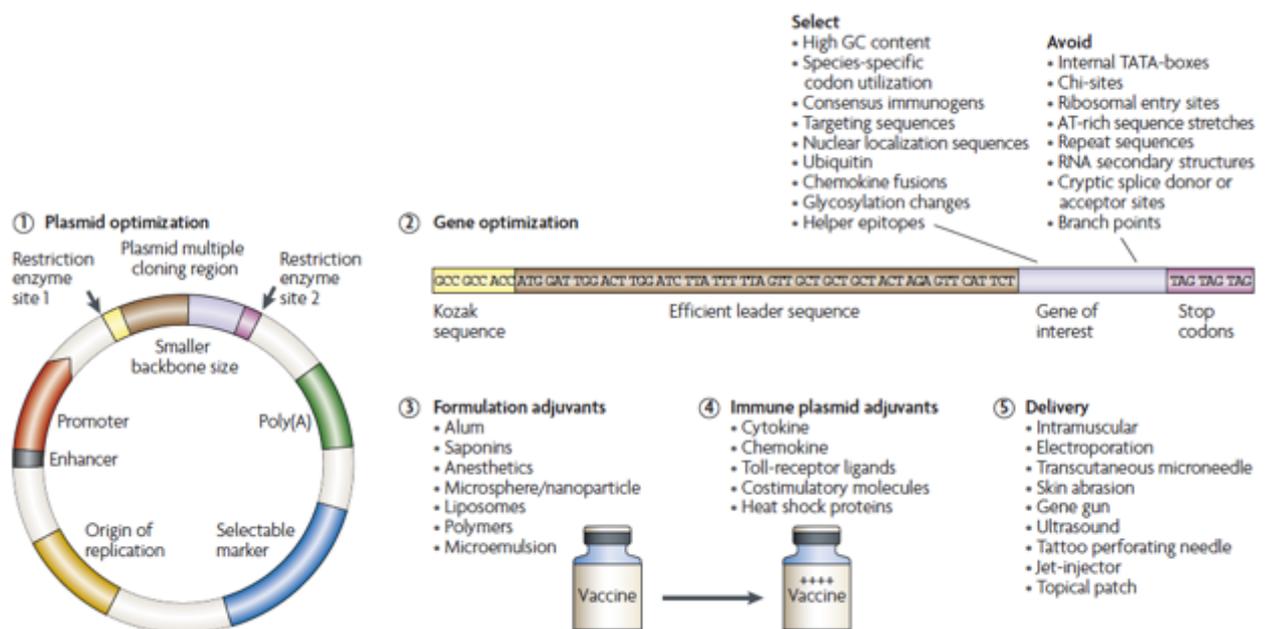


Figure 64. Stratégies envisageables pour optimiser l'efficacité de l'immunisation génique. D'après [323].

Appliquée au récepteur ETB, l'immunisation génique, couplée à l'électroporation et à des rappels cellulaires, nous a permis de produire rapidement et relativement simplement de forts taux d'anticorps polyclonaux anti-ETBR chez les souris immunisées [326]. De plus, des expériences de caractérisation préliminaires de ces anticorps polyclonaux ont montré que ces derniers sont spécifiques d'ETBR et capables de se lier au récepteur à la surface de diverses lignées cellulaires, confirmant ainsi l'intérêt de la méthode d'immunisation génique pour générer des anticorps spécifiques de la forme native de récepteurs membranaires. Fort de ces résultats, deux campagnes de production d'anticorps monoclonaux ont été entreprises et se sont soldées par l'obtention d'un ensemble de 27 anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement ETBR. Parmi ces anticorps (dont la majorité est encore en cours de caractérisation), le rendomab-B1 a fait l'objet d'une étude détaillée qui a permis de mettre en évidence ses propriétés antagonistes allostériques vis à vis d'ETBR, se traduisant in vitro par une baisse de la viabilité de cellules endothéliales vasculaires. Ces résultats permettent d'envisager une utilisation thérapeutique du rendomab-B1, notamment dans des cas de cancers qui détournent l'axe ET-1/ETBR pour favoriser l'angiogenèse et l'échappement des tumeurs au système immunitaire [452, 454, 477].

Par ailleurs, l'étude du rendomab-B1 a révélé un autre point important concernant la sélection des anticorps monoclonaux qui est effectuée lors du criblage des surnageants des hybridomes issues de la fusion. En effet, le fait que le rendomab-B1 est incapable de reconnaître efficacement ETBR exprimé à la surface de lignées de mélanomes, alors que les sera polyclonaux, à partir desquels le rendomab a été isolé, le reconnaissent très bien, démontre que l'étape de criblage est déterminante pour orienter la sélection des anticorps monoclonaux. En particulier, l'état conformationnel de l'antigène au cours de cette étape et son adéquation avec la structure moléculaire retrouvée dans la pathologie, est un facteur crucial pour sélectionner des anticorps utilisables en thérapie. Dans notre cas, un criblage avec des cellules tumorales de mélanome exprimant ETBR (plutôt qu'avec des cellules transfectées surexprimant ETBR) aurait peut-être permis de sélectionner d'autres anticorps, se liant efficacement aux récepteurs ETB présents à la surface des tumeurs. Néanmoins, le criblage sur cellules tumorales n'est pas une chose facile à mettre en place. D'une part, les cellules tumorales expriment des taux de récepteurs relativement faibles comparés à ceux retrouvés dans les cellules transfectées, ce qui peut poser des problèmes de sensibilité du test de criblage. D'autre part, se pose la question du choix de la lignée tumorale à utiliser pour l'étape de criblage. Cette considération est d'autant plus importante que chaque type de tumeur possède de multiples sous-types dont les caractéristiques moléculaires (susceptibles

d'influencer la structure de l'immunogène) sont différentes et variables en fonction du stade d'avancement de la maladie. Une solution possible, mais techniquement difficile, serait de cribler les surnageants d'hybridomes avec un cocktail de cellules tumorales afin de sélectionner précocement des anticorps interagissant avec plusieurs lignées différentes et donc susceptibles d'être utilisables pour un grand nombre de patients.

Quoiqu'il en soit, nos résultats illustrent la difficulté de sélectionner des anticorps contre des antigènes tumoraux et soulignent le rôle crucial de l'étape de criblage qui doit inclure précocement des formes moléculaires de l'antigène représentatives de la réalité pathologique. Ce dernier point est particulièrement important lorsque la méthode d'immunisation, comme l'immunisation génique, favorise la production d'anticorps reconnaissant des épitopes conformationnels et quand la structure tridimensionnelle de l'immunogène est fortement sensible à son environnement (ce qui est le cas pour les RCPGs). Enfin, nos résultats indiquent également que l'immunisation génique, appliquée aux RCPGs intervenant dans le développement tumoral, pourrait probablement permettre de produire des anticorps capables de cibler des formes moléculaires de ces récepteurs exclusivement retrouvées dans les tumeurs. Mon travail de thèse a donc ouvert des perspectives tout à fait intéressantes pour le développement de nouveaux anticorps potentiellement thérapeutiques, exerçant leur action non seulement par une action directe sur des cellules tumorales surexprimant éventuellement une forme particulière du récepteur ETB, mais également de façon plus indirecte en agissant sur le microenvironnement vasculaire d'un grand nombre de tumeurs.

# VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## INTRODUCTION GENERALE

1. Williams AF & Barclay AN (1988) The Immunoglobulin Superfamily—Domains for Cell Surface Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **6**: 381-405
2. Schroeder Jr. HW & Cavacini L (2010) Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**: S41-S52
3. Novotný J, Bruccoleri R, Newell J, Murphy D, Haber E & Karplus M (1983) Molecular anatomy of the antibody binding site. *Journal of Biological Chemistry* **258**: 14433 -14437
4. Rousseaux J, Rousseaux-Prévost R & Bazin H (1983) Optimal conditions for the preparation of Fab and F(ab')<sub>2</sub> fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses. *Journal of Immunological Methods* **64**: 141-146
5. Lachmann P (1971) The purification of specific antibody as F(ab')<sub>2</sub> by the pepsin digestion of antigen-antibody precipitates, and its application to immunoglobulin and complement antigens. *Immunochemistry* **8**: 81-84, IN17-IN20, 85-88
6. Yguerabide J, Epstein HF & Stryer L (1970) Segmental flexibility in an antibody molecule. *Journal of Molecular Biology* **51**: 573-590
7. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, Rademacher TW, Mizuochi T, Taniguchi T, Matsuta K, Takeuchi F, Nagano Y, Miyamoto T & Kobata A (1985) Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* **316**: 452-457
8. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM & Dwek RA (2007) The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* **25**: 21-50
9. Tao M & Morrison S (1989) Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region. *The Journal of Immunology* **143**: 2595 -2601
10. Casburn-Budd R, Youinou P, Hager H, Elkington D, Baxter I, Berthelot JM, Le Goff P & Isenberg DA (1992) Asialylated IgG in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol* **19**: 1070-1074
11. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SHA & Presta LG (2002) Lack of Fucose on Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding to Human FcγRIII and Antibody-dependent Cellular Toxicity. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 26733 -26740
12. Frigeri LG, Zuberi RI & Liu FT (1993) Epsilon BP, a beta-galactosidase-binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc epsilon RI) and activates mast cells. *Biochemistry* **32**: 7644-7649
13. Stockert RJ (1995) The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression. *Physiological Reviews* **75**: 591 -609
14. Royle L, Roos A, Harvey DJ, Wormald MR, Van Gijlswijk-Janssen D, Redwan EM, Wilson IA, Daha MR, Dwek RA & Rudd PM (2003) Secretory IgA N- and O-Glycans Provide a Link between the Innate and Adaptive Immune Systems. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 20140 -20153
15. Van Loghem E & Litwin SD (1972) Antigenic determinants on immunoglobulins of nonhuman primates. *Transplant. Proc* **4**: 129-135
16. Bengtén E, Wilson M, Miller N, Clem LW, Pilström L & Warr GW (2000) Immunoglobulin isotypes: structure, function, and genetics. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* **248**: 189-219
17. Zelaschi D, Newby C, Parsons M, van West B, Cavalli-Sforza LL, Herzenberg LA & Herzenberg LA (1983) Human immunoglobulin allotypes: previously unrecognized determinants and alleles defined with monoclonal antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **80**: 3762 -3766
18. Geha RS (1981) Regulation of the immune response by idiotypic-antiidiotypic interactions. *N. Engl. J. Med* **305**: 25-28
19. Leach J, Sedmak D, Osborne J, Rahill B, Lairmore M & Anderson C (1996) Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal- fetal antibody transport. *The Journal of Immunology* **157**: 3317 -3322
20. Woolf JM & Kerr MA (2006) The function of immunoglobulin A in immunity. *J. Pathol* **208**: 270-282
21. Ehrenstein MR & Notley CA (2010) The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat. Rev. Immunol* **10**: 778-786

22. Chen K & Cerutti A (2011) The function and regulation of immunoglobulin D. *Curr. Opin. Immunol* **23**: 345-352
23. Duty JA, Szodoray P, Zheng N, Koelsch KA, Zhang Q, Swiatkowski M, Mathias M, Garman L, Helms C, Nakken B, Smith K, Farris AD & Wilson PC (2009) Functional anergy in a subpopulation of naive B cells from healthy humans that express autoreactive immunoglobulin receptors. *J. Exp. Med* **206**: 139-151
24. Chen K, Xu W, Wilson M, He B, Miller NW, Bengtén E, Edholm E, Santini PA, Rath P, Chiu A, Cattalini M, Litzman J, Bussell J, Huang B, Meini A, Riesbeck K, Cunningham-Rundles C, Plebani A & Cerutti A (2009) Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat. Immunol* **10**: 889-898
25. Stone KD, Prussin C & Metcalfe DD (2010) IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol* **125**: S73-80
26. Tonegawa S (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**: 575-581
27. Dudley DD, Chaudhuri J, Bassing CH & Alt FW (2005) Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv. Immunol* **86**: 43-112
28. Meek K (1990) Analysis of junctional diversity during B lymphocyte development. *Science* **250**: 820 - 823
29. Zemlin M, Klinger M, Link J, Zemlin C, Bauer K, Engler JA, Schroeder Jr HW & Kirkham PM (2003) Expressed Murine and Human CDR-H3 Intervals of Equal Length Exhibit Distinct Repertoires that Differ in their Amino Acid Composition and Predicted Range of Structures. *Journal of Molecular Biology* **334**: 733-749
30. Ehlich A, Schaal S, Gu H, Kitamura D, Müller W & Rajewsky K (1993) Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at early stages of B cell development. *Cell* **72**: 695-704
31. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F & Stall AM (1992) RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**: 855-867
32. Benedict CL, Gilfillan S, Thai TH & Kearney JF (2000) Terminal deoxynucleotidyl transferase and repertoire development. *Immunol. Rev* **175**: 150-157
33. Löffert D, Ehlich A, Müller W & Rajewsky K (1996) Surrogate Light Chain Expression Is Required to Establish Immunoglobulin Heavy Chain Allelic Exclusion during Early B Cell Development. *Immunity* **4**: 133-144
34. Melchers F, ten Boekel E, Seidl T, Kong XC, Yamagami T, Onishi K, Shimizu T, Rolink AG & Andersson J (2000) Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. *Immunol. Rev* **175**: 33-46
35. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y & Honjo T (2000) Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme. *Cell* **102**: 553-563
36. Long EO (1999) Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu. Rev. Immunol* **17**: 875-904
37. Vély F & Vivier E (1997) Conservation of structural features reveals the existence of a large family of inhibitory cell surface receptors and noninhibitory/activatory counterparts. *J. Immunol* **159**: 2075-2077
38. Baerenwaldt A & Nimmerjahn F (2008) Immune regulation: FcγRIIB--regulating the balance between protective and autoreactive immune responses. *Immunol. Cell Biol* **86**: 482-484
39. Mariuzza RA, Phillips SE & Poljak RJ (1987) The structural basis of antigen-antibody recognition. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **16**: 139-159
40. Mian IS, Bradwell AR & Olson AJ (1991) Structure, function and properties of antibody binding sites. *Journal of Molecular Biology* **217**: 133-151
41. Ward ES & Ghetie V (1995) The effector functions of immunoglobulins: implications for therapy. *Ther Immunol* **2**: 77-94
42. Gelderman KA, Tomlinson S, Ross GD & Gorter A (2004) Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends in Immunology* **25**: 158-164
43. Vetvicka V, Thornton BP & Ross GD (1996) Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *J Clin Invest* **98**: 50-61

44. Nimmerjahn F & Ravetch JV (2011) Fc $\gamma$ R<sub>s</sub> in health and disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* **350**: 105-125
45. Nimmerjahn F & Ravetch JV (2006) Fc $\gamma$  receptors: old friends and new family members. *Immunity* **24**: 19-28
46. Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S & Daëron M (2009) Specificity and affinity of human Fc $\gamma$  receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* **113**: 3716-3725
47. Nimmerjahn F & Ravetch JV (2008) Fc $\gamma$  receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol* **8**: 34-47
48. Nimmerjahn F & Ravetch JV (2005) Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* **310**: 1510-1512
49. Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV (2005) Fc $\gamma$ RIV: A Novel FcR with Distinct IgG Subclass Specificity. *Immunity* **23**: 41-51
50. Stuart LM & Ezekowitz RAB (2005) Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* **22**: 539-550
51. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Théry C, Rescigno M, Saito T, Verbeek S, Bonnerot C, Ricciardi-Castagnoli P & Amigorena S (1999) Fc $\gamma$  Receptor-mediated Induction of Dendritic Cell Maturation and Major Histocompatibility Complex Class I-restricted Antigen Presentation after Immune Complex Internalization. *The Journal of Experimental Medicine* **189**: 371 -380
52. Heyman B (2000) Regulation of antibody responses via antibodies, complement, and Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol* **18**: 709-737
53. Amigorena S, Bonnerot C, Drake JR, Choquet D, Hunziker W, Guillet JG, Webster P, Sautes C, Mellman I & Fridman WH (1992) Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science* **256**: 1808-1812
54. Muta T, Kurosaki T, Misulovin Z, Sanchez M, Nussenzweig MC & Ravetch JV (1994) A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc $\gamma$  RIIb modulates B-cell receptor signalling. *Nature* **368**: 70-73
55. Pearse RN, Kawabe T, Bolland S, Guinamard R, Kurosaki T & Ravetch JV (1999) SHIP recruitment attenuates Fc $\gamma$  RIIb-induced B cell apoptosis. *Immunity* **10**: 753-760
56. Xiang Z, Cutler AJ, Brownlie RJ, Fairfax K, Lawlor KE, Severinson E, Walker EU, Manz RA, Tarlinton DM & Smith KGC (2007) Fc $\gamma$ RIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nat. Immunol* **8**: 419-429
57. Nimmerjahn F & Ravetch JV (2010) Antibody-mediated modulation of immune responses. *Immunol. Rev* **236**: 265-275
58. Takai T, Ono M, Hikida M, Ohmori H & Ravetch JV (1996) Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc $\gamma$  RII-deficient mice. *Nature* **379**: 346-349
59. Bolland S & Ravetch JV (2000) Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIb-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity* **13**: 277-285
60. Mackay M, Stanevsky A, Wang T, Aranow C, Li M, Koenig S, Ravetch JV & Diamond B (2006) Selective dysregulation of the Fc $\gamma$ RIIb receptor on memory B cells in SLE. *J Exp Med* **203**: 2157-2164
61. Tackenberg B, Jelčić I, Baerenwaldt A, Oertel WH, Sommer N, Nimmerjahn F & Lünemann JD (2009) Impaired inhibitory Fc $\gamma$  receptor IIB expression on B cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 4788-4792
62. Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KGC, Dörner T & Hiepe F (2006) Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat. Rev. Immunol* **6**: 741-750
63. Ravetch JV & Nussenzweig M (2007) Killing some to make way for others. *Nat. Immunol* **8**: 337-339
64. Boruchov AM, Heller G, Veri M, Bonvini E, Ravetch JV & Young JW (2005) Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J Clin Invest* **115**: 2914-2923
65. Clynes R, Maizes JS, Guinamard R, Ono M, Takai T & Ravetch JV (1999) Modulation of Immune Complex-induced Inflammation In Vivo by the Coordinate Expression of Activation and Inhibitory Fc Receptors. *J Exp Med* **189**: 179-186
66. Debré M, Bonnet MC, Fridman WH, Carosella E, Philippe N, Reinert P, Vilmer E, Kaplan C, Teillaud JL & Griscelli C (1993) Infusion of Fc $\gamma$  fragments for treatment of children with acute immune thrombocytopenic purpura. *Lancet* **342**: 945-949
67. Li N, Zhao M, Hilario-Vargas J, Prisanh P, Warren S, Diaz LA, Roopenian DC & Liu Z (2005) Complete FcRn dependence for intravenous Ig therapy in autoimmune skin blistering diseases. *J Clin Invest* **115**: 3440-3450

68. Siragam V, Crow AR, Brinc D, Song S, Freedman J & Lazarus AH (2006) Intravenous immunoglobulin ameliorates ITP via activating Fc gamma receptors on dendritic cells. *Nat. Med* **12**: 688-692
69. Kaneko Y, Nimmerjahn F & Ravetch JV (2006) Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* **313**: 670-673
70. Scallion BJ, Tam SH, McCarthy SG, Cai AN & Raju TS (2007) Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Mol. Immunol* **44**: 1524-1534
71. Anthony RM, Wermeling F, Karlsson MCI & Ravetch JV (2008) Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 19571-19578
72. Bruhns P, Samuelsson A, Pollard JW & Ravetch JV (2003) Colony-stimulating factor-1-dependent macrophages are responsible for IVIG protection in antibody-induced autoimmune disease. *Immunity* **18**: 573-581
73. Anthony RM, Kobayashi T, Wermeling F & Ravetch JV (2011) Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature* **475**: 110-113
74. Harlow E, Harlow E & Lane D (1988) Antibodies: a laboratory manual CSHL Press
75. Hornick CL & Karuch F (1972) Antibody affinity. 3. The role of multivalance. *Immunochemistry* **9**: 325-340
76. Ward ES, Zhou J, Ghetie V & Ober RJ (2003) Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. *Int. Immunol* **15**: 187-195
77. Martin WL, West AP, Gan L & Bjorkman PJ (2001) Crystal structure at 2.8 Å of an FcRn/heterodimeric Fc complex: mechanism of pH-dependent binding. *Mol. Cell* **7**: 867-877
78. Roopenian DC, Christianson GJ, Sproule TJ, Brown AC, Akilesh S, Jung N, Petkova S, Avanesian L, Choi EY, Shaffer DJ, Eden PA & Anderson CL (2003) The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs. *J. Immunol* **170**: 3528-3533
79. Yoshida M, Claypool SM, Wagner JS, Mizoguchi E, Mizoguchi A, Roopenian DC, Lencer WI & Blumberg RS (2004) Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity* **20**: 769-783
80. Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, LaRue B, Guo H, Wu Z, Holtzman DM & Zlokovic BV (2005) IgG-assisted age-dependent clearance of Alzheimer's amyloid beta peptide by the blood-brain barrier neonatal Fc receptor. *J. Neurosci* **25**: 11495-11503
81. Kobayashi N, Suzuki Y, Tsuge T, Okumura K, Ra C & Tomino Y (2002) FcRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol* **282**: F358-365
82. Roopenian DC & Akilesh S (2007) FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat. Rev. Immunol* **7**: 715-725

## LES ANTICORPS THERAPEUTIQUES

83. Von Behring E & Kitasko S (1890) Über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der tetanus-Immunität bei Thieren. *Dtsch Med Wochenschr* **49**: 1113-1145
84. Porter RR (1950a) A chemical study of rabbit antiovalbumin. *Biochem J* **46**: 473-478
85. Porter RR (1950b) The formation of a specific inhibitor by hydrolysis of rabbit antiovalbumin. *Biochem J* **46**: 479-484
86. Fagreaus A (1948) Antibody production in relation to the development of plasma cell. *Acta Med. Scandinav. Suppl.* **204**
87. Köhler G & Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497
88. Barski G, Sorieuil S & Cornefert F (1960) [Production of cells of a « hybrid » nature in cultures in vitro of 2 cellular strains in combination]. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci* **251**: 1825-1827
89. Potter M & Boyce CR (1962) Induction of Plasma-Cell Neoplasms in Strain BALB/c Mice with Mineral Oil and Mineral Oil Adjuvants. *Nature* **193**: 1086-1087
90. Okada Y (1962) Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascites tumor cells : I. Microscopic observation of giant polynuclear cell formation. *Experimental CellResearch* **26**: 98-107
91. Littlefield JW (1964) Selection of Hybrids from Matings of Fibroblasts in vitro and Their Presumed Recombinants. *Science* **145**: 709 -710

92. Cosimi AB, Burton RC, Colvin RB, Goldstein G, Delmonico FL, LaQuaglia MP, Tolkoff-Rubin N, Rubin RH, Herrin JT & Russell PS (1981) Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. *Transplantation* **32**: 535-539
93. Schroff RW, Foon KA, Beatty SM, Oldham RK & Morgan AC Jr (1985) Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res* **45**: 879-885
94. Carter PJ (2006) Potent antibody therapeutics by design. *Nat. Rev. Immunol* **6**: 343-357
95. Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E & Baty D (2009) Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol* **157**: 220-233
96. Hwang WYK & Foote J (2005) Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* **36**: 3-10
97. Orlandi R, Güssow DH, Jones PT & Winter G (1989) Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**: 3833 -3837
98. Boulianne C, Hozumi N & Shulman MJ (1984) Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* **312** : 643-646
99. Morisson SL, Johnson MJ, Herzenberg LA & Oi VT (1984) Chimeric human antibody molecules : mouse antigen-binding domains with human constant domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81** : 6851-6855.
100. Jone PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS & Winter G (1986) Replacing the complementary-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* **321** : 522-525
101. Wu H, Nie Y, Huse WD & Watkins JD (1999) Humanization of a murine monoclonal antibody by simultaneous optimization of framework and CDR residues. *Journal of Molecular Biology* **294**: 151-162
102. Roguska MA, Pedersen JT, Keddy CA, Henry AH, Searle SJ, Lambert JM, Goldmacher VS, Blättler WA, Rees AR & Guild BC (1994) Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 969 -973
103. Schwaber J & Cohen EP (1973) Human X Mouse Somatic Cell Hybrid Clone secreting Immunoglobulins of both Parental Types. *Nature* **244** : 444-447
104. Kozbor D, Dexter D & Roder JC (1983) A comparative analysis of the phenotypic characteristics of available fusion partners for the construction of human hybridomas. *Hybridoma* **2**: 7-16
105. Steinitz M & Klein E (1981) Human monoclonal antibodies produced by immortalization with Epstein-Barr virus. *Immunology Today* **2**: 38-39
106. Buchacher A, Predl R, Strutzenberger K, Steinfellner W, Trkola A, Purtscher M, Gruber G, Tauer C, Steindl F & Jungbauer A (1994) Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**: 359-369
107. Simmons CP, Bernasconi NL, Suguitan AL, Mills K, Ward JM, Chau NVV, Hien TT, Sallusto F, Ha DQ, Farrar J, de Jong MD, Lanzavecchia A & Subbarao K (2007) Prophylactic and Therapeutic Efficacy of Human Monoclonal Antibodies against H5N1 Influenza. *PLoS Med* **4**: e178
108. Marasco WA & Sui J (2007) The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nat. Biotechnol* **25**: 1421-1434
109. Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R & Lanzavecchia A (2004) An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat. Med* **10**: 871-875
110. Lanzavecchia A, Corti D & Sallusto F (2007) Human monoclonal antibodies by immortalization of memory B cells. *Current Opinion in Biotechnology* **18**: 523-528
111. Borrebaeck CA, Danielsson L & Möller SA (1988) Human monoclonal antibodies produced by primary in vitro immunization of peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 3995-3999
112. Hoogenboom HR (2005) Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol* **23** : 1105-1116
113. Lonberg N (2005) Human antibodies from transgenic animals. *Nat. Biotechnol* **23** : 1117-1125
114. Feldhaus MJ & Siegel RW (2004) Yeast display of antibody fragments: a discovery and characterization platform. *J. Immunol. Methods* **290**: 69-80
115. Beerli RR, Bauer M, Buser RB, Gwerder M, Muntwiler S, Maurer P, Saudan P & Bachmann MF (2008) Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 14336 -14341

116. Bowley DR, Labrijn AF, Zwick MB & Burton DR (2007) Antigen selection from an HIV-1 immune antibody library displayed on yeast yields many novel antibodies compared to selection from the same library displayed on phage. *Protein Eng. Des. Sel* **20**: 81-90
117. Baker KP, Edwards BM, Main SH, Choi GH, Wager RE, Halpern WG, Lappin PB, Riccobene T, Abramian D, Sekut L, Sturm B, Poortman C, Minter RR, Dobson CL, Williams E, Carmen S, Smith R, Roschke V, Hilbert DM, Vaughan TJ, et al. (2003) Generation and characterization of LymphoStat-B, a human monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulator. *Arthritis Rheum* **48**: 3253-3265
118. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G & Chiswell DJ (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**: 552-554
119. Green LL, Hardy MC, Maynard-Currie CE, Tsuda H, Louie DM, Mendez MJ, Abderrahim H, Noguchi M, Smith DH & Zeng Y (1994) Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat. Genet* **7**: 13-21
120. Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, Trounstein M, Higgins KM, Schramm SR, Kuo CC, Mashayekh R, Wymore K & McCabe JG (1994) Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* **368**: 856-859
121. Nelson AL, Dhimolea E & Reichert JM (2010) Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **9**: 767-774
122. Nechansky A (2010) HAHA--nothing to laugh about. Measuring the immunogenicity (human anti-human antibody response) induced by humanized monoclonal antibodies applying ELISA and SPR technology. *J Pharm Biomed Anal* **51**: 252-254
123. Bender NK, Heilig CE, Dröll B, Wohlgemuth J, Armbruster F-P & Heilig B (2006) Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. *Rheumatol Int* **27**: 269-274
124. Getts DR, Getts MT, McCarthy DP, Chastain EML & Miller SD (2010) Have we overestimated the benefit of human(ized) antibodies? *MAbs* **2**: 682-694
125. Beck A, Wurch T, Bailly C & Corvaia N (2010) Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat. Rev. Immunol* **10**: 345-352
126. Chan AC & Carter PJ (2010) Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* **10**: 301-316
127. <http://www.pipelinereview.com/index.php/2011030440628/FREE-Reports/-TOP-30-Biologics-2010.html>
128. <http://knol.google.com/k/krishan-maggon/top-ten-monoclonal-antibodies-2010/3fy5eowy8suq3/143#>
129. Strohl WR (2009) Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. *Curr. Opin. Biotechnol* **20**: 685-691
130. Reichert JM (2008) Monoclonal antibodies as innovative therapeutics. *Curr Pharm Biotechnol* **9**: 423-430
131. Nelson AL, Dhimolea E & Reichert JM (2010) Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **9**: 767-774
132. Reichert JM (2011) Antibody-based therapeutics to watch in 2011. *MAbs* **3**: 76-99
133. Beck A, Wagner-Rousset E, Wurch T & Corvaia N (2009) [Therapeutic antibodies and related products: choosing the right structure for success]. *Med Sci (Paris)* **25**: 1024-1032
134. Jiang X-R, Song A, Bergelson S, Arroll T, Parekh B, May K, Chung S, Strouse R, Mire-Sluis A & Schenerman M (2011) Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies. *Nat Rev Drug Discov* **10**: 101-111
135. <http://knol.google.com/k/krishan-maggon/new-drug-approvals-fda-2011/3fy5eowy8suq3/148#>
136. Capon DJ, Chamow SM, Mordenti J, Marsters SA, Gregory T, Mitsuya H, Byrn RA, Lucas C, Wurm FM, Groopman JE, Broder S & Smith DH (1989) Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy. *Nature* **337**: 525-531
137. Strohl WR Therapeutic Monoclonal Antibodies: Past, Present, and Future. : 1-50
138. Rask-Andersen M, Almén MS & Schiöth HB (2011) Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov* **10**: 579-590
139. Baselga J (2001) The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur. J. Cancer* **37 Suppl 4**: S16-22
140. Scartozzi M, Bianconi M, Maccaroni E, Giampieri R, Berardi R & Cascinu S (2010) Dalotuzumab, a recombinant humanized mAb targeted against IGF1R for the treatment of cancer. *Curr. Opin. Mol. Ther* **12**: 361-371
141. Ebel W, Routhier EL, Foley B, Jacob S, McDonough JM, Patel RK, Turchin HA, Chao Q, Kline JB, Old LJ, Phillips MD, Nicolaides NC, Sass PM & Grasso L Preclinical evaluation of MORAb-003, a humanized monoclonal antibody antagonizing folate receptor-alpha. *Cancer Immunol* **7**:

142. Huang K, Incognito L, Cheng X, Ulbrandt ND & Wu H (2010) Respiratory Syncytial Virus-Neutralizing Monoclonal Antibodies Motavizumab and Palivizumab Inhibit Fusion. *J. Virol.* **84**: 8132-8140
143. Hudis CA (2007) Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N. Engl. J. Med* **357**: 39-51
144. Badache A & Hynes NE (2004) A new therapeutic antibody masks ErbB2 to its partners. *Cancer Cell* **5**: 299-301
145. Bisikirska B, Colgan J, Luban J, Bluestone JA & Herold KC (2005) TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs. *J Clin Invest* **115**: 2904-2913
146. Pukac L, Kanakaraj P, Humphreys R, Alderson R, Bloom M, Sung C, Riccobene T, Johnson R, Fiscella M, Mahoney A, Carrell J, Boyd E, Yao XT, Zhang L, Zhong L, von Kerczek A, Shepard L, Vaughan T, Edwards B, Dobson C, et al. (0000) HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types in vitro and in vivo. *Br J Cancer* **92**: 1430-1441
147. Zeng Y, Wu XX, Fiscella M, Shimada O, Humphreys R, Albert V & Kakehi Y (2006) Monoclonal antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2 (TRAIL-R2) induces apoptosis in primary renal cell carcinoma cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Int. J. Oncol* **28**: 421-430
148. Cartron G, Watier H, Golay J & Solal-Celigny P (2004) From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* **104**: 2635-2642
149. Hoffmann TK, Meidenbauer N, Dworacki G, Kanaya H & Whiteside TL (2000) Generation of Tumor-specific T Lymphocytes by Cross-Priming with Human Dendritic Cells Ingesting Apoptotic Tumor Cells. *Cancer Research* **60**: 3542 -3549
150. Dhodapkar KM, Krasovsky J, Williamson B & Dhodapkar MV (2002) Antitumor Monoclonal Antibodies Enhance Cross-Presentation of Cellular Antigens and the Generation of Myeloma-specific Killer T Cells by Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine* **195**: 125 - 133
151. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I & Van Cutsem E (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med* **351**: 337-345
152. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK & Ang KK (2006) Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med* **354**: 567-578
153. Brumlik MJ, Daniel BJ, Waehler R, Curiel DT, Giles FJ & Curiel TJ (2008) Trends in immunoconjugate and ligand-receptor based targeting development for cancer therapy. *Expert Opin Drug Deliv* **5**: 87-103
154. Govindan SV & Goldenberg DM (2010) Immunoconjugate anticancer therapeutics. *Cancer Drug Discovery and Development* **Part 4** : 371-392
155. Shen J & Zhu Z (2008) Catumaxomab, a rat/murine hybrid trifunctional bispecific monoclonal antibody for the treatment of cancer. *Curr. Opin. Mol. Ther* **10**: 273-284
156. Kiewe P, Hasmmüller S, Kahlert S, Heinrigs M, Rack B, Marmé A, Korfel A, Jäger M, Lindhofer H, Sommer H, Thiel E & Untch M (2006) Phase I trial of the trifunctional anti-HER2 x anti-CD3 antibody ertumaxomab in metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res* **12**: 3085-3091
157. Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB & Dewitz MC (2005) Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat. Biotechnol* **23**: 1073-1078
158. Pallardy M (2009) [Toxic effects and use of therapeutic monoclonal antibodies]. *Med Sci (Paris)* **25**: 1130-1134
159. Rigal E, Gateault P, Lebranchu Y & Hoarau C (2009) [Therapeutic monoclonal antibodies: update on the risk of opportunistic infections]. *Med Sci (Paris)* **25**: 1135-1140
160. Major EO (2009) Reemergence of PML in natalizumab-treated patients--new cases, same concerns. *N. Engl. J. Med* **361**: 1041-1043
161. Yousry TA, Major EO, Ryschkewitsch C, Fahle G, Fischer S, Hou J, Curfman B, Miskiel K, Mueller-Lenke N, Sanchez E, Barkhof F, Radue E-W, Jäger HR & Clifford DB (2006) Evaluation of Patients Treated with Natalizumab for Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *N Engl J Med* **354**: 924-933

162. Carson KR, Focosi D, Major EO, Petrini M, Richey EA, West DP & Bennett CL (2009) Monoclonal antibody-associated progressive multifocal leucoencephalopathy in patients treated with rituximab, natalizumab, and efalizumab: a Review from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) Project. *Lancet Oncol* **10**: 816-824
163. Keane J (2005) TNF-blocking agents and tuberculosis: new drugs illuminate an old topic. *Rheumatology (Oxford)* **44**: 714-720
164. Thursky KA, Worth LJ, Seymour JF, Miles Prince H & Slavin MA (2006) Spectrum of infection, risk and recommendations for prophylaxis and screening among patients with lymphoproliferative disorders treated with alemtuzumab\*. *Br. J. Haematol* **132**: 3-12
165. Martin SI, Marty FM, Fiumara K, Treon SP, Gribben JG & Baden LR (2006) Infectious complications associated with alemtuzumab use for lymphoproliferative disorders. *Clin. Infect. Dis* **43**: 16-24
166. Osterborg A, Karlsson C, Lundin J, Kimby E & Mellstedt H (2006) Strategies in the management of alemtuzumab-related side effects. *Semin. Oncol* **33**: S29-35
167. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Muñoz S, Soria N, Galiana D, Bertolaccini L, Cuadrado M-J & Khamashta MA (2007) Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies: analysis of 233 cases. *Medicine (Baltimore)* **86**: 242-251
168. Kirk AD, Hale DA, Swanson SJ & Mannon RB (2006) Autoimmune thyroid disease after renal transplantation using depletion induction with alemtuzumab. *Am. J. Transplant* **6**: 1084-1085
169. Weber J (2009) Ipilimumab: controversies in its development, utility and autoimmune adverse events. *Cancer Immunol. Immunother* **58**: 823-830
170. Beck KE, Blansfield JA, Tran KQ, Feldman AL, Hughes MS, Royal RE, Kammula US, Topalian SL, Sherry RM, Kleiner D, Quezado M, Lowy I, Yellin M, Rosenberg SA & Yang JC (2006) Enterocolitis in Patients With Cancer After Antibody Blockade of Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4. *J Clin Oncol* **24**: 2283-2289
171. Wing M (2008) Monoclonal antibody first dose cytokine release syndromes-mechanisms and prediction. *J Immunotoxicol* **5**: 11-15
172. Winkler U, Jensen M, Manzke O, Schulz H, Diehl V & Engert A (1999) Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8). *Blood* **94**: 2217-2224
173. Wing MG, Moreau T, Greenwood J, Smith RM, Hale G, Isaacs J, Waldmann H, Lachmann PJ & Compston A (1996) Mechanism of first-dose cytokine-release syndrome by CAMPATH 1-H: involvement of CD16 (FcgammaRIII) and CD11a/CD18 (LFA-1) on NK cells. *J Clin Invest* **98**: 2819-2826
174. Chatenoud L, Ferran C, Legendre C, Thouard I, Merite S, Reuter A, Gevaert Y, Kreis H, Franchimont P & Bach JF (1990) In vivo cell activation following OKT3 administration. Systemic cytokine release and modulation by corticosteroids. *Transplantation* **49**: 697-702
175. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD & Panoskaltsis N (2006) Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N. Engl. J. Med* **355**: 1018-1028
176. Kenter MJH & Cohen AF (2006) Establishing risk of human experimentation with drugs: lessons from TGN1412. *Lancet* **368**: 1387-1391
177. Muller PY & Brennan FR (2009) Safety assessment and dose selection for first-in-human clinical trials with immunomodulatory monoclonal antibodies. *Clin. Pharmacol. Ther* **85**: 247-258
178. Dayan CM & Wraith DC (2008) Preparing for first-in-man studies: the challenges for translational immunology post-TGN1412. *Clin Exp Immunol* **151**: 231-234
179. St. Clair EW (2008) The calm after the cytokine storm: lessons from the TGN1412 trial. *J Clin Invest* **118**: 1344-1347
180. Pérez-Soler R & Saltz L (2005) Cutaneous adverse effects with HER1/EGFR-targeted agents: is there a silver lining? *J. Clin. Oncol* **23**: 5235-5246
181. Saif MW & Kim R (2007) Incidence and management of cutaneous toxicities associated with cetuximab. *Expert Opin Drug Saf* **6**: 175-182
182. Force T, Krause DS & Van Etten RA (2007) Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nat. Rev. Cancer* **7**: 332-344
183. Chen MH, Kerkelä R & Force T (2008) Mechanisms of cardiac dysfunction associated with tyrosine kinase inhibitor cancer therapeutics. *Circulation* **118**: 84-95
184. Baudouin V, Crusiaux A, Haddad E, Schandene L, Goldman M, Loirat C & Abramowicz D (2003) Anaphylactic shock caused by immunoglobulin E sensitization after retreatment with the chimeric anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody basiliximab. *Transplantation* **76**: 459-463

185. Chung CH, Mirakhor B, Chan E, Le Q-T, Berlin J, Morse M, Murphy BA, Satinover SM, Hosen J, Mauro D, Slebos RJ, Zhou Q, Gold D, Hatley T, Hicklin DJ & Platts-Mills TAE (2008) Cetuximab-Induced Anaphylaxis and IgE Specific for Galactose- $\alpha$ -1,3-Galactose. *N Engl J Med* **358**: 1109-1117
186. Harding FA, Stickler MM, Razo J & DuBridge RB (2010) The immunogenicity of humanized and fully human antibodies. *MAbs* **2**: 256-265
187. Cochet O & Chartrain M (2009) [Producing several hundred of kilograms of monoclonal antibodies for therapy: a constant challenge]. *Med Sci (Paris)* **25**: 1078-1084
188. Olivier S & Mehtali M (2009) [Alternative production systems for therapeutic monoclonal antibodies]. *Med Sci (Paris)* **25**: 1163-1168
189. O'Brien SM, Kantarjian H, Thomas DA, Giles FJ, Freireich EJ, Cortes J, Lerner S & Keating MJ (2001) Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol* **19**: 2165-2170
190. Ogunjimi AA, Chandler JM, Gooding CM, III AR & Choudary PV (1999) High-level secretory expression of immunologically active intact antibody from the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters* **21**: 561-567
191. Ward M, Lin C, Victoria DC, Fox BP, Fox JA, Wong DL, Meerman HJ, Pucci JP, Fong RB, Heng MH, Tsurushita N, Gieswein C, Park M & Wang H (2004) Characterization of Humanized Antibodies Secreted by *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2567-2576
192. Edelman L, Margaritte C, Chaabihi H, Monchâtre E, Blanchard D, Cardona A, Morin F, Dumas G, Petres S & Kaczorek M (1997) Obtaining a functional recombinant anti-rhesus (D) antibody using the baculovirus–insect cell expression system. *Immunology* **91**: 13-19
193. Lai H, Engle M, Fuchs A, Keller T, Johnson S, Gorlatov S, Diamond MS & Chen Q (2010) Monoclonal antibody produced in plants efficiently treats West Nile virus infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 2419-2424
194. Olivier S, Jacoby M, Brillion C, Bouletreau S, Mollet T, Nerriere O, Angel A, Danet S, Souttou B, Guehenneux F, Gauthier L, Berthomé M, Vié H, Beltraminelli N & Mehtali M (2010) EB66 cell line, a duck embryonic stem cell-derived substrate for the industrial production of therapeutic monoclonal antibodies with enhanced ADCC activity. *MAbs* **2**:
195. Tang B, Yu S, Zheng M, Ding F, Zhao R, Zhao J, Dai Y & Li N (2008) High level expression of a functional human/mouse chimeric anti-CD20 monoclonal antibody in milk of transgenic mice. *Transgenic Res* **17**: 727-732
196. Jigami Y (2008) Yeast glycobiology and its application. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **72**: 637-648
197. Harrison RL & Jarvis DL (2006) Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce «mammalianized» recombinant glycoproteins. *Adv. Virus Res* **68**: 159-191
198. Vézina L-P, Faye L, Lerouge P, D'Aoust M-A, Marquet-Blouin E, Burel C, Lavoie P-O, Bardor M & Gomord V (2009) Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants. *Plant Biotechnol. J* **7**: 442-455
199. Arbabi-Ghahroudi M, Tanha J & MacKenzie R (2005) Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metastasis Rev* **24**: 501-519
200. Harmsen MM & De Haard HJ (2007) Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **77**: 13-22
201. Reichert JM, Beck A & Iyer H (2009) European Medicines Agency workshop on biosimilar monoclonal antibodies: July 2, 2009, London, UK. *MAbs* **1**: 394-416
202. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ & Press M (2002) Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol* **20**: 719-726
203. Cartron G & Rossi J-F (2009) [Therapeutic monoclonal antibodies in onco-hematology]. *Med Sci (Paris)* **25**: 1085-1089
204. McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D & Dallaire BK (1998) Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J. Clin. Oncol* **16**: 2825-2833
205. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P, Reyes F, Lederlin P & Gisselbrecht C (2002) CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med* **346**: 235-242

206. Beckman RA, Weiner LM & Davis HM (2007) Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. *Cancer* **109**: 170-179
207. Thurber GM, Schmidt MM & Wittrup KD (2008) Factors determining antibody distribution in tumors. *Trends Pharmacol Sci* **29**: 57
208. Rudnick SI & Adams GP (2009) Affinity and avidity in antibody-based tumor targeting. *Cancer Biother. Radiopharm* **24**: 155-161
209. Adams GP, Schier R, Marshall K, Wolf EJ, McCall AM, Marks JD & Weiner LM (1998) Increased affinity leads to improved selective tumor delivery of single-chain Fv antibodies. *Cancer Res* **58**: 485-490
210. Adams GP, Schier R, McCall AM, Simmons HH, Horak EM, Alpaugh RK, Marks JD & Weiner LM (2001) High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain Fv antibody molecules. *Cancer Res* **61**: 4750-4755
211. Nielsen UB, Adams GP, Weiner LM & Marks JD (2000) Targeting of bivalent anti-ErbB2 diabody antibody fragments to tumor cells is independent of the intrinsic antibody affinity. *Cancer Res* **60**: 6434-6440
212. Fujimori K, Covell DG, Fletcher JE & Weinstein JN (1989) Modeling analysis of the global and microscopic distribution of immunoglobulin G, F(ab')<sub>2</sub>, and Fab in tumors. *Cancer Res* **49**: 5656-5663
213. Iannello A & Ahmad A (2005) Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies. *Cancer Metastasis Rev* **24**: 487-499
214. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P & Watier H (2002) Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* **99**: 754-758
215. Dall'Ozzo S, Tartas S, Piantaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, Watier H & Thibault G (2004) Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res* **64**: 4664-4669
216. Weng W-K & Levy R (2003) Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response to Rituximab in Patients With Follicular Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* **21**: 3940-3947
217. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, Hanai N & Shitara K (2003) The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Biol. Chem* **278**: 3466-3473
218. Sibérl S, de Romeuf C, Bihoreau N, Fernandez N, Meterreau J-L, Regenman A, Nony E, Gaucher C, Glacet A, Jorieux S, Klein P, Hogarth MP, Fridman W-H, Bourel D, Béliard R & Teillaud J-L (2006) Selection of a human anti-RhD monoclonal antibody for therapeutic use: impact of IgG glycosylation on activating and inhibitory Fc gamma R functions. *Clin. Immunol* **118**: 170-179
219. Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, Chung HS, Eivazi A, Yoder SC, Vielmetter J, Carmichael DF, Hayes RJ & Dahiyat BI (2006) Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 4005-4010
220. Preithner S, Elm S, Lippold S, Locher M, Wolf A, da Silva AJ, Baeuerle PA & Prang NS (2006) High concentrations of therapeutic IgG1 antibodies are needed to compensate for inhibition of antibody-dependent cellular cytotoxicity by excess endogenous immunoglobulin G. *Mol. Immunol* **43**: 1183-1193
221. Nimmerjahn F & Ravetch JV (2007) Antibodies, Fc receptors and cancer. *Curr. Opin. Immunol* **19**: 239-245
222. Beum PV, Kennedy AD, Williams ME, Lindorfer MA & Taylor RP (2006) The shaving reaction: rituximab/CD20 complexes are removed from mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia cells by THP-1 monocytes. *J. Immunol* **176**: 2600-2609
223. Zhang Y & Pastan I (2008) High shed antigen levels within tumors: an additional barrier to immunoconjugate therapy. *Clin. Cancer Res* **14**: 7981-7986
224. Gelderman KA, Tomlinson S, Ross GD & Gorter A (2004) Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol* **25**: 158-164
225. Yang WP, Green K, Pinz-Sweeney S, Briones AT, Burton DR & Barbas CF 3rd (1995) CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J. Mol. Biol* **254**: 392-403

226. Schier R, McCall A, Adams GP, Marshall KW, Merritt H, Yim M, Crawford RS, Weiner LM, Marks C & Marks JD (1996) Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J. Mol. Biol* **263**: 551-567
227. Razai A, Garcia-Rodriguez C, Lou J, Geren IN, Forsyth CM, Robles Y, Tsai R, Smith TJ, Smith LA, Siegel RW, Feldhaus M & Marks JD (2005) Molecular evolution of antibody affinity for sensitive detection of botulinum neurotoxin type A. *J. Mol. Biol* **351**: 158-169
228. Saviranta P, Pajunen M, Jauria P, Karp M, Pettersson K, Mäntsälä P & Lövgren T (1998) Engineering the steroid-specificity of an anti-17beta-estradiol Fab by random mutagenesis and competitive phage panning. *Protein Eng* **11**: 143-152
229. Popkov M, Jendreyko N, Gonzalez-Sapienza G, Mage RG, Rader C & Barbas CF 3rd (2004) Human/mouse cross-reactive anti-VEGF receptor 2 recombinant antibodies selected from an immune b9 allotype rabbit antibody library. *J. Immunol. Methods* **288**: 149-164
230. Werther WA, Gonzalez TN, O'Connor SJ, McCabe S, Chan B, Hotaling T, Champe M, Fox JA, Jardieu PM, Berman PW & Presta LG (1996) Humanization of an anti-lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 monoclonal antibody and reengineering of the humanized antibody for binding to rhesus LFA-1. *J. Immunol* **157**: 4986-4995
231. Barbas CF, Hu D, Dunlop N, Sawyer L, Cababa D, Hendry RM, Nara PL & Burton DR (1994) In vitro evolution of a neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 3809-3813
232. Tao MH, Smith RI & Morrison SL (1993) Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation. *J. Exp. Med* **178**: 661-667
233. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, BrIGG J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA & Presta LG (2001) High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J. Biol. Chem* **276**: 6591-6604
234. Idusogie EE, Presta LG, Gazzano-Santoro H, Totpal K, Wong PY, Ultsch M, Meng YG & Mulkerrin MG (2000) Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J. Immunol* **164**: 4178-4184
235. Idusogie EE, Wong PY, Presta LG, Gazzano-Santoro H, Totpal K, Ultsch M & Mulkerrin MG (2001) Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *J. Immunol* **166**: 2571-2575
236. Armour KL, van de Winkel JGJ, Williamson LM & Clark MR (2003) Differential binding to human Fc gamma RIIa and Fc gamma RIIb receptors by human IgG wildtype and mutant antibodies. *Mol. Immunol* **40**: 585-593
237. Richards JO, Karki S, Lazar GA, Chen H, Dang W & Desjarlais JR (2008) Optimization of antibody binding to Fc gamma RIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol. Cancer Ther* **7**: 2517-2527
238. Cheung N-KV, Sowers R, Vickers AJ, Cheung IY, Kushner BH & Gorlick R (2006) FCGR2A polymorphism is correlated with clinical outcome after immunotherapy of neuroblastoma with anti-GD2 antibody and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J. Clin. Oncol* **24**: 2885-2890
239. Raju TS (2008) Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgG. *Curr. Opin. Immunol* **20**: 471-478
240. Hodoniczky J, Zheng YZ & James DC (2005) Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc N-glycan remodeling in vitro. *Biotechnol. Prog* **21**: 1644-1652
241. Umaña P, Jean-Mairet J, Moudry R, Amstutz H & Bailey JE (1999) Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat. Biotechnol* **17**: 176-180
242. Yamane-Ohnuki N, Kinoshita S, Inoue-Urakubo M, Kusunoki M, Iida S, Nakano R, Wakitani M, Niwa R, Sakurada M, Uchida K, Shitara K & Satoh M (2004) Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnol. Bioeng* **87**: 614-622
243. Li H, Sethuraman N, Stadheim TA, Zha D, Prinz B, Ballew N, Bobrowicz P, Choi B-K, Cook WJ, Cukan M, Houston-Cummings NR, Davidson R, Gong B, Hamilton SR, Hoopes JP, Jiang Y, Kim N, Mansfield R, Nett JH, Rios S, et al. (2006) Optimization of humanized IgG in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nat. Biotechnol* **24**: 210-215

244. Iida S, Misaka H, Inoue M, Shibata M, Nakano R, Yamane-Ohnuki N, Wakitani M, Yano K, Shitara K & Satoh M (2006) Nonfucosylated therapeutic IgG1 antibody can evade the inhibitory effect of serum immunoglobulin G on antibody-dependent cellular cytotoxicity through its high binding to FcγRIIIa. *Clin. Cancer Res* **12**: 2879-2887
245. Niwa R, Hatanaka S, Shoji-Hosaka E, Sakurada M, Kobayashi Y, Uehara A, Yokoi H, Nakamura K & Shitara K (2004) Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 is independent of FcγRIIIa functional polymorphism. *Clin. Cancer Res* **10**: 6248-6255
246. Mössner E, Brünker P, Moser S, Püntener U, Schmidt C, Herter S, Grau R, Gerdes C, Nopora A, van Puijenbroek E, Ferrara C, Sondermann P, Jäger C, Strein P, Fertig G, Friess T, Schüll C, Bauer S, Dal Porto J, Del Nagro C, et al. (2010) Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* **115**: 4393-4402
247. Labrijn AF, Aalberse RC & Schuurman J (2008) When binding is enough: nonactivating antibody formats. *Curr. Opin. Immunol* **20**: 479-485
248. Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ & Ward ES (1997) Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. *Nat. Biotechnol* **15**: 637-640
249. Hinton PR, Johlfs MG, Xiong JM, Hanestad K, Ong KC, Bullock C, Keller S, Tang MT, Tso JY, Vásquez M & Tsurushita N (2004) Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. *J. Biol. Chem* **279**: 6213-6216
250. Dall'Acqua WF, Kiener PA & Wu H (2006) Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J. Biol. Chem* **281**: 23514-23524
251. Zalevsky J, Chamberlain AK, Horton HM, Karki S, Leung IWL, Sproule TJ, Lazar GA, Roopenian DC & Desjarlais JR (2010) Enhanced antibody half-life improves in vivo activity. *Nat Biotechnol* **28**: 157-159
252. Vaccaro C, Zhou J, Ober RJ & Ward ES (2005) Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody levels. *Nat. Biotechnol* **23**: 1283-1288
253. Chapman AP, Antoniw P, Spitali M, West S, Stephens S & King DJ (1999) Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half-lives. *Nat. Biotechnol* **17**: 780-783
254. Holliger P & Hudson PJ (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol* **23**: 1126-1136
255. Cuesta AM, Sainz-Pastor N, Bonet J, Oliva B & Alvarez-Vallina L (2010) Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. *Trends Biotechnol* **28**: 355-362
256. Todorovska A, Roovers RC, Dolezal O, Kortt AA, Hoogenboom HR & Hudson PJ (2001) Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J. Immunol. Methods* **248**: 47-66
257. Deyev SM & Lebedenko EN (2008) Multivalency: the hallmark of antibodies used for optimization of tumor targeting by design. *Bioessays* **30**: 904-918
258. Schmidt MM & Wittrup KD (2009) A modeling analysis of the effects of molecular size and binding affinity on tumor targeting. *Mol. Cancer Ther* **8**: 2861-2871
259. Wittel UA, Jain M, Goel A, Chauhan SC, Colcher D & Batra SK (2005) The in vivo characteristics of genetically engineered divalent and tetravalent single-chain antibody constructs. *Nucl. Med. Biol* **32**: 157-164
260. Olafsen T & Wu AM (2010) Antibody vectors for imaging. *Semin Nucl Med* **40**: 167-181
261. Stijlemans B, Conrath K, Cortez-Retamozo V, Van Xong H, Wyns L, Senter P, Revets H, De Baetselier P, Muyldermans S & Magez S (2004) Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. *J. Biol. Chem* **279**: 1256-1261
262. Rothbauer U, Zolghadr K, Tillib S, Nowak D, Schermelleh L, Gahl A, Backmann N, Conrath K, Muyldermans S, Cardoso MC & Leonhardt H (2006) Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat. Methods* **3**: 887-889
263. Bouchet J, Basmaciogullari SE, Chrobak P, Stolp B, Bouchard N, Fackler OT, Chames P, Jolicoeur P, Benichou S & Baty D (2011) Inhibition of the Nef regulatory protein of HIV-1 by a single-domain antibody. *Blood* **117**: 3559-3568
264. Nelson AL & Reichert JM (2009) Development trends for therapeutic antibody fragments. *Nat. Biotechnol* **27**: 331-337
265. Stas P & Lasters I (2009) Immunogenicity of therapeutic antibodies. *Med Sci (Paris)* **25**: 1070-1077
266. Hwang WYK, Almagro JC, Buss TN, Tan P & Foote J (2005) Use of human germline genes in a CDR homology-based approach to antibody humanization. *Methods* **36**: 35-42

267. Tan P, Mitchell DA, Buss TN, Holmes MA, Anasetti C & Foote J (2002) « Superhumanized » antibodies: reduction of immunogenic potential by complementarity-determining region grafting with human germline sequences: application to an anti-CD28. *J. Immunol* **169**: 1119-1125
268. Pelat T, Bedouelle H, Rees AR, Crennell SJ, Lefranc M-P & Thullier P (2008) Germline humanization of a non-human primate antibody that neutralizes the anthrax toxin, by in vitro and in silico engineering. *J. Mol. Biol* **384**: 1400-1407
269. European Medicines Agency (EMA) (2010) Guideline on immunogenicity assessment of monoclonal antibodies intended for in vivo clinical use. EMA/CHMP/BMWP/86289/2010
270. Manache L, Dulieu C & Boussif O (2009) [Therapeutic antibodies: importance of galenics for efficacy and safety]. *Med Sci (Paris)* **25**: 1063-1069
271. Liu H, Gaza-Bulseco G, Faldu D, Chumsae C & Sun J (2008) Heterogeneity of monoclonal antibodies. *J Pharm Sci* **97**: 2426-2447
272. Davis PM, Abraham R, Xu L, Nadler SG & Suchard SJ (2007) Abatacept binds to the Fc receptor CD64 but does not mediate complement-dependent cytotoxicity or antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Rheumatol* **34**: 2204-2210
273. Fuenmayor J & Montaña RF (2011) Novel Antibody-Based Proteins for Cancer Immunotherapy. *Cancers* **3**: 3370-3393
274. Govindan SV & Goldenberg DM (2010) New antibody conjugates in cancer therapy. *ScientificWorldJournal* **10**: 2070-2089
275. Barbet J, Chatal J-F & Kraeber-Bodéré F (2009) [Radiolabeled antibodies for cancer treatment]. *Med Sci (Paris)* **25**: 1039-1045
276. Beck A, Haeuw J-F, Wurch T, Goetsch L, Bailly C & Corvaia N (2010) The next generation of antibody-drug conjugates comes of age. *Discov Med* **10**: 329-339
277. Choudhary S, Mathew M & Verma RS (2011) Therapeutic potential of anticancer immunotoxins. *Drug Discov. Today* **16**: 495-503
278. Andrady C, Sharma SK & Chester KA (2011) Antibody-enzyme fusion proteins for cancer therapy. *Immunotherapy* **3**: 193-211
279. Sondel PM, Hank JA, Gan J, Neal Z & Albertini MR (2003) Preclinical and clinical development of immunocytokines. *Curr Opin Investig Drugs* **4**: 696-700
280. Kontermann RE (2006) Immunoliposomes for cancer therapy. *Curr. Opin. Mol. Ther* **8**: 39-45
281. Fay F & Scott CJ (2011) Antibody-targeted nanoparticles for cancer therapy. *Immunotherapy* **3**: 381-394
282. Cheson BD & Leonard JP (2008) Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med* **359**: 613-626
283. Supiot S, Faivre-Chauvet A, Couturier O, Heymann MF, Robillard N, Kraeber-Bodéré F, Morandeau L, Mahé MA & Chérel M (2002) Comparison of the biologic effects of MA5 and B-B4 monoclonal antibody labeled with iodine-131 and bismuth-213 on multiple myeloma. *Cancer* **94**: 1202-1209
284. Chatal J-F, Campion L, Kraeber-Bodéré F, Bardet S, Vuillez J-P, Charbonnel B, Rohmer V, Chang C-H, Sharkey RM, Goldenberg DM & Barbet J (2006) Survival improvement in patients with medullary thyroid carcinoma who undergo pretargeted anti-carcinoembryonic-antigen radioimmunotherapy: a collaborative study with the French Endocrine Tumor Group. *J. Clin. Oncol* **24**: 1705-1711
285. Haeuw J-F, Caussanel V & Beck A (2009) [Immunoconjugates, drug-armed antibodies to fight against cancer]. *Med Sci (Paris)* **25**: 1046-1052
286. Cortez-Retamozo V, Backmann N, Senter PD, Wernery U, De Baetselier P, Muyldermans S & Revets H (2004) Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res* **64**: 2853-2857
287. Sharma SK, Pedley RB, Bhatia J, Boxer GM, El-Emir E, Qureshi U, Tolner B, Lowe H, Michael NP, Minton N, Begent RHJ & Chester KA (2005) Sustained tumor regression of human colorectal cancer xenografts using a multifunctional mannosylated fusion protein in antibody-directed enzyme prodrug therapy. *Clin. Cancer Res* **11**: 814-825
288. Borghaei H, Alpaugh K, Hedlund G, Forsberg G, Langer C, Rogatko A, Hawkins R, Dueland S, Lassen U & Cohen RB (2009) Phase I Dose Escalation, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Naptumomab Estafenatox Alone in Patients With Advanced Cancer and With Docetaxel in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **27**: 4116-4123
289. Loo C, Lowery A, Halas N, West J & Drezek R (2005) Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. *Nano Lett* **5**: 709-711

290. Ito A, Kuga Y, Honda H, Kikkawa H, Horiuchi A, Watanabe Y & Kobayashi T (2004) Magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes for combination of antibody therapy with hyperthermia. *Cancer Lett* **212**: 167-175
291. Chames P & Baty D (2009a) Bispecific antibodies for cancer therapy. *Curr Opin Drug Discov Devel* **12**: 276-283
292. Chames P & Baty D (2009b) Bispecific antibodies for cancer therapy: the light at the end of the tunnel? *MAbs* **1**: 539-547
293. Staerz UD, Kanagawa O & Bevan MJ (1985) Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells. *Nature* **314**: 628-631
294. Baeuerle PA, Kufer P & Bargou R (2009) BiTE: Teaching antibodies to engage T-cells for cancer therapy. *Curr. Opin. Mol. Ther* **11**: 22-30
295. Bargou R, Leo E, Zugmaier G, Klinger M, Goebeler M, Knop S, Noppeney R, Viardot A, Hess G, Schuler M, Einsele H, Brandl C, Wolf A, Kirchinger P, Klappers P, Schmidt M, Riethmüller G, Reinhardt C, Baeuerle PA & Kufer P (2008) Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* **321**: 974-977
296. Schlereth B, Fichtner I, Lorenczewski G, Kleindienst P, Brischwein K, da Silva A, Kufer P, Lutterbuese R, Junghahn I, Kasimir-Bauer S, Wimberger P, Kimmig R & Baeuerle PA (2005) Eradication of tumors from a human colon cancer cell line and from ovarian cancer metastases in immunodeficient mice by a single-chain Ep-CAM-/CD3-bispecific antibody construct. *Cancer Res* **65**: 2882-2889
297. Lutterbuese R, Raum T, Kischel R, Lutterbuese P, Schlereth B, Schaller E, Mangold S, Rau D, Meier P, Kiener PA, Mulgrew K, Oberst MD, Hammond SA, Baeuerle PA & Kufer P (2009) Potent control of tumor growth by CEA/CD3-bispecific single-chain antibody constructs that are not competitively inhibited by soluble CEA. *J. Immunother* **32**: 341-352
298. Offner S, Hofmeister R, Romaniuk A, Kufer P & Baeuerle PA (2006) Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells. *Mol. Immunol* **43**: 763-771
299. Lindhofer H, Mocikat R, Steipe B & Thierfelder S (1995) Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies. *J. Immunol* **155**: 219-225
300. Zeidler R, Reisbach G, Wollenberg B, Lang S, Chaubal S, Schmitt B & Lindhofer H (1999) Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing. *J. Immunol* **163**: 1246-1252
301. Ruf P & Lindhofer H (2001) Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody. *Blood* **98**: 2526-2534
302. Parsons S, Hennig M, Linke R, Klein A, Lahr H, Lindhofer H, et al. Clinical benefit of catumaxomab in malignant ascites in patient subpopulations in a pivotal phase II/III trial. *J Clin Oncol* 2009; 27.
303. Muller PY & Brennan FR (2009) Safety assessment and dose selection for first-in-human clinical trials with immunomodulatory monoclonal antibodies. *Clin. Pharmacol. Ther* **85**: 247-258
304. Grosse-Hovest L, Hartlapp I, Marwan W, Brem G, Rammensee H-G & Jung G (2003) A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing. *Eur. J. Immunol* **33**: 1334-1340
305. Hartmann F, Renner C, Jung W, Deisting C, Juwana M, Eichentopf B, Kloft M & Pfreundschuh M (1997) Treatment of refractory Hodgkin's disease with an anti-CD16/CD30 bispecific antibody. *Blood* **89**: 2042-2047
306. Lu D, Jimenez X, Zhang H, Wu Y, Bohlen P, Witte L & Zhu Z (2001) Complete inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) activities with a bifunctional diabody directed against both VEGF kinase receptors, fms-like tyrosine kinase receptor and kinase insert domain-containing receptor. *Cancer Res* **61**: 7002-7008
307. Lu D, Zhang H, Koo H, Tonra J, Balderes P, Prewett M, Corcoran E, Mangalampalli V, Bassi R, Anselma D, Patel D, Kang X, Ludwig DL, Hicklin DJ, Bohlen P, Witte L & Zhu Z (2005) A fully human recombinant IgG-like bispecific antibody to both the epidermal growth factor receptor and the insulin-like growth factor receptor for enhanced antitumor activity. *J. Biol. Chem* **280**: 19665-19672
308. Bostrom J, Yu S-F, Kan D, Appleton BA, Lee CV, Billeci K, Man W, Peale F, Ross S, Wiesmann C & Fuh G (2009) Variants of the antibody herceptin that interact with HER2 and VEGF at the antigen binding site. *Science* **323**: 1610-1614

309. Wu C, Ying H, Grinnell C, Bryant S, Miller R, Clabbers A, Bose S, McCarthy D, Zhu R-R, Santora L, Davis-Taber R, Kunes Y, Fung E, Schwartz A, Sakorafas P, Gu J, Tarcsa E, Murtaza A & Ghayur T (2007) Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin. *Nat. Biotechnol* **25**: 1290-1297
310. Mabry R, Lewis KE, Moore M, McKernan PA, Bukowski TR, Bontadelli K, Brender T, Okada S, Lum K, West J, Kuijper JL, Ardourel D, Franke S, Lockwood L, Vu T, Frank A, Appleby MW, Wolf A, Reardon B, Hamacher NB, et al. (2010) Engineering of stable bispecific antibodies targeting IL-17A and IL-23. *Protein Eng. Des. Sel* **23**: 115-127
311. Rossi EA, Goldenberg DM, Cardillo TM, McBride WJ, Sharkey RM & Chang C-H (2006) Stably tethered multifunctional structures of defined composition made by the dock and lock method for use in cancer targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **103**: 6841-6846
312. Sharkey RM, Karacay H, Litwin S, Rossi EA, McBride WJ, Chang C-H & Goldenberg DM (2008) Improved therapeutic results by pretargeted radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a new recombinant, trivalent, anti-CD20, bispecific antibody. *Cancer Res* **68**: 5282-5290
313. Harum JS (2006) recombinant polyclonal antibodies : the next generation of antibody therapeutics ? *Drug Discov. Today* **11**: 665-660
314. Schlyer S & Horuk R (2006) I want a new drug: G-protein-coupled receptors in drug development. *Drug Discov. Today* **11**: 481-493
315. Pierce KL, Premont RT & Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **3**: 639-650
316. Lagerström MC & Schiöth HB (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **7**: 339-357
317. Macarron R (2006) Critical review of the role of HTS in drug discovery. *Drug Discov. Today* **11**: 277-279
318. Hutchings CJ, Koglin M & Marshall FH (2010) Therapeutic antibodies directed at G protein-coupled receptors. *MAbs* **2**: 594-606
319. Hipser C, Bushlin I, Gupta A, Gomes I & Devi LA (2010) Role of antibodies in developing drugs that target G-protein-coupled receptor dimers. *Mt. Sinai J. Med* **77**: 374-380
320. Milligan G (2006) G-protein-coupled receptor heterodimers: pharmacology, function and relevance to drug discovery. *Drug Discov. Today* **11**: 541-549
321. Banères J-L, Popot J-L & Mouillac B (2011) New advances in production and functional folding of G-protein-coupled receptors. *Trends Biotechnol* **29**: 314-322
322. Kirkpatrick P (2009) Specificity concerns with antibodies for receptor mapping. *Nat Rev Drug Discov* **8**: 278
323. Kutzler MA & Weiner DB (2008) DNA vaccines: ready for prime time? *Nat. Rev. Genet* **9**: 776-788
324. Kaptein SJF, Jungscheleger-Russell J, Martínez-Martínez P, Beisser PS, Lavreysen H, Vanheel A, De Baets MH, Bruggeman CA, Vink C & Losen M (2008) Generation of polyclonal antibodies directed against G protein-coupled receptors using electroporation-aided DNA immunization. *J Pharmacol Toxicol Methods* **58**: 27-31
325. Fujimoto A, Takatsuka S, Ishida I & Chiba J (2009) Production of human antibodies to native cytokine receptors using the genetic immunization of KM mice. *Hum Antibodies* **18**: 75-80
326. Allard B, Priam F, Deshayes F, Ducancel F, Boquet D, Wijkhuisen A & Couraud J-Y (2011) Electroporation-aided DNA immunization generates polyclonal antibodies against the native conformation of human endothelin B receptor. *DNA Cell Biol* **30**: 727-737
327. Lappano R & Maggiolini M (2011) G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **10**: 47-60
328. Innamorati G, Valenti MT, Giovinazzo F, Dalle Carbonare L, Parenti M & Bassi C (2011) Molecular Approaches To Target GPCRs in Cancer Therapy. *Pharmaceuticals* **4**: 567-589
329. Marinissen MJ & Gutkind JS (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci* **22**: 368-376
330. Cheng Z, Zhou S, Wang X, Xie F, Wu H, Liu G, Wang Q, Chen Y, Hu Y, Lu B & Zhang X (2009) Characterization and application of two novel monoclonal antibodies against human CXCR4: cell proliferation and migration regulation for glioma cell line in vitro by CXCR4/SDF-1alpha signal. *Hybridoma (Larchmt)* **28**: 33-41
331. Asundi J, Reed C, Arca J, McCutcheon K, Ferrando R, Clark S, Luis E, Tien J, Firestein R & Polakis P (2011) An antibody-drug conjugate targeting the endothelin B receptor for the treatment of melanoma. *Clin. Cancer Res* **17**: 965-975

## L'AXE ENDOTHELINE DANS LES PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES ET LE CANCER

332. Furchgott RF & Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373-376
333. Vanhoutte PM (1988) The endothelium--modulator of vascular smooth-muscle tone. *N. Engl. J. Med* **319**: 512-513
334. Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ & Highsmith RF (1985) Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol* **248**: C550-556
335. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE & Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 9265-9269
336. Palmer RM, Ferrige AG & Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**: 524-526
337. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K & Masaki T (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**: 411-415
338. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyachi T, Goto K & Masaki T (1989) The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 2863-2867
339. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H & Nakanishi S (1990) Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* **348**: 730-732
340. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K & Masaki T (1990) Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* **348**: 732-735
341. Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D & Yanagisawa M (1994) ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* **78**: 473-485
342. Emoto N & Yanagisawa M (1995) Endothelin-converting Enzyme-2 Is a Membrane-bound, Phosphoramidon-sensitive Metalloprotease with Acidic pH Optimum. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 15262 -15268
343. Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T, Aoyama T, Okamoto Y, Miwa S, Shimohama S, Kimura J & Masaki T (1998) Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett* **428**: 304-308
344. Janes RW, Peapus DH & Wallace BA (1994) The crystal structure of human endothelin. *Nat. Struct. Biol* **1**: 311-319
345. Atkins AR, Martin RC & Smith R (1995) 1H NMR studies of sarafotoxin SRTb, a nonselective endothelin receptor agonist, and IRL 1620, an ETB receptor-specific agonist. *Biochemistry* **34**: 2026-2033
346. Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, Shinmi O, Sugita Y, Yanagisawa M, Goto K & Masaki T (1988) Structure-activity relationships of endothelin: importance of the C-terminal moiety. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **156**: 1182-1186
347. Nakajima K, Kubo S, Kumagaye S, Nishio H, Tsunemi M, Inui T, Kuroda H, Chino N, Watanabe TX & Kimura T (1989) Structure-activity relationship of endothelin: importance of charged groups. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **163**: 424-429
348. Lättig J, Oksche A, Beyermann M, Rosenthal W & Krause G (2009) Structural determinants for selective recognition of peptide ligands for endothelin receptor subtypes ETA and ETB. *J. Pept. Sci* **15**: 479-491
349. Doi Y, Kudo H, Nishino T, Yamamoto O, Nagata T, Nara S, Morita M & Fujimoto S (2002) Enhanced expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in acute hypoxic rat aorta. *Histol. Histopathol* **17**: 97-105
350. Harrison VJ, Barnes K, Turner AJ, Wood E, Corder R & Vane JR (1995) Identification of endothelin 1 and big endothelin 1 in secretory vesicles isolated from bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 6344-6348
351. Stojilkovic SS & Catt KJ (1996) Expression and signal transduction pathways of endothelin receptors in neuroendocrine cells. *Front Neuroendocrinol* **17**: 327-369
352. Wagner OF, Christ G, Wojta J, Vierhapper H, Parzer S, Nowotny PJ, Schneider B, Waldhäusl W & Binder BR (1992) Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J. Biol. Chem* **267**: 16066-16068
353. Battistini B, D'Orléans-Juste P & Sirois P (1993) Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab. Invest* **68**: 600-628

354. Dupuis J, Stewart DJ, Cernacek P & Gosselin G (1996) Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation* **94**: 1578-1584
355. Abassi ZA, Tate JE, Golomb E & Keiser HR (1992) Role of neutral endopeptidase in the metabolism of endothelin. *Hypertension* **20**: 89-95
356. Stow LR, Jacobs ME, Wingo CS & Cain BD (2011) Endothelin-1 gene regulation. *FASEB J* **25**: 16-28
357. Lee ME, Dhady MS, Temizer DH, Clifford JA, Yoshizumi M & Quertermous T (1991) Regulation of endothelin-1 gene expression by Fos and Jun. *J. Biol. Chem* **266**: 19034-19039
358. Simonson MS, Jones JM & Dunn MJ (1992) Differential regulation of fos and jun gene expression and AP-1 cis-element activity by endothelin isopeptides. Possible implications for mitogenic signaling by endothelin. *J. Biol. Chem* **267**: 8643-8649
359. Yamashita K, Discher DJ, Hu J, Bishopric NH & Webster KA (2001) Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. *J. Biol. Chem* **276**: 12645-12653
360. Morawietz H, Talanow R, Szibor M, Rueckschloss U, Schubert A, Bartling B, Darmer D & Holtz J (2000) Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *J Physiol* **525**: 761-770
361. Martin ER, Brenner BM & Ballermann BJ (1990) Heterogeneity of cell surface endothelin receptors. *Journal of Biological Chemistry* **265**: 14044 -14049
362. Ivey ME, Osman N & Little PJ (2008) Endothelin-1 signalling in vascular smooth muscle: pathways controlling cellular functions associated with atherosclerosis. *Atherosclerosis* **199**: 237-247
363. Chansel D, Ciroidi M, Vandermeersch S, Jackson LF, Gomez A-M, Henrion D, Lee DC, Coffman TM, Richard S, Dussaule J-C & Tharaux P-L (2006) Heparin binding EGF is necessary for vasospastic response to endothelin. *The FASEB Journal* **20**: 1936 -1938
364. Shah BH, Baukal AJ, Chen H-D, Shah AB & Catt KJ (2006) Mechanisms of endothelin-1-induced MAP kinase activation in adrenal glomerulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **102**: 79-88
365. Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO & Panza JA (2000) Interactions Between Nitric Oxide and Endothelin in the Regulation of Vascular Tone of Human Resistance Vessels In Vivo. *Hypertension* **35**: 1237 -1241
366. Liu S, Premont RT, Kontos CD, Huang J & Rockey DC (2003) Endothelin-1 activates endothelial cell nitric-oxide synthase via heterotrimeric G-protein betagamma subunit signaling to protein kinase B/Akt. *J. Biol. Chem* **278**: 49929-49935
367. Dong F, Zhang X, Wold LE, Ren Q, Zhang Z & Ren J (2005) Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1. *British Journal of Pharmacology* **145**: 323-333
368. Daher Z, Noël J & Claing A (2008) Endothelin-1 promotes migration of endothelial cells through the activation of ARF6 and the regulation of FAK activity. *Cell. Signal* **20**: 2256-2265
369. Khimji A-K & Rockey DC (2010) Endothelin--biology and disease. *Cell. Signal* **22**: 1615-1625
370. Shah R (2007) Endothelins in health and disease. *Eur. J. Intern. Med* **18**: 272-282
371. Kedzierski RM & Yanagisawa M (2001) Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **41**: 851-876
372. Yanagisawa H, Yanagisawa M, Kapur RP, Richardson JA, Williams SC, Clouthier DE, de Wit D, Emoto N & Hammer RE (1998) Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development* **125**: 825 -836
373. Yanagisawa H, Hammer RE, Richardson JA, Emoto N, Williams SC, Takeda S-ichi, Clouthier DE & Yanagisawa M (2000) Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *J. Clin. Invest.* **105**: 1373-1382
374. Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE & Yanagisawa M (1994) Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* **79**: 1277-1285
375. Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A & Yanagisawa M (1994) Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* **79**: 1267-1276
376. Edery P, Attié T, Amiel J, Pelet A, Eng C, Hofstra RM, Martelli H, Bidaud C, Munnich A & Lyonnet S (1996) Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat. Genet* **12**: 442-444
377. Amiel J, Attié T, Jan D, Pelet A, Edery P, Bidaud C, Lacombe D, Tam P, Simeoni J, Flori E, Nihoul-Fékété C, Munnich A & Lyonnet S (1996) Heterozygous Endothelin Receptor B (EDNRB) Mutations in Isolated Hirschsprung Disease. *Human Molecular Genetics* **5**: 355 -357

378. Szmítko PE, Wang C-H, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ & Verma S (2003) New Markers of Inflammation and Endothelial Cell Activation. *Circulation* **108**: 1917-1923
379. Howard PG, Plumpton C & Davenport AP (1992) Anatomical localization and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue. *J. Hypertens* **10**: 1379-1386
380. Lipa JE, Neligan PC, Perreault TM, Baribeau J, Levine RH, Knowlton RJ & Pang CY (1999) Vasoconstrictor effect of endothelin-1 in human skin: role of ETA and ETB receptors. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **276**: H359-H367
381. Masaki T (1995) Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **35**: 235-255
382. D'Orléans-Juste P, Labonté J, Bkaily G, Choufani S, Plante M & Honoré JC (2002) Function of the endothelin (B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pharmacol. Ther* **95**: 221-238
383. Schneider MP, Boesen EI & Pollock DM (2007) Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **47**: 731-759
384. Amiri F, Virdis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah NG, Touyz RM, Reudelhuber TL & Schiffrin EL (2004) Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation* **110**: 2233-2240
385. Shi-Wen X, Chen Y, Denton CP, Eastwood M, Renzoni EA, Bou-Gharios G, Pearson JD, Dashwood M, du Bois RM, Black CM, Leask A & Abraham DJ (2004) Endothelin-1 Promotes Myofibroblast Induction through the ETA Receptor via a rac/Phosphoinositide 3-Kinase/Akt-dependent Pathway and Is Essential for the Enhanced Contractile Phenotype of Fibrotic Fibroblasts. *Mol Biol Cell* **15**: 2707-2719
386. Achmad TH & Rao GS (1992) Chemotaxis of human blood monocytes toward endothelin-1 and the influence of calcium channel blockers. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **189**: 994-1000
387. McCarron RM, Wang L, Stanimirovic DB & Spatz M (1993) Endothelin induction of adhesion molecule expression on human brain microvascular endothelial cells. *Neurosci. Lett* **156**: 31-34
388. Goddard J & Webb DJ (2000) Plasma endothelin concentrations in hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol* **35**: S25-31
389. Schiffrin EL (2005) Vascular endothelin in hypertension. *Vascul. Pharmacol* **43**: 19-29
390. Lüscher TF & Barton M (2000) Endothelins and Endothelin Receptor Antagonists : Therapeutic Considerations for a Novel Class of Cardiovascular Drugs. *Circulation* **102**: 2434-2440
391. Cardillo C, Kilcoyne CM, Waclawiw M, Cannon RO & Panza JA (1999) Role of Endothelin in the Increased Vascular Tone of Patients With Essential Hypertension. *Hypertension* **33**: 753-758
392. Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M & Charlon V (1998) The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators. *N. Engl. J. Med* **338**: 784-790
393. Black HR, Bakris GL, Weber MA, Weiss R, Shahawy ME, Marple R, Tannoury G, Linas S, Wiens BL, Linselman JV, Roden R & Gerber MJ (2007) Efficacy and safety of darusentan in patients with resistant hypertension: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled dose-ranging study. *J Clin Hypertens (Greenwich)* **9**: 760-769
394. Galié N, Manes A & Branzi A (2004) The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc. Res* **61**: 227-237
395. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP & Stewart DJ (1993) Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med* **328**: 1732-1739
396. Bauer M, Wilkens H, Langer F, Schneider SO, Lausberg H & Schäfers H-J (2002) Selective Upregulation of Endothelin B Receptor Gene Expression in Severe Pulmonary Hypertension. *Circulation* **105**: 1034-1036
397. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M & Simonneau G (2002) Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med* **346**: 896-903
398. Ihling C, Szombathy T, Bohrmann B, Brockhaus M, Schaefer HE & Loeffler BM (2001) Coexpression of Endothelin-Converting Enzyme-1 and Endothelin-1 in Different Stages of Human Atherosclerosis. *Circulation* **104**: 864-869
399. Barton M, Haudenschild CC, d'Uscio LV, Shaw S, Münter K & Lüscher TF (1998) Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14367-14372

400. Dagassan PH, Breu V, Clozel M, Künzli A, Vogt P, Turina M, Kiowski W & Clozel JP (1996) Up-regulation of endothelin-B receptors in atherosclerotic human coronary arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol* **27**: 147-153
401. Boulanger C, Tanner F, Bea M, Hahn A, Werner A & Luscher T (1992) Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circulation Research* **70**: 1191-1197
402. Martin-Nizard F, Houssaini HS, Lestavel-Delattre S, Duriez P & Fruchart JC (1991) Modified low density lipoproteins activate human macrophages to secrete immunoreactive endothelin. *FEBS Lett* **293**: 127-130
403. Haug C, Schmid-Kotsas A, Zorn U, Schuett S, Gross HJ, Gruenert A & Bachem MG (2001) Endothelin-1 synthesis and endothelin B receptor expression in human coronary artery smooth muscle cells and monocyte-derived macrophages is up-regulated by low density lipoproteins. *J. Mol. Cell. Cardiol* **33**: 1701-1712
404. Miyauchi T, Yanagisawa M, Tomizawa T, Sugishita Y, Suzuki N, Fujino M, Ajisaka R, Goto K & Masaki T (1989) Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet* **2**: 53-54
405. Ziv I, Fleminger G, Djaldetti R, Achiron A, Melamed E & Sokolovsky M (1992) Increased plasma endothelin-1 in acute ischemic stroke. *Stroke* **23**: 1014-1016
406. Omland T, Lie RT, Aakvaag A, Aarsland T & Dickstein K (1994) Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction. *Circulation* **89**: 1573-1579
407. Gupta YK, Briyal S, Sharma U, Jagannathan NR & Gulati A (2005) Effect of endothelin antagonist (TAK-044) on cerebral ischemic volume, oxidative stress markers and neurobehavioral parameters in the middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci* **77**: 15-27
408. Vitola JV, Forman MB, Holsinger JP, Kawana M, Atkinson JB, Quertermous T, Jackson EK & Murray JJ (1996) Role of endothelin in a rabbit model of acute myocardial infarction: effects of receptor antagonists. *J. Cardiovasc. Pharmacol* **28**: 774-783
409. Takahashi K, Ghatei MA, Lam HC, O'Halloran DJ & Bloom SR (1990) Elevated plasma endothelin in patients with diabetes mellitus. *Diabetologia* **33**: 306-310
410. Ak G, Buyukberber S, Sevinc A, Turk HM, Ates M, Sari R, Savli H & Cigli A (2001) The relation between plasma endothelin-1 levels and metabolic control, risk factors, treatment modalities, and diabetic microangiopathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications* **15**: 150-157
411. Settergren M, Pernow J, Brismar K, Jörneskog G & Kalani M (2008) Endothelin-A receptor blockade increases nutritive skin capillary circulation in patients with type 2 diabetes and microangiopathy. *J. Vasc. Res* **45**: 295-302
412. Kalani M, Pernow J, Bragd J & Jörneskog G (2008) Improved Peripheral Perfusion During Endothelin-A Receptor Blockade in Patients With Type 2 Diabetes and Critical Limb Ischemia. *Diabetes Care* **31**: e56-e56
413. Russell FD & Molenaar P (2000) The human heart endothelin system: ET-1 synthesis, storage, release and effect. *Trends Pharmacol. Sci* **21**: 353-359
414. MacCarthy PA, Grocott-Mason R, Prendergast BD & Shah AM (2000) Contrasting Inotropic Effects of Endogenous Endothelin in the Normal and Failing Human Heart : Studies With an Intracoronary ETA Receptor Antagonist. *Circulation* **101**: 142-147
415. Wei C, Lerman A, Rodeheffer R, McGregor C, Brandt R, Wright S, Heublein D, Kao P, Edwards W & Burnett J (1994) Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation* **89**: 1580-1586
416. Zolk O, Quatteck J, Sitzler G, Schrader T, Nickenig G, Schnabel P, Shimada K, Takahashi M & Böhm M (1999) Expression of Endothelin-1, Endothelin-Converting Enzyme, and Endothelin Receptors in Chronic Heart Failure. *Circulation* **99**: 2118-2123
417. Pousset F, Isnard R, Lechat P, Kalotka H, Carayon A, Maistre G, Escolano S, Thomas D & Komajda M (1997) Prognostic value of plasma endothelin-1 in patients with chronic heart failure. *European Heart Journal* **18**: 254-258
418. Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Maemura K, Kurihara H, Aikawa R, Takano H & Yazaki Y (1996) Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J. Biol. Chem* **271**: 3221-3228
419. Anand I, McMurray J, Cohn JN, Konstam MA, Notter T, Quitzau K, Ruschitzka F & Lüscher TF (2004) Long-term effects of darusentan on left-ventricular remodelling and clinical outcomes in the EndothelinA Receptor Antagonist Trial in Heart Failure (EARTH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet* **364**: 347-354

420. Boscoe MJ, Goodwin AT, Amrani M & Yacoub MH (2000) Endothelins and the lung. *Int. J. Biochem. Cell Biol* **32**: 41-62
421. Abraham DJ, Vancheeswaran R, Dashwood MR, Rajkumar VS, Pantelides P, Xu SW, du Bois RM & Black CM (1997) Increased levels of endothelin-1 and differential endothelin type A and B receptor expression in scleroderma-associated fibrotic lung disease. *Am J Pathol* **151**: 831-841
422. Sofia M, Mormile M, Faraone S, Alifano M, Zofra S, Romano L & Carratù L (1993) Increased Endothelin-Like Immunoreactive Material on Bronchoalveolar Lavage Fluid from Patients with Bronchial Asthma and Patients with Interstitial Lung Disease. *Respiration* **60**: 89-95
423. Fagan KA, McMurtry IF & Rodman DM (2001) Role of endothelin-1 in lung disease. *Respir Res* **2**: 90-101
424. Karet FE, Kuc RE & Davenport AP (1993) Novel ligands BQ123 and BQ3020 characterize endothelin receptor subtypes ETA and ETB in human kidney. *Kidney Int* **44**: 36-42
425. Kohan DE (1996) Endothelins: renal tubule synthesis and actions. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* **23**: 337-344
426. Goddard J, Johnston NR, Hand MF, Cumming AD, Rabelink TJ, Rankin AJ & Webb DJ (2004) Endothelin-A receptor antagonism reduces blood pressure and increases renal blood flow in hypertensive patients with chronic renal failure: a comparison of selective and combined endothelin receptor blockade. *Circulation* **109**: 1186-1193
427. Forbes JM, Jandeleit-Dahm K, Allen TJ, Hewitson TD, Becker GJ & Jones CL (2001) Endothelin and Endothelin A/B Receptors Are Increased after Ischaemic Acute Renal Failure. *Nephron Experimental Nephrology* **9**: 309-316
428. Ortmann J, Amann K, Brandes RP, Kretzler M, Münter K, Parekh N, Traupe T, Lange M, Lattmann T & Barton M (2004) Role of Podocytes for Reversal of Glomerulosclerosis and Proteinuria in the Aging Kidney After Endothelin Inhibition. *Hypertension* **44**: 974-981
429. Ko C, Gieske MC, Al-Alem L, Hahn Y, Su W, Gong MC, Iglarz M & Koo Y (2006) Endothelin-2 in ovarian follicle rupture. *Endocrinology* **147**: 1770-1779
430. Peri A, Fantoni G, Granchi S, Vannelli GB, Barni T, Amerini S, Pupilli C, Barbagli G, Serio M, Maggi M & Forti G (1998) Endothelin-1 is synthesized and biologically active in human epididymis via a paracrine mode of action. *Steroids* **63**: 294-298
431. Dashwood MR & Loesch A (2009) Endothelin-1 as a neuropeptide: neurotransmitter or neurovascular effects? *J. Cell Commun. Signal.* **4**: 51-62
432. Tatrai A, Foster S, Lakatos P, Shankar G & Stern PH (1992) Endothelin-1 actions on resorption, collagen and noncollagen protein synthesis, and phosphatidylinositol turnover in bone organ cultures. *Endocrinology* **131**: 603-607
433. Imokawa G, Miyagishi M & Yada Y (1995) Endothelin-1 as a new melanogen: coordinated expression of its gene and the tyrosinase gene in UVB-exposed human epidermis. *J. Invest. Dermatol* **105**: 32-37
434. Eriksson A (2010) The effects of endothelin-1 in human adipose tissue. Available at: <http://publications.ki.se/jspui/handle/10616/40203>
435. Clozel M & Salloukh H (2005) Role of endothelin in fibrosis and anti-fibrotic potential of bosentan. *Ann. Med* **37**: 2-12
436. Kusuhara M, Yamaguchi K, Nagasaki K, Hayashi C, Suzaki A, Hori S, Handa S, Nakamura Y & Abe K (1990) Production of endothelin in human cancer cell lines. *Cancer Res* **50**: 3257-3261
437. Nelson JB, Lee WH, Nguyen SH, Jarrard DF, Brooks JD, Magnuson SR, Oppenorth TJ, Nelson WG & Bova GS (1997) Methylation of the 5' CpG island of the endothelin B receptor gene is common in human prostate cancer. *Cancer Res* **57**: 35-37
438. Gohji K, Kitazawa S, Tamada H, Katsuoka Y & Nakajima M (2001) Expression of endothelin receptor a associated with prostate cancer progression. *J. Urol* **165**: 1033-1036
439. Lo K-W, Tsang Y-S, Kwong J, To K-F, Teo PML & Huang DP (2002) Promoter hypermethylation of the EDNRB gene in nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer* **98**: 651-655
440. Mai H-Q, Zeng Z-Y, Zhang H-Z, Hou J-H, Mo H-Y, Guo X, Min H-Q & Hong M-H (2005) [Correlation of endothelin A receptor expression to prognosis of nasopharyngeal carcinoma]. *Ai Zheng* **24**: 611-615
441. Papandreou CN, Usmani B, Geng Y, Bogenrieder T, Freeman R, Wilk S, Finstad CL, Reuter VE, Powell CT, Scheinberg D, Magill C, Scher HI, Albino AP & Nanus DM (1998) Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nat. Med* **4**: 50-57
442. Bagnato A, Salani D, Di Castro V, Wu-Wong JR, Tecce R, Nicotra MR, Venuti A & Natali PG (1999) Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role in tumor growth. *Cancer Res* **59**: 720-727

443. Elahi MM & Everson NW (2004) Prognosis of colorectal cancer patients with elevated endothelin-1 concentrations. *Asian J Surg* **27**: 4-9
444. Pickering V, Jordan RCK & Schmidt BL (2007) Elevated salivary endothelin levels in oral cancer patients--a pilot study. *Oral Oncol* **43**: 37-41
445. Nelson JB, Hedican SP, George DJ, Reddi AH, Piantadosi S, Eisenberger MA & Simons JW (1995) Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat. Med* **1**: 944-949
446. Said N, Smith S, Sanchez-Carbayo M & Theodorescu D (2011) Tumor endothelin-1 enhances metastatic colonization of the lung in mouse xenograft models of bladder cancer. *J Clin Invest* **121**: 132-147
447. Demunter A, De Wolf-Peeters C, Degreef H, Stas M & van den Oord JJ (2001) Expression of the endothelin-B receptor in pigment cell lesions of the skin. Evidence for its role as tumor progression marker in malignant melanoma. *Virchows Arch* **438**: 485-491
448. Bagnato A, Rosanò L, Di Castro V, Albini A, Salani D, Varmi M, Nicotra MR & Natali PG (2001) Endothelin Receptor Blockade Inhibits Proliferation of Kaposi's Sarcoma Cells. *Am J Pathol* **158**: 841-847
449. Alanen K, Deng DX & Chakrabarti S (2000) Augmented expression of endothelin-1, endothelin-3 and the endothelin-B receptor in breast carcinoma. *Histopathology* **36**: 161-167
450. Eltze E, Bertolin M, Korsching E, Wülfing P, Maggino T & Lellé R (2007) Expression and prognostic relevance of endothelin-B receptor in vulvar cancer. *Oncol. Rep* **18**: 305-311
451. Anguelova E, Beuvon F, Leonard N, Chaverot N, Varlet P, Couraud P-O, Dumas-Duport C & Cazaubon S (2005) Functional endothelin ET B receptors are selectively expressed in human oligodendrogliomas. *Brain Res. Mol. Brain Res* **137**: 77-88
452. Buckanovich RJ, Facciabene A, Kim S, Benencia F, Sasaroli D, Balint K, Katsaros D, O'Brien-Jenkins A, Gimotty PA & Coukos G (2008) Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. *Nat. Med* **14**: 28-36
453. Egidy G, Juillerat-Jeanneret L, Jeannin J-F, Korth P, Bosman FT & Pinet F (2000b) Modulation of Human Colon Tumor-Stromal Interactions by the Endothelin System. *Am J Pathol* **157**: 1863-1874
454. Wülfing P, Kersting C, Tio J, Fischer R-J, Wülfing C, Poremba C, Diallo R, Böcker W & Kiesel L (2004b) Endothelin-1-, endothelin-A-, and endothelin-B-receptor expression is correlated with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in breast cancer. *Clin. Cancer Res* **10**: 2393-2400
455. Egidy G, Baviera E, Ciuffo G, Corvol P & Pinet F (2001) Localization of the endothelin system in aldosterone-producing adenomas. *Hypertension* **38**: 1137-1142
456. Oishi S, Sasaki M & Sato T (1994) Elevated immunoreactive endothelin levels in patients with pheochromocytoma. *Am. J. Hypertens* **7**: 717-722
457. Donckier JE, Michel L, Van Beneden R, Delos M & Havaux X (2003) Increased expression of endothelin-1 and its mitogenic receptor ETA in human papillary thyroid carcinoma. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **59**: 354-360
458. Kar S, Yousem SA & Carr BI (1995) Endothelin-1 expression by human hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **216**: 514-519
459. Sun DJ, Liu Y, Lu DC, Kim W, Lee JH, Maynard J & Deisseroth A (2007) Endothelin-3 growth factor levels decreased in cervical cancer compared with normal cervical epithelial cells. *Hum. Pathol* **38**: 1047-1056
460. Breuiller-Fouché M, Vacher-Lavenu MC, Fournier T, Morice P, Dubuisson JB & Ferré F (1997) EndothelinA receptors in human uterine leiomyomas. *Obstet Gynecol* **90**: 727-730
461. Suzuki T, Kikkawa F, Ino K, Nagasaka T, Tamakoshi K & Mizutani S (2001) Imbalance between neutral endopeptidase 24.11 and endothelin-1 expression in human endometrial carcinoma. *Oncology* **60**: 258-267
462. Ishibashi Y, Hanyu N, Nakada K, Suzuki Y, Yamamoto T, Takahashi T, Kawasaki N, Kawakami M, Matsushima M & Urashima M (2003) Endothelin protein expression as a significant prognostic factor in oesophageal squamous cell carcinoma. *Eur. J. Cancer* **39**: 1409-1415
463. Zhao B-J, Sun D-G, Zhang M, Tan S-N & Ma X (2009) Identification of aberrant promoter methylation of EDNRB gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis. Esophagus* **22**: 55-61
464. Egidy G, Eberl LP, Valdenaire O, Irmeler M, Majdi R, Diserens AC, Fontana A, Janzer RC, Pinet F & Juillerat-Jeanneret L (2000a) The endothelin system in human glioblastoma. *Lab. Invest* **80**: 1681-1689
465. Naidoo V, Naidoo S, Mahabeer R & Raidoo DM (2005) Localization of the endothelin system in human diffuse astrocytomas. *Cancer* **104**: 1049-1057

466. Hoshi N, Sugino T & Suzuki T (2009) Expression of endothelin system in neuroblastic tumors: close association of endothelin-1 and endothelin B receptor expression with differentiation of tumor cells. *Med Mol Morphol* **42**: 110-117
467. Wülfing P, Tio J, Kersting C, Sonntag B, Buerger H, Wülfing C, Euler U, Boecker W, Tulusan AH & Kiesel L (2004a) Expression of Endothelin-A-Receptor predicts unfavourable response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Br J Cancer* **91**: 434-440
468. Wiesmann F, Veeck J, Galm O, Hartmann A, Esteller M, Knüchel R & Dahl E (2009) Frequent loss of endothelin-3 (EDN3) expression due to epigenetic inactivation in human breast cancer. *Breast Cancer Res* **11**: R34-R34
469. Pagotto U, Arzberger T, Hopfner U, Sauer J, Renner U, Newton CJ, Lange M, Uhl E, Weindl A & Stalla GK (1995) Expression and localization of endothelin-1 and endothelin receptors in human meningiomas. Evidence for a role in tumoral growth. *J Clin Invest* **96**: 2017-2025
470. Boldrini L, Pistolesi S, Gisfredi S, Ursino S, Ali G, Pieracci N, Basolo F, Parenti G & Fontanini G (2006) Expression of endothelin 1 and its angiogenic role in meningiomas. *Virchows Arch* **449**: 546-553
471. Herrmann E, Eltze E, Bierer S, Bogemann M, Brinkmann OA, Balnowair H, Hertle L & Wulfing C (2007) Expression of the Endothelin-axis in the different histologic subtypes of renal cell carcinoma: a tissue microarray analysis. *Oncol. Rep* **17**: 275-280
472. Carpagnano GE, Foschino-Barbaro MP, Resta O, Gramiccioni E & Carpagnano F (2004) Endothelin-1 is increased in the breath condensate of patients with non-small-cell lung cancer. *Oncology* **66**: 180-184
473. Ahmed SI, Thompson J, Coulson JM & Woll PJ (2000) Studies on the expression of endothelin, its receptor subtypes, and converting enzymes in lung cancer and in human bronchial epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* **22**: 422-431
474. Blouquit-Laye S, Regnier A, Beauchet A, Zimmermann U, Devillier P & Chinet T (2010) Expression of endothelin receptor subtypes in bronchial tumors. *Oncol. Rep* **23**: 457-463
475. Medinger M, Adler CP, Schmidt-Gersbach C, Soltau J, Droll A, Unger C & Dreves J (2003) Angiogenesis and the ET-1/ETA receptor system: immunohistochemical expression analysis in bone metastases from patients with different primary tumors. *Angiogenesis* **6**: 225-231
476. Felx M, Guyot M-C, Isler M, Turcotte RE, Doyon J, Khatib A-M, Leclerc S, Moreau A & Moldovan F (2006) Endothelin-1 (ET-1) promotes MMP-2 and MMP-9 induction involving the transcription factor NF-kappaB in human osteosarcoma. *Clin. Sci* **110**: 645-654
477. Salani D, Di Castro V, Nicotra MR, Rosanò L, Tecce R, Venuti A, Natali PG & Bagnato A (2000b) Role of Endothelin-1 in Neovascularization of Ovarian Carcinoma. *Am J Pathol* **157**: 1537-1547
478. Palladini A, Astolfi A, Croci S, De Giovanni C, Nicoletti G, Rosolen A, Sartori F, Lollini P-L, Landuzzi L & Nanni P (2006) Endothelin-3 production by human rhabdomyosarcoma: a possible new marker with a paracrine role. *Eur. J. Cancer* **42**: 680-687
479. Oikawa T, Kushuhara M, Ishikawa S, Hitomi J, Kono A, Iwanaga T & Yamaguchi K (1994) Production of endothelin-1 and thrombomodulin by human pancreatic cancer cells. *Br J Cancer* **69**: 1059-1064
480. Hsu Y-H & Huang S-C (2003) Immunohistochemical localization of endothelin-converting enzyme-1 in neuroendocrine tumors and normal human tissue. *Kaohsiung J. Med. Sci* **19**: 555-562
481. Fukui R, Nishimori H, Hata F, Yasoshima T, Ohno K, Yanai Y, Kamiguchi K, Denno R, Sato N & Hirata K (2007) Inhibitory effect of endothelin A receptor blockade on tumor growth and liver metastasis of a human gastric cancer cell line. *Gastric Cancer* **10**: 123-128
482. Rauh A, Windischhofer W, Kovacevic A, DeVaney T, Huber E, Semlitsch M, Leis H-J, Sattler W & Malle E (2008) Endothelin (ET)-1 and ET-3 promote expression of c-fos and c-jun in human choriocarcinoma via ETB receptor-mediated Gi- and Gq-pathways and MAP kinase activation. *Br J Pharmacol* **154**: 13-24
483. Bagnato A, Spinella F & Rosanò L (2008) The endothelin axis in cancer: the promise and the challenges of molecularly targeted therapy. *Can. J. Physiol. Pharmacol* **86**: 473-484
484. Bagnato A, Tecce R, Moretti C, Di Castro V, Spergel D & Catt KJ (1995) Autocrine actions of endothelin-1 as a growth factor in human ovarian carcinoma cells. *Clin. Cancer Res* **1**: 1059-1066
485. Bagnato A, Tecce R, Di Castro V & Catt KJ (1997) Activation of mitogenic signaling by endothelin 1 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* **57**: 1306-1311
486. Grant K, Knowles J, Dawas K, Burnstock G, Taylor I & Loizidou M (2007) Mechanisms of endothelin 1-stimulated proliferation in colorectal cancer cell lines. *Br J Surg* **94**: 106-112

487. Vacca F, Bagnato A, Catt KJ & Tecce R (2000) Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signaling in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* **60**: 5310-5317
488. Almendro V, García-Recio S & Gascón P (2010) Tyrosine kinase receptor transactivation associated to G protein-coupled receptors. *Curr Drug Targets* **11**: 1169-1180
489. Nelson JB, Chan-Tack K, Hedican SP, Magnuson SR, Opgenorth TJ, Steven Bova G & Simons JW (1996) Endothelin-1 Production and Decreased Endothelin B Receptor Expression in Advanced Prostate Cancer. *Cancer Research* **56**: 663 -668
490. Nelson JB, Udan MS, Guruli G & Pflug BR (2005) Endothelin-1 inhibits apoptosis in prostate cancer. *Neoplasia* **7**: 631-637
491. Del Bufalo D, Di Castro V, Biroccio A, Salani D, Rosanò L, Spinella F & Bagnato A (2002a) Endothelin-1 acts as a survival factor in ovarian carcinoma cells. *Clin. Sci* **103 Suppl 48**: 302S-305S
492. Del Bufalo D, Di Castro V, Biroccio A, Varmi M, Salani D, Rosanò L, Trisciuglio D, Spinella F & Bagnato A (2002b) Endothelin-1 protects ovarian carcinoma cells against paclitaxel-induced apoptosis: requirement for Akt activation. *Mol. Pharmacol* **61**: 524-532
493. Raymond M-N, Bole-Feysot C, Banno Y, Tanfin Z & Robin P (2006) Endothelin-1 inhibits apoptosis through a sphingosine kinase 1-dependent mechanism in uterine leiomyoma ELT3 cells. *Endocrinology* **147**: 5873-5882
494. Cianfrocca R, Rosanò L, Spinella F, Di Castro V, Natali PG & Bagnato A (2010) Beta-arrestin-1 mediates the endothelin-1-induced activation of Akt and integrin-linked kinase. *Can. J. Physiol. Pharmacol* **88**: 796-801
495. Kamrava M, Simpkins F, Alejandro E, Michener C, Meltzer E & Kohn EC (2005) Lysophosphatidic acid and endothelin-induced proliferation of ovarian cancer cell lines is mitigated by neutralization of granulins-epithelin precursor (GEP), a prosurvival factor for ovarian cancer. *Oncogene* **24**: 7084-7093
496. Grimshaw MJ, Naylor S & Balkwill FR (2002a) Endothelin-2 is a hypoxia-induced autocrine survival factor for breast tumor cells. *Mol. Cancer Ther* **1**: 1273-1281
497. Hanahan D & Weinberg R (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**: 646-674
498. Yildirim Y, Gunel N, Coskun U, Sancak B, Bukan N, Aslan S & Cetin A (2008) Serum big endothelin-1 levels in female patients with breast cancer. *Int. Immunopharmacol* **8**: 1119-1123
499. Rosanò L, Varmi M, Salani D, Di Castro V, Spinella F, Natali PG & Bagnato A (2001) Endothelin-1 induces tumor proteinase activation and invasiveness of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* **61**: 8340-8346
500. Felx M, Shipkolye F, Isler M, Doyon J, Moreau A & Moldovan F (2004) Endothelin-1 induces extracellular matrix degradation via matrix metalloproteinases induction in human osteosarcoma cells. *Arthritis Res Ther* **6**: 49-49
501. Hagemann T, Binder C, Binder L, Pukrop T, Trümper L & Grimshaw MJ (2005) Expression of endothelins and their receptors promotes an invasive phenotype of breast tumor cells but is insufficient to induce invasion in benign cells. *DNA Cell Biol* **24**: 766-776
502. Grimshaw MJ, Wilson JL & Balkwill FR (2002b) Endothelin-2 is a macrophage chemoattractant: implications for macrophage distribution in tumors. *Eur. J. Immunol* **32**: 2393-2400
503. Grimshaw MJ, Hagemann T, Ayhan A, Gillett CE, Binder C & Balkwill FR (2004) A role for endothelin-2 and its receptors in breast tumor cell invasion. *Cancer Res* **64**: 2461-2468
504. Bagnato A, Rosanò L, Spinella F, Di Castro V, Tecce R & Natali PG (2004) Endothelin B Receptor Blockade Inhibits Dynamics of Cell Interactions and Communications in Melanoma Cell Progression. *Cancer Research* **64**: 1436 -1443
505. Rosanò L, Spinella F, Di Castro V, Dedhar S, Nicotra MR, Natali PG & Bagnato A (2006) Integrin-linked kinase functions as a downstream mediator of endothelin-1 to promote invasive behavior in ovarian carcinoma. *Mol. Cancer Ther* **5**: 833-842
506. Rosanò L, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Dedhar S, de Herreros AG, Natali PG & Bagnato A (2005) Endothelin-1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in human ovarian cancer cells. *Cancer Res* **65**: 11649-11657
507. Mangahas CR, dela Cruz GV, Schneider RJ & Jamal S (2004) Endothelin-1 upregulates MCAM in melanocytes. *J. Invest. Dermatol* **123**: 1135-1139
508. Rosanò L, Cianfrocca R, Masi S, Spinella F, Di Castro V, Biroccio A, Salvati E, Nicotra MR, Natali PG & Bagnato A (2009) Beta-arrestin links endothelin A receptor to beta-catenin signaling to induce ovarian cancer cell invasion and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **106**: 2806-2811

509. Rosanò L, Cianfrocca R, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Lucidi A, Ferrandina G, Natali PG & Bagnato A (2011) Acquisition of chemoresistance and EMT phenotype is linked with activation of the endothelin A receptor pathway in ovarian carcinoma cells. *Clin. Cancer Res* **17**: 2350-2360
510. Spinella F, Rosanò L, Di Castro V, Decandia S, Nicotra MR, Natali PG & Bagnato A (2007) Endothelin-1 and endothelin-3 promote invasive behavior via hypoxia-inducible factor-1alpha in human melanoma cells. *Cancer Res* **67**: 1725-1734
511. Spinella F, Rosanò L, Di Castro V, Natali PG & Bagnato A (2004) Endothelin-1-induced prostaglandin E2-EP2, EP4 signaling regulates vascular endothelial growth factor production and ovarian carcinoma cell invasion. *J. Biol. Chem* **279**: 46700-46705
512. Spinella F, Rosanò L, Di Castro V, Natali PG & Bagnato A (2002) Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1alpha in ovarian carcinoma cells. *J. Biol. Chem* **277**: 27850-27855
513. Spinella F, Rosanò L, Del Duca M, Di Castro V, Nicotra MR, Natali PG & Bagnato A (2010) Endothelin-1 inhibits prolyl hydroxylase domain 2 to activate hypoxia-inducible factor-1alpha in melanoma cells. *PLoS ONE* **5**: e11241
514. Hendrix MJC, Seftor EA, Hess AR & Seftor REB (2003) Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat. Rev. Cancer* **3**: 411-421
515. Spinella F, Garrafa E, Di Castro V, Rosanò L, Nicotra MR, Caruso A, Natali PG & Bagnato A (2009) Endothelin-1 stimulates lymphatic endothelial cells and lymphatic vessels to grow and invade. *Cancer Res* **69**: 2669-2676
516. Salani D, Taraboletti G, Rosanò L, Di Castro V, Borsotti P, Giavazzi R & Bagnato A (2000a) Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am. J. Pathol* **157**: 1703-1711
517. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ & Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol* **3**: 991-998
518. Ruetten H & Thiemermann C (1997) Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. *J. Physiol. Pharmacol* **48**: 675-688
519. Binder C, Hagemann T, Sperling S, Schulz M, Pukrop T, Grimshaw MJ & Ehrenreich H (2009) Stromal endothelin B receptor-deficiency inhibits breast cancer growth and metastasis. *Mol Cancer Ther* **8**: 2452-2460
520. Yin JJ, Mohammad KS, Käkönen SM, Harris S, Wu-Wong JR, Wessale JL, Padley RJ, Garrett IR, Chirgwin JM & Guise TA (2003) A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10954-10959
521. Nelson JB, Nabulsi AA, Vogelzang NJ, Breul J, Zonnenberg BA, Daliani DD, Schulman CC & Carducci MA (2003) Suppression of prostate cancer induced bone remodeling by the endothelin receptor A antagonist atrasentan. *J. Urol* **169**: 1143-1149
522. Nelson JB, Nguyen SH, Wu-Wong JR, Ogenorth TJ, Dixon DB, Chung LW & Inoue N (1999) New bone formation in an osteoblastic tumor model is increased by endothelin-1 overexpression and decreased by endothelin A receptor blockade. *Urology* **53**: 1063-1069
523. Wilson JL, Burchell J & Grimshaw MJ (2006) Endothelins induce CCR7 expression by breast tumor cells via endothelin receptor A and hypoxia-inducible factor-1. *Cancer Res* **66**: 11802-11807
524. Asham E, Shankar A, Loizidou M, Fredericks S, Miller K, Boulos PB, Burnstock G & Taylor I (2001) Increased endothelin-1 in colorectal cancer and reduction of tumour growth by ET(A) receptor antagonism. *Br. J. Cancer* **85**: 1759-1763
525. Peters CM, Lindsay TH, Pomonis JD, Luger NM, Ghilardi JR, Sevcik MA & Mantyh PW (2004) Endothelin and the tumorigenic component of bone cancer pain. *Neuroscience* **126**: 1043-1052
526. Carducci MA, Nelson JB, Bowling MK, Rogers T, Eisenberger MA, Sinibaldi V, Donehower R, Leahy TL, Carr RA, Isaacson JD, Janus TJ, Andre A, Hosmane BS & Padley RJ (2002) Atrasentan, an endothelin-receptor antagonist for refractory adenocarcinomas: safety and pharmacokinetics. *J. Clin. Oncol* **20**: 2171-2180
527. Quang PN & Schmidt BL (2010b) Endothelin-A receptor antagonism attenuates carcinoma-induced pain through opioids in mice. *J Pain* **11**: 663-671
528. Quang PN & Schmidt BL (2010a) Peripheral endothelin B receptor agonist-induced antinociception involves endogenous opioids in mice. *Pain* **149**: 254-262
529. Palmer MJ (2009) Endothelin receptor antagonists: status and learning 20 years on. *Prog Med Chem* **47**: 203-237

530. Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy G, Thouard A, Barret A, Vranckx R, Tougard C & Michel JB (1999) A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *Eur. J. Biochem* **264**: 341-349
531. D'Orléans-Juste P, Plante M, Honoré JC, Carrier E & Labonté J (2003) Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can. J. Physiol. Pharmacol* **81**: 503-510
532. Ihara M, Noguchi K, Saeki T, Fukuroda T, Tsuchida S, Kimura S, Fukami T, Ishikawa K, Nishikibe M & Yano M (1992) Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci* **50**: 247-255
533. Ishikawa K, Ihara M, Noguchi K, Mase T, Mino N, Saeki T, Fukuroda T, Fukami T, Ozaki S & Nagase T (1994) Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 4892-4896
534. Takai M, Omemura I, Yamasaki K, Watakabe T, Fujitani Y, Oda K, Urade Y, Inui T, Yamamura T & Okada T (1992) A potent and specific agonist, Suc-[Glu<sup>9</sup>,Ala<sup>11,15</sup>]-endothelin-1(8-21), IRL 1620, for the ETB receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **184**: 953-959
535. Lahav R, Heffner G & Patterson PH (1999) An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11496-11500
536. Rosanò L, Spinella F, Salani D, Di Castro V, Venuti A, Nicotra MR, Natali PG & Bagnato A (2003) Therapeutic targeting of the endothelin A receptor in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* **63**: 2447-2453
537. Banerjee S, Hussain M, Wang Z, Saliganan A, Che M, Bonfil D, Cher M & Sarkar FH (2007) In vitro and in vivo molecular evidence for better therapeutic efficacy of ABT-627 and taxotere combination in prostate cancer. *Cancer Res* **67**: 3818-3826
538. Mai H-Q, Zeng Z-Y, Feng K-T, Ye Y-L, Zhang C-Q, Liang W-J, Guo X, Mo H-Y & Hong M-H (2006) Therapeutic targeting of the endothelin A receptor in human nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Sci* **97**: 1388-1395
539. Rosanò L, Di Castro V, Spinella F, Nicotra MR, Natali PG & Bagnato A (2007a) ZD4054, a specific antagonist of the endothelin A receptor, inhibits tumor growth and enhances paclitaxel activity in human ovarian carcinoma in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther* **6**: 2003-2011
540. Rosanò L, Spinella F, Di Castro V, Natali PG & Bagnato A (2004) Therapeutic targeting of the endothelin-A receptor in human ovarian carcinoma: efficacy of cytotoxic agents is markedly enhanced by co-administration with atrasentan. *J. Cardiovasc. Pharmacol* **44 Suppl 1**: S132-135
541. Rosanò L, Di Castro V, Spinella F, Tortora G, Nicotra MR, Natali PG & Bagnato A (2007b) Combined targeting of endothelin A receptor and epidermal growth factor receptor in ovarian cancer shows enhanced antitumor activity. *Cancer Res* **67**: 6351-6359
542. Akhavan A, McHugh KH, Guruli G, Bies RR, Zamboni WC, Strychor SA, Nelson JB & Pflug BR (2006) Endothelin receptor A blockade enhances taxane effects in prostate cancer. *Neoplasia* **8**: 725-732
543. Rosanò L, Cianfrocca R, Spinella F, Di Castro V, Natali PG & Bagnato A (2010) Combination therapy of zibotentan with cisplatin and paclitaxel is an effective regimen for epithelial ovarian cancer. *Can. J. Physiol. Pharmacol* **88**: 676-681
544. Fischgräbe J, Götte M, Michels K, Kiesel L & Wülfing P (2010) Targeting endothelin A receptor enhances anti-proliferative and anti-invasive effects of the HER2 antibody trastuzumab in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Int. J. Cancer* **127**: 696-706
545. Smollich M, Götte M, Fischgräbe J, Macedo LF, Brodie A, Chen S, Radke I, Kiesel L & Wülfing P (2010) ETAR antagonist ZD4054 exhibits additive effects with aromatase inhibitors and fulvestrant in breast cancer therapy, and improves in vivo efficacy of anastrozole. *Breast Cancer Res. Treat* **123**: 345-357
546. Berger Y, Bernasconi CC & Juillerat-Jeanneret L (2006) Targeting the endothelin axis in human melanoma: combination of endothelin receptor antagonism and alkylating agents. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **231**: 1111-1119
547. Bhargava S, Stummeyer T, Hotz B, Hines OJ, Reber HA, Buhr HJ & Hotz HG (2005) Selective inhibition of endothelin receptor A as an anti-angiogenic and anti-proliferative strategy for human pancreatic cancer. *J. Gastrointest. Surg* **9**: 703-709
548. Pfab T, Stoltenburg-Didinger G, Trautner C, Godes M, Bauer C & Hocher B (2004) The endothelin system in Morris hepatoma-7777: an endothelin receptor antagonist inhibits growth in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol* **141**: 215-222
549. Rai A & Gulati A (2003) Evidence for the involvement of ET(B) receptors in ET-1-induced changes in blood flow to the rat breast tumor. *Cancer Chemother. Pharmacol* **51**: 21-28

550. Rai A, Rajeshkumar NV, Shord S & Gulati A (2005) ET(B) receptor agonist, IRL 1620, does not affect paclitaxel plasma pharmacokinetics in breast tumour bearing rats. *J. Pharm. Pharmacol* **57**: 869-876
551. Rajeshkumar NV, Rai A & Gulati A (2005) Endothelin B receptor agonist, IRL 1620, enhances the anti-tumor efficacy of paclitaxel in breast tumor rats. *Breast Cancer Res. Treat* **94**: 237-247
552. Rajeshkumar NV, Matwysyn G & Gulati A (2007) IRL-1620, a tumor selective vasodilator, augments the uptake and efficacy of chemotherapeutic agents in prostate tumor rats. *Prostate* **67**: 701-713
553. Selting K, Kolli P, Henry C, Owen N, Wipke-Tevis D, Eisen M, Lenaz G & Reddy G (2008) Use of a novel endothelin-B agonist (SPI-1620) to alter blood flow to solid tumors for improved chemotherapy delivery in dogs with spontaneously-occurring tumors. *Proc Am Assoc Cancer Res* **49**: abst 365
554. Bell KM, Chaplin DJ, Poole BA, Prise VE & Tozer GM (1999) Modification of blood flow in the HSN tumour and normal tissues of the rat by the endothelin ET(B) receptor agonist, IRL 1620. *Int. J. Cancer* **80**: 295-302
555. Cemazar M, Wilson I, Prise VE, Bell KM, Hill SA & Tozer GM (2005) The endothelin B (ETB) receptor agonist IRL 1620 is highly vasoconstrictive in two syngeneic rat tumour lines: potential for selective tumour blood flow modification. *Br J Cancer* **93**: 98-106
556. Carducci MA, Padley RJ, Breul J, Vogelzang NJ, Zonnenberg BA, Daliani DD, Schulman CC, Nabulsi AA, Humerickhouse RA, Weinberg MA, Schmitt JL & Nelson JB (2003) Effect of endothelin-A receptor blockade with atrasentan on tumor progression in men with hormone-refractory prostate cancer: a randomized, phase II, placebo-controlled trial. *J. Clin. Oncol* **21**: 679-689
557. James ND, Caty A, Payne H, Borre M, Zonnenberg BA, Beuzeboc P, McIntosh S, Morris T, Phung D & Dawson NA (2010) Final safety and efficacy analysis of the specific endothelin A receptor antagonist zibotentan (ZD4054) in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer and bone metastases who were pain-free or mildly symptomatic for pain: a double-blind, placebo-controlled, randomized Phase II trial. *BJU Int* **106**: 966-973
558. Nelson JB, Love W, Chin JL, Saad F, Schulman CC, Sleep DJ, Qian J, Steinberg J & Carducci M (2008) Phase 3, Randomized Controlled Trial of Atrasentan in Patients with Nonmetastatic Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Cancer* **113**: 2478-2487
559. Kefford R, Beith JM, Van Hazel GA, Millward M, Trotter JM, Wyld DK, Kusic R, Shreeniwas R, Morganti A, Ballmer A, Segal E, Nayler O & Clozel M (2007) A phase II study of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist, as monotherapy in patients with stage IV metastatic melanoma. *Invest New Drugs* **25**: 247-252
560. Kefford RF, Clingan PR, Brady B, Ballmer A, Morganti A & Hersey P A (2010) Randomized, double-blind, placebo-controlled study of high-dose bosentan in patients with stage IV metastatic melanoma receiving first-line dacarbazine chemotherapy. *Mol Cancer* **9**: 69-69
561. Doppalapudi VR, Tryder N, Li L, Aja T, Griffith D, Liao F-F, Roxas G, Ramprasad MP, Bradshaw C & Barbas CF 3rd (2007) Chemically programmed antibodies: endothelin receptor targeting CovX-Bodies. *Bioorg. Med. Chem. Lett* **17**: 501-506
562. Sarramegna V, Talmont F, Demange P & Milon A (2003) Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification. *Cell. Mol. Life Sci* **60**: 1529-1546

## RESULTATS ET DISCUSSION

563. Sakamoto A, Yanagisawa M, Sakurai T, Takuwa Y, Yanagisawa H & Masaki T (1991) Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **178**: 656-663
564. Williams DL Jr, Jones KL, Pettibone DJ, Lis EV & Clineschmidt BV (1991) Sarafotoxin S6c: an agonist which distinguishes between endothelin receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **175**: 556-561
565. Limbird LE (2005) Cell surface receptors: a short course on theory & methods Springer
566. Albizu L, Balestre M-N, Breton C, Pin J-P, Manning M, Mouillac B, Barberis C & Durroux T (2006) Probing the existence of G protein-coupled receptor dimers by positive and negative ligand-dependent cooperative binding. *Mol. Pharmacol* **70**: 1783-1791
567. Gregan B, Schaefer M, Rosenthal W & Oksche A (2004) Fluorescence resonance energy transfer analysis reveals the existence of endothelin-A and endothelin-B receptor homodimers. *J. Cardiovasc. Pharmacol* **44 Suppl 1**: S30-33

568. Klammt C, Srivastava A, Eifler N, Junge F, Beyermann M, Schwarz D, Michel H, Doetsch V & Bernhard F (2007) Functional analysis of cell-free-produced human endothelin B receptor reveals transmembrane segment 1 as an essential area for ET-1 binding and homodimer formation. *FEBS J* **274**: 3257-3269
569. Sokolovsky M, Ambar I & Galron R (1992) A novel subtype of endothelin receptors. *J. Biol. Chem* **267**: 20551-20554
570. Sogabe K, Nirei H, Shoubo M, Nomoto A, Ao S, Notsu Y & Ono T (1993) Pharmacological profile of FR139317, a novel, potent endothelin ETA receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther* **264**: 1040-1046
571. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A & Felgner PL (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**: 1465-1468
572. Davis HL, Michel ML & Whalen RG (1993) DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. *Hum. Mol. Genet* **2**: 1847-1851
573. Tang DC, DeVit M & Johnston SA (1992) Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* **356**: 152-154
574. Costagliola S, Rodien P, Many MC, Ludgate M & Vassart G (1998) Genetic immunization against the human thyrotropin receptor causes thyroiditis and allows production of monoclonal antibodies recognizing the native receptor. *J. Immunol* **160**: 1458-1465
575. Tymciu S, Wijkhuisen A, Sagot M-A, Frobert Y, Grassi J, Créminon C, Couraud J-Y & Boquet D (2002) Use of DNA immunization to produce polyclonal antibodies against the native human neurokinin-1 receptor for substance P. *J. Neuroimmunol* **128**: 23-30
576. Chambers RS & Johnston SA (2003) High-level generation of polyclonal antibodies by genetic immunization. *Nat. Biotechnol* **21**: 1088-1092
577. Nagata S, Salvatore G & Pastan I (2003) DNA immunization followed by a single boost with cells: a protein-free immunization protocol for production of monoclonal antibodies against the native form of membrane proteins. *J. Immunol. Methods* **280**: 59-72
578. Alexandrenne C, Wijkhuisen A, Dkhissi F, Hanoux V, Créminon C, Boquet D & Couraud J-Y (2009) Generating antibodies against the native form of the human prion protein (hPrP) in wild-type animals: a comparison between DNA and protein immunizations. *J. Immunol. Methods* **341**: 41-49
579. Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud J-M, Delaere P, Branellec D, Schwartz B & Scherman D (1999) High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4262-4267
580. Widera G, Austin M, Rabussay D, Goldbeck C, Barnett SW, Chen M, Leung L, Otten GR, Thudium K, Selby MJ & Ulmer JB (2000) Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. *J. Immunol* **164**: 4635-4640
581. Li Z, Zhang H, Fan X, Zhang Y, Huang J, Liu Q, Tjelle TE, Mathiesen I, Kjekken R & Xiong S (2006) DNA electroporation prime and protein boost strategy enhances humoral immunity of tuberculosis DNA vaccines in mice and non-human primates. *Vaccine* **24**: 4565-4568
582. Laylor R, Porakishvili N, De Souza J, Playfair J, Delves P & Lund T (1999) DNA vaccination favours memory rather than effector B cell responses. *Clin Exp Immunol* **117**: 106-112
583. Coller HA & Coller BS (1983) Statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique with a view toward ensuring hybridoma monoclonality. *Hybridoma* **2**: 91-96
584. Grunow R, D'Apuzzo M, Wyss-Coray T, Frutig K & Pichler WJ (1994) A cell surface ELISA for the screening of monoclonal antibodies to antigens on viable cells in suspension. *J. Immunol. Methods* **171**: 93-102
585. Wewetzer K, Heiniger C & Seilheimer B (1996) An improved cell-ELISA for the differential screening of antibodies against cell surface molecules of viable adherent Schwann cells. *J. Immunol. Methods* **191**: 171-178
586. Frelinger AL 3rd, Cohen I, Plow EF, Smith MA, Roberts J, Lam SC & Ginsberg MH (1990) Selective inhibition of integrin function by antibodies specific for ligand-occupied receptor conformers. *J. Biol. Chem* **265**: 6346-6352
587. Johns TG, Adams TE, Cochran JR, Hall NE, Hoyne PA, Olsen MJ, Kim Y-S, Rothacker J, Nice EC, Walker F, Ritter G, Jungbluth AA, Old LJ, Ward CW, Burgess AW, Wittrup KD & Scott AM (2004) Identification of the epitope for the epidermal growth factor receptor-specific monoclonal antibody 806 reveals that it preferentially recognizes an untethered form of the receptor. *J. Biol. Chem* **279**: 30375-30384

588. Tarp MA, Sørensen AL, Mandel U, Paulsen H, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J & Clausen H (2007) Identification of a novel cancer-specific immunodominant glycopeptide epitope in the MUC1 tandem repeat. *Glycobiology* **17**: 197-209
589. Kandalaft LE, Facciabene A, Buckanovich RJ & Coukos G (2009) Endothelin B Receptor, a New Target in Cancer Immune Therapy. *Clin Cancer Res* **15**: 4521-4528
590. Day PW, Rasmussen SGF, Parnot C, Fung JJ, Masood A, Kobilka TS, Yao X-J, Choi H-J, Weis WI, Rohrer DK & Kobilka BK (2007) A monoclonal antibody for G protein-coupled receptor crystallography. *Nat. Methods* **4**: 927-929
591. Paolillo M, Russo MA, Curti D, Lanni C & Schinelli S (2010) Endothelin B receptor antagonists block proliferation and induce apoptosis in glioma cells. *Pharmacol. Res* **61**: 306-315
592. Overington JP, Al-Lazikani B & Hopkins AL (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* **5**: 993-996
593. Timmerman P, Puijk WC & Meloen RH (2007) Functional reconstruction and synthetic mimicry of a conformational epitope using CLIPS technology. *J. Mol. Recognit* **20**: 283-299
594. Zhang Y, Pool C, Sadler K, Yan H-ping, Edl J, Wang X, Boyd JG & Tam JP (2004) Selection of active ScFv to G-protein-coupled receptor CCR5 using surface antigen-mimicking peptides. *Biochemistry* **43**: 12575-12584
595. Robertson N, Jazayeri A, Errey J, Baig A, Hurrell E, Zhukov A, Langmead CJ, Weir M & Marshall FH (2011) The properties of thermostabilised G protein-coupled receptors (StaRs) and their use in drug discovery. *Neuropharmacology* **60**: 36-44
596. Klinguer-hamour C, Jouhanneaud A & Grenier-caussanel V (2011) Novel anti CXCR4 antibodies and their use for the treatment of cancer. Available at: <http://www.freepatentsonline.com/y2011/0020218.html>
597. Yan H, Gu W, Yang J, Bi V, Shen Y, Lee E, Winters KA, Komorowski R, Zhang C, Patel JJ, Caughey D, Elliott GS, Lau YY, Wang J, Li Y-S, Boone T, Lindberg RA, Hu S & Véniant MM (2009) Fully human monoclonal antibodies antagonizing the glucagon receptor improve glucose homeostasis in mice and monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther* **329**: 102-111
- 598.





## **Production et caractérisation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux ciblant les récepteurs des endothélines en vue d'une immunothérapie des cancers.**

Le développement des anticorps monoclonaux thérapeutiques est en plein essor notamment à cause de leur bénéfice important pour le traitement des cancers. Cependant, à l'heure actuelle, aucun anticorps monoclonal sur le marché ou en phase III ne cible de RCPGs, en dépit de l'implication grandissante de ces récepteurs dans la carcinogenèse. Parmi les RCPGs les plus pertinents pour l'oncologie, souvent cités dans la littérature et dont certains inhibiteurs chimiques sont en phase clinique avancée, on trouve les deux sous-types de récepteurs des endothélines ETAR et ETBR.

Dans ce contexte, mon projet de thèse a consisté à produire des anticorps monoclonaux capables de lier spécifiquement les récepteurs des endothélines, puis à les caractériser dans le but d'évaluer leur potentiel antitumoral. Grâce à une stratégie d'immunisation génique, un ensemble de 27 anticorps monoclonaux, tous spécifiques de la forme native d'ETBR, a été obtenu. Un de ces anticorps, nommé rendomab-B1, a fait l'objet d'une caractérisation précise et s'est révélé être un puissant inhibiteur allostérique d'ETBR. De plus, cette propriété antagoniste a permis de bloquer l'action autocrine antiapoptotique de l'ET-1 sur des cellules endothéliales vasculaires, suggérant ainsi que le rendomab-B1 pourrait être utilisé comme agent thérapeutique afin d'inhiber les effets tumorigènes liés à la suractivation de l'axe ET1/ETBR au niveau de l'endothélium vasculaire tumoral. Par ailleurs, le rendomab-B1 a également été testé sur des lignées de mélanomes humains ; l'absence de fixation de l'anticorps malgré la présence de récepteurs ETB fonctionnels à la surface de ces cellules suggère l'existence d'une forme moléculaire atypique du récepteur, potentiellement spécifique aux mélanomes. A la lumière de ces résultats, le rendomab-B1 apparaît comme un outil prometteur, à la fois pour l'étude structurale et fonctionnelle d'ETBR, mais aussi pour une éventuelle thérapie anticancéreuse. Enfin, les 26 autres anticorps monoclonaux anti-ETBR, actuellement en cours de caractérisation, constituent également des molécules potentiellement intéressantes pour un usage fondamental ou thérapeutique impliquant ETBR. Pour conclure, ces travaux ont démontré l'intérêt de la méthode d'immunisation génique pour la production d'anticorps monoclonaux anti-RCPGs à visée thérapeutique.

Mots clés : anticorps thérapeutiques ; axe endothéline ; RCPG ; immunisation génique.

## **Production and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies targeting endothelin receptors for cancer immunotherapy.**

For a decade, monoclonal antibodies have become increasingly important for the biotherapeutic management of cancer. However, none of the monoclonal antibodies currently on the market or in late stage clinical trial do target a G-protein coupled receptor in spite of the emerging role of these receptors in tumor progression. Among the therapeutically relevant GPCRs for oncology, the endothelin receptors (ETAR and ETBR) are particularly attractive considering their overexpression in a wide range of tumors and their involvement in various stages of tumorigenesis.

In this context, my PhD project consisted in producing and characterizing monoclonal antibodies directed against endothelin receptors with a view to use them as anti-tumor agents. Using an original DNA immunization strategy, we produced a panel of 27 monoclonal antibodies which selectively recognized ETBR expressed at the surface of transfected cells. One of these antibodies, named rendomab-B1, was extensively characterized and proved to be a potent allosteric antagonist of ETBR. Moreover, rendomab-B1 was able to disrupt the autocrine ET1-mediated survival loop on vascular endothelial cells, suggesting that this antibody could be used to prevent the pro-tumorigenic effect due to ET-1 and ETBR upregulation in the tumor-surrounding endothelium. Furthermore, rendomab-B1 binding onto ETBR was also assessed on melanoma cell lines and revealed that a tumor-specific form of ETBR may exist, as illustrated by the poor fixation of rendomab-B1 on these cells in spite of the presence of functional ETB receptors. Together, these results present rendomab-B1 as promising agent, not only for the structural and functional study of ETBR, but also for its therapeutic modulation in the case of cancer for instance. Finally, the other 26 monoclonal antibodies, whose characterization is still ongoing, also constitute potential tools for fundamental or therapeutic applications involving ETBR. To conclude, this work has highlighted the relevance of the DNA immunization approach to generate monoclonal antibodies against the native form of GPCRs.

Key words : therapeutic antibodies ; endothelin axis ; GPCR ; DNA immunization.

**Laboratoire de rattachement :**  
CEA de Saclay, DSV/iBiTec-S/SPI  
Laboratoire d'Ingénierie des Anticorps pour la  
Santé (LIAS)  
91191 GIF SUR YVETTE cedex

**Ecole doctorales : Innovation thérapeutique**  
**Pôle : Immunologie et Biothérapies**  
UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11  
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE  
CHATENAY-MALABRY »  
5, rue Jean Baptiste Clément  
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex