



HAL
open science

The HER3/ERBB3 receptor: the dark side of the ERBB planet

Christel Larbouret, Nadège Gaborit, Marie-Alix Poul, André Pèlerin, Thierry Chardès

► To cite this version:

Christel Larbouret, Nadège Gaborit, Marie-Alix Poul, André Pèlerin, Thierry Chardès. The HER3/ERBB3 receptor: the dark side of the ERBB planet. *Médecine/Sciences*, 2015, 31 (5), pp.465-468. 10.1051/medsci/20153105002 . hal-02285139

HAL Id: hal-02285139

<https://hal.umontpellier.fr/hal-02285139v1>

Submitted on 30 Sep 2021

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.

NOUVELLE

Le récepteur HER3 ou ERBB3

La face cachée de la planète ERBB

Christel Larbouret¹⁻⁴, Nadège Gaborit⁵, Marie-Alix Poul¹⁻⁴,
André Pèlerin¹⁻⁴, Thierry Chardès¹⁻⁴

¹ IRCM, institut de recherche en cancérologie de Montpellier, 208, rue des Apothicaires, F-34298, Montpellier, France ;

² Inserm U1194, F-34298, Montpellier, France ;

³ Université de Montpellier, Montpellier, F-34090, France ;

⁴ Institut régional du cancer de Montpellier, F-34298, Montpellier, France ;

⁵ Department of biological regulation, Weizmann Institute of Science, Rehovot, 76100, Israël.

thierry.chardes@inserm.fr

christel.larbouret@inserm.fr



➤ Lors de la découverte du facteur de croissance épidermique (EGF), Rita Levi-Montalcini et Stanley Cohen n'imaginaient pas que cette recherche, dont ils étaient les initiateurs, ouvrirait la voie, 60 ans plus tard, à une révolution dans le domaine de l'oncologie thérapeutique. Ce facteur de croissance EGF appartient à un ensemble de molécules qui stimulent quatre récepteurs transmembranaires à domaine tyrosine kinase (RTK) de la famille ERBB (EGFR, HER2, HER3 et HER4). Ces molécules contrôlent le cycle cellulaire et l'apoptose des cellules tumorales, et régulent la survie, la prolifération, l'angiogenèse et le métabolisme tumoral [1]. Après fixation du facteur de croissance, ces récepteurs sont essentiellement actifs sous forme de dimères, dont le niveau d'expression et la composition jouent un rôle dans la diversification des signaux intracellulaires activés et dans le potentiel carcinogène. La multiplicité des récepteurs au sein de la famille ERBB permet une plasticité dans la dimérisation des récepteurs, qui assure une adaptation du signal tumoral, activant des voies de signalisation différentes en fonction du type de ligand, du niveau de stimulation, de la densité de récepteurs, du type cellulaire ou de la thérapie ciblée utilisée [2].

Aujourd'hui, les thérapies ciblant la famille ERBB ont une place incontournable dans l'arsenal thérapeutique en cancérologie, qu'il s'agisse d'inhibiteurs de tyrosine kinases (TKI) ou d'anticorps monoclonaux (Acm), tels que le

cétuximab ou le panitumumab (anti-EGFR), le trastuzumab ou le pertuzumab (anti-HER2)¹ [19]. Le récepteur HER3, qui possède une activité kinase 1 000 fois plus faible que les autres récepteurs de la famille ERBB, a longtemps été délaissé comme cible thérapeutique, bien que jouant un rôle majeur dans la plasticité/adaptabilité de la signalisation oncogénique.

Repenser le récepteur HER3 comme cible thérapeutique

En réponse à la liaison des facteurs de croissance neurégulines (NRG), le récepteur HER3 subit un changement conformationnel permettant sa dimérisation avec les autres récepteurs de la famille ERBB. Ce phénomène conduit à l'activation allostérique de chaque partenaire de dimérisation par l'autre partenaire, permettant ainsi la *trans*-phosphorylation des deux récepteurs et l'activation des voies de signalisation majeures RAS/RAF/MEK/ERK et PI3K/AKT/mTOR (Figure 1). Dans ce cadre, les hétérodimères EGFR/HER3 et HER2/HER3 constituent les unités fonctionnelles de signalisation oncogénique les plus efficaces, car le récepteur HER3 est le plus puissant activateur de la sous-unité p85 de la PI3K, par l'intermédiaire des six tyrosines phosphorylables dans son domaine intracellulaire (Figure 1) [1]. Le récepteur HER3 a tout d'abord été

associé à la tumorigenèse parce qu'il promeut les voies de signalisation oncogéniques *via* EGFR et HER2. Ainsi, HER3 est généralement activé dans les cancers du sein caractérisés par l'amplification de HER2, alors que son élimination par interférence ARN bloque la croissance tumorale [3].

Des mutations somatiques de HER3, identifiées récemment dans le cancer du côlon, le cancer gastrique et quelques cas de cancer du sein [4], nous obligent à reconsidérer l'intérêt du récepteur HER3 comme cible thérapeutique directe. En effet, la plupart de ces mutations se situent dans le domaine extracellulaire et confèrent un potentiel oncogénique à la molécule. L'activation du récepteur HER3 dépendante de la NRG intervient dans certains cancers, soit par une boucle autocrine mise en évidence dans le cancer de l'ovaire [5], le cancer de la tête et du cou sans amplification de HER2 [6] ou le cancer colorectal [7], soit par une boucle paracrine de sécrétion *via* les fibroblastes du microenvironnement dans le cancer du pancréas [8]. Enfin, la résistance à la « pression » exercée par des inhibiteurs des récepteurs EGFR ou HER2 (anticorps ou TKI) ou d'autres récepteurs tels que Met [20] ou IGF1R (*insulin growth factor receptor*), par des inhibiteurs de PI3K, MEK ou BRAF, par la chimiothérapie ou l'hormonothérapie, fait intervenir un rétrocontrôle activant le récepteur HER3 et les voies de signalisation sous-jacentes [9]. Dans la plupart de ces scénarios, l'association d'inhibiteurs comodulant la cible principale, support de la résistance thérapeutique, et

¹ Voir à ce propos le numéro thématique de *médecine/sciences* consacré aux « anticorps monoclonaux en thérapeutique », paru en décembre 2009 n° 12, vol. 25).

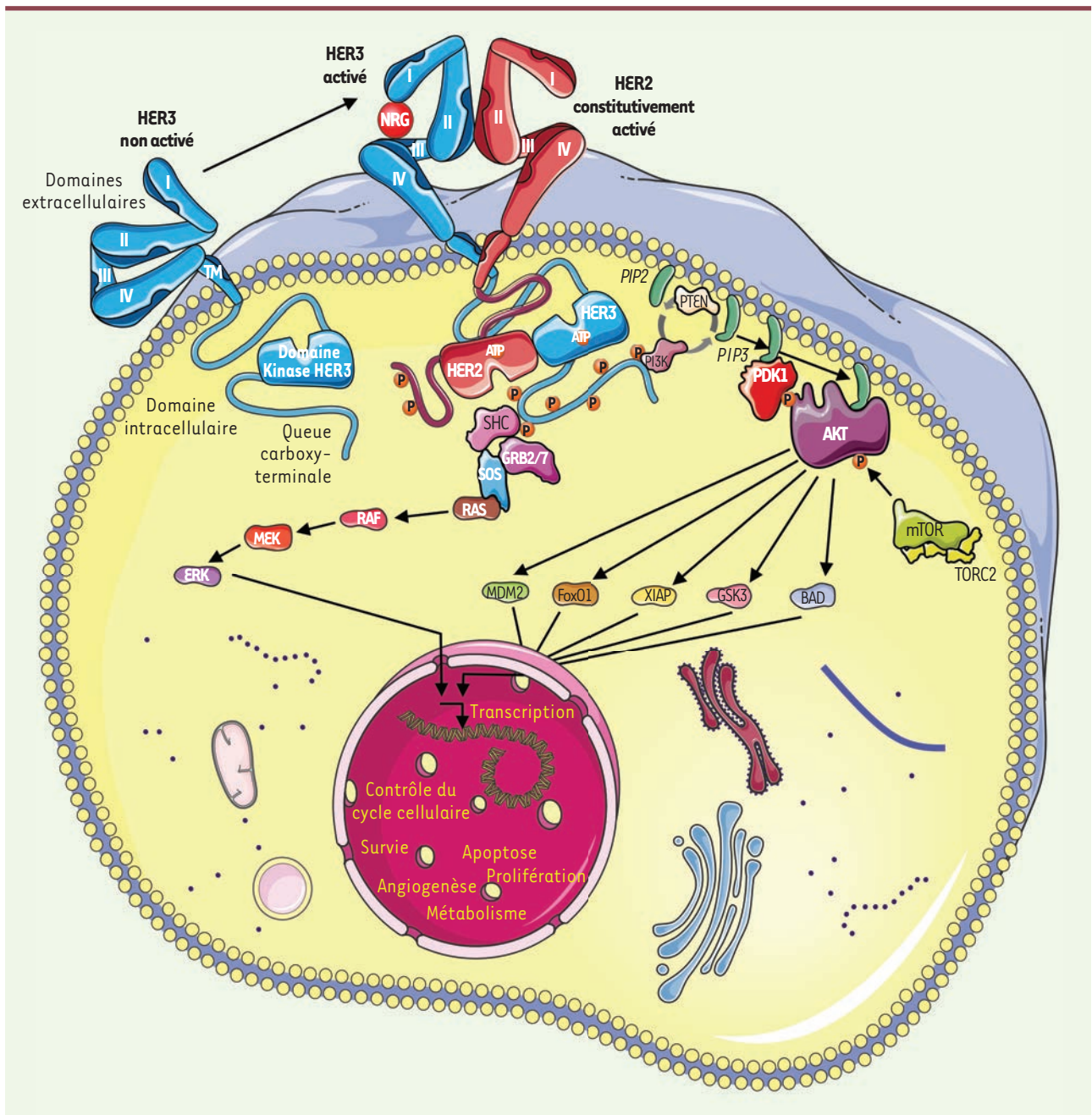


Figure 1. Structure, mécanisme d'activation et signalisation via le récepteur HER3.

le récepteur HER3, support de l'échappement thérapeutique, selon un schéma de traitement concomitant ou séquentiel, constitue certainement une solution thérapeutique d'avenir.

Produire et caractériser des Acm anti-HER3

L'activité kinase faible du récepteur HER3 constitue une limite au déve-

loppement de TKI ciblant directement HER3, mais laisse la porte ouverte aux thérapies ciblées à base d'Acm anti-HER3. Ainsi, des Acm ciblant HER3 sont actuellement en phase clinique [10], la plupart entrant en compétition avec la NRG. Nous avons produit et caractérisé des Acm humains ou murins qui reconnaissent des épitopes localisés au niveau des domaines extracellulaires

D1, D3 et D4 de HER3, et dont certains n'entrent pas en compétition avec la NRG et induisent un effet allostérique sur le récepteur HER3 [11, 12]. *In vitro*, ces Acm anti-HER3 inhibent très rapidement la phosphorylation des récepteurs HER2 et HER3, et des kinases AKT et ERK dans des lignées de cancer du pancréas et de cancer du sein. L'inhibition de la phosphorylation d'AKT se traduit par un

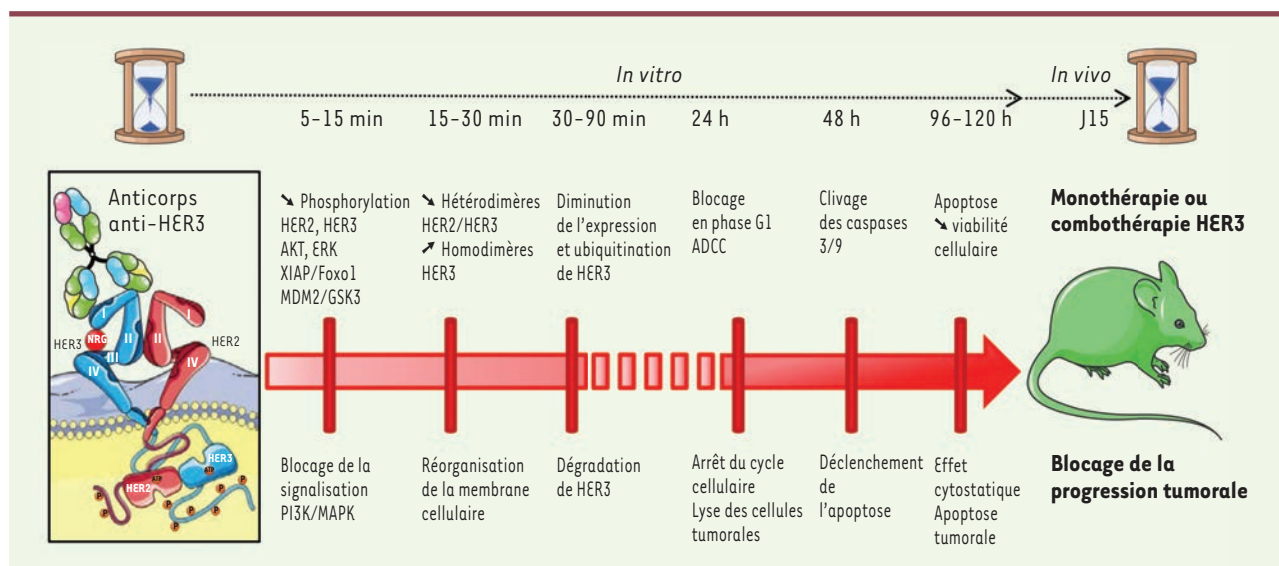


Figure 2. Mécanismes d'action des anticorps anti-HER3.

blocage sous-jacent de la phosphorylation de MDM2 (*murine double minute 2*), qui régule l'activité de p53, de XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) et FoxO1 (*forkhead box protein O1*), modulant l'apoptose, et de GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*), qui joue un rôle dans le cycle cellulaire [11] (Figure 2). Une modification de la membrane cellulaire des cellules tumorales est observée très précocement après traitement par les Acm anti-HER3, avec une diminution des hétérodimères HER2/HER3 et une augmentation des homodimères HER3, qui sont des impasses de signalisation [13, 14]. Puis une ubiquitination du récepteur HER3, qui implique des E3 ubiquitine ligases telles que NRDPI et NEDD4 (*neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4*), conduit à la dégradation du récepteur [10, 12]. Le traitement par les Acm anti-HER3 se traduit ensuite par des effets directs sur le cycle cellulaire (blocage en phase G1), l'induction d'apoptose dépendante de caspases, et la viabilité cellulaire des cellules tumorales ; il induit aussi des effets indirects de lyse des cellules tumorales par mobilisation du système immunitaire *via* le mécanisme d'ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) (Figure 2). *In vivo*, ces divers effets biologiques

ralentissent la progression tumorale dans des modèles de souris immunodéficientes porteuses de tumeurs humaines de type carcinome pancréatique ou cancer du sein de type basal-like, et traitées en monothérapie par des Acm anti-HER3.

Anticorps anti-HER3 : vers une stratégie combinatoire pour une meilleure efficacité

En oncologie, les associations thérapeutiques sont la règle car elles permettent d'optimiser les réponses thérapeutiques tout en permettant de traiter un plus grand nombre de patients. Adopter une stratégie combinatoire à l'aide d'anticorps mono- ou bi-spécifiques anti-ERBB pour optimiser le blocage de plusieurs voies de signalisation et outrepasser de possibles résistances est la clé d'une meilleure efficacité. Nous avons déjà montré que l'association du cétuximab (anti-EGFR) avec le trastuzumab (anti-HER2 ciblant le domaine IV) induit une synergie thérapeutique efficace chez des souris immunodéficientes porteuses de carcinome pancréatique humain [15]. La combinaison cétuximab/trastuzumab est plus efficace que le lapatinib, TKI comodulant EGFR et HER2 [16], ou la gemcitabine, chimiothérapie antimétabolite de référence dans le carcinome

pancréatique [17]. Un premier essai clinique (NCT00923299) d'association cétuximab/trastuzumab, administrée en seconde ligne chez 33 patients atteints de carcinome pancréatique progressant sous gemcitabine, a conduit à une stabilisation de la maladie chez 27 % des patients, avec une corrélation significative entre la toxicité cutanée et la survie sans progression [18]. Cette stratégie combinatoire a été confirmée et amplifiée chez des souris immunodéficientes greffées avec un carcinome pancréatique traitées par l'association de pertuzumab (anti-HER2 ciblant le domaine II) avec un anticorps anti-HER3 allostérique, n'entrant pas en compétition avec la NRG [14]. La combinaison pertuzumab/anticorps anti-HER3 est plus efficace que le pertuzumab utilisé seul ou associé au trastuzumab sur le blocage de la progression tumorale (Figure 2). Une association de six anticorps ciblant EGFR, HER2 et HER3 est actuellement en phase préclinique dans le cancer du pancréas². Ces stratégies de combinaison se traduisent par une meilleure efficacité dans la désorganisation des hétérodimères EGFR/HER3 et/ou HER2/HER3, par un blocage accru et persistant de la signalisation RAS/RAF/MEK/ERK

² www.symphogen.com

et PI3K/AKT/mTOR, par l'amplification de la dégradation des récepteurs ERBB ciblés et par l'amélioration de l'ADCC [12, 14, 16].

Conclusions et perspectives : il faut se méfier de l'eau qui dort

Longtemps face cachée et oubliée de la « planète » ERBB, le récepteur HER3, en dépit d'une activité kinase très faible, s'avère être d'un intérêt thérapeutique grandissant en oncologie. Transformer cet intérêt en succès ne se fera que si diverses notions de biologie systémique sont intégrées dans la démarche. Tout d'abord, la famille ERBB doit être considérée comme un réseau biologique interconnecté qui évolue en fonction des perturbations. Puisque la fréquence de mutations au cours de l'évolution est relativement faible, ce réseau biologique ERBB est particulièrement bien adapté pour répondre à une perturbation, mais est plus fragile face à deux ou plusieurs perturbations simultanées [2]. Ce principe plaide en faveur de la combinaison d'anticorps ciblant à la fois des récepteurs très exprimés (tels que EGFR ou HER2) et des récepteurs faiblement exprimés (comme HER3) mais régulateurs du réseau biologique ERBB. Par ailleurs, il est essentiel de disposer de biomarqueurs, tels que l'expression de la NRG ou des hétérodimères de récepteurs, pour prédire l'efficacité de la thérapie anti-HER3 et permettre de sélectionner les patients éligibles à ce traitement. Enfin, continuons de nous méfier de l'eau qui dort, un récepteur ERBB peut en cacher un autre... ♦

The HER3/ERBB3 receptor: the dark side of the ERBB planet

LIENS D'INTÉRÊT


Christel Larbouret, Marie-Alix Poul, André Pèlerin et Thierry Chardès déclarent avoir participé à des interventions ponctuelles (collaboration pour des travaux scientifiques) avec les sociétés Roche, LFB, CisBio, MilleGen et GamaMabs. Nadège Gaborit déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les Drs Yasmine Lazrek, Gaëlle Thomas et Christophe Le Clorennec pour leur contribution aux travaux de l'équipe auquel il est fait référence dans cet article, et Véronique Garambois, Geneviève Heintz, Sabine Bousquie et toute l'équipe de l'animalerie de l'IRCM pour leur assistance technique. Ces travaux ont été financés par la Ligue contre le cancer, le canceropôle GSO, le programme FU113 UmAbHER3 (BPI France), le SIRIC Montpellier Cancer, Inserm transfert et le LabEx MAbImprove ANR-10-LABX-53-01.

RÉFÉRENCES

- Roskoski Jr R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res* 2014 ; 79 : 34-74.
- Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer* 2012 ; 12 : 553-63.
- Lee-Hoeflich ST, Crocker L, Yao E, et al. A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Res* 2008 ; 68 : 5878-87.
- Jaiswal BS, Klijavin NM, Stawiski EW, et al. Oncogenic ERBB3 mutations in human cancers. *Cancer Cell* 2013 ; 23 : 603-17.
- Sheng Q, Liu X, Fleming E, et al. An activated ErbB3/ NRG1 autocrine loop supports in vivo proliferation in ovarian cancer cells. *Cancer Cell* 2010 ; 17 : 298-310.
- Wilson TR, Lee DY, Berry L, et al. Neuregulin-1-mediated autocrine signaling underlies sensitivity to HER2 kinase inhibitors in a subset of human cancers. *Cancer Cell* 2011 ; 20 : 158-72.
- Yonesaka K, Zejnullahu K, Okamoto I, et al. Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Sci Transl Med* 2011 ; 3 : 99ra86.
- Liles JS, Arnoletti JP, Kossenkov AV, et al. Targeting ErbB3-mediated stromal-epithelial interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2011 ; 105 : 523-33.
- Arteaga CL, Engelman JA. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2014 ; 25 : 282-302.
- Mujoo K, Choi BK, Huang Z, et al. Regulation of ERBB3/HER3 signaling in cancer. *Oncotarget* 2014 ; 5 : 10222-36.
- Lazrek Y, Dubreuil O, Garambois V, et al. Anti-HER3 domain 1 and 3 antibodies reduce tumor growth by hindering HER2/HER3 dimerization and AKT-induced MDM2, XIAP and FoxO1 phosphorylation. *Neoplasia* 2013 ; 15 : 335-47.
- Gaborit N, Abdul-Hai A, Mancini M, et al. Examination of HER3 targeting in cancer using monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015 ; 112 : 839-44.
- Gaborit N, Larbouret C, Vallaghe J, et al. Time resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) to analyze the disruption of EGFR/HER2 dimers: a new method to evaluate the efficiency of targeted therapy using monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 2011 ; 283 : 11337-45.
- Thomas G, Chardès T, Gaborit N, et al. HER3 expression as a predictive biomarker of the efficacy of pertuzumab in pancreatic cancer. *Oncotarget* 2014 ; 5 : 7138-48.
- Larbouret C, Robert B, Navarro-Teulon I, et al. In vivo therapeutic synergism of anti-epidermal growth factor receptor and anti-HER2 monoclonal antibodies against pancreatic carcinomas. *Clin Cancer Res* 2007 ; 13 : 3356-62.
- Larbouret C, Gaborit N, Chardès T, et al. In pancreatic carcinoma, dual EGFR/HER2 targeting with cetuximab/trastuzumab is more effective than treatment with trastuzumab/erlotinib or lapatinib alone: implication of receptors down-regulation and dimers disruption. *Neoplasia* 2012 ; 14 : 121-30.
- Larbouret C, Robert B, Bascoul-Mollevi C, et al. Combined cetuximab and trastuzumab are superior to gemcitabine in the treatment of human pancreatic carcinoma xenografts. *Ann Oncol* 2010 ; 21 : 98-103.
- Assenat E, Azria D, Mollevi C, et al. Dual targeting of HER1/EGFR and HER2 with cetuximab and trastuzumab in patients with metastatic pancreatic cancer after gemcitabine failure: results of the therapy phase 1-2 trial. *Oncotarget* 2015 ; 5 (sous presse).
- Bodmer A, Goetsch L, Favet L, et al. Anticorps et tumeurs solides : cibles établies et pistes prometteuses. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 1090-8.
- Montagne R, Furla A, Kherrouche Z, Tulasne D. Le récepteur Met fête ses 30 ans. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 864-73.



Tarifs d'abonnement m/s - 2014


Abonnez-vous

à médecine/sciences

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement

page 492 dans ce numéro de m/s



De la mouche à l'homme RACK1, un acteur essentiel de la traduction virale dépendante de l'IRES

Mohamed Lamine Hafirassou^{1,2,*}, Carine Meignin^{2,3},
Thomas Baumert^{1,2,4}, Catherine Schuster^{1,2}

Le ribosome support de la traduction de l'information génétique

Le ribosome est une superstructure biologique universelle chargée de traduire l'information génétique portée par l'ARN messager (ARNm) en protéine(s). Il est formé de deux sous-unités (SU) caractérisées dans les années 1970 par leur constante de sédimentation (SU40S et SU60S chez les eucaryotes). Le ribosome eucaryote est composé de l'ARNr 18S constituant la SU40S, des ARNr 5S, 28S et 5,8S constituant la SU60S, et de plusieurs dizaines de protéines ribosomales associées spécifiquement à l'une ou l'autre sous-unité. Les ARNr jouent un rôle essentiel dans le mécanisme de traduction (reconnaissance de l'ARNm et catalyse de la formation de la liaison peptidique) [17]. Les progrès récents de la cristallographie, et surtout de la cryo-électromicroscopie, ont permis de mieux comprendre la structure et la fonction des composants du ribosome. Schématiquement, la SU80S prend en charge l'ARNm à traduire et, une fois les SU40S et SU60S assemblées pour former le ribosome, la SU60S débute et poursuit la synthèse protéique [1, 2]. Le ribosome a longtemps été perçu comme une structure ribonucléoprotéique figée dans sa mission de traduction de l'ARNm, la régulation de l'expression génique étant l'apanage des étapes transcriptionnelles et post-transcriptionnelles [3-5]. Plusieurs études récentes ont toutefois infirmé ce dogme en démontrant que les ribosomes ne constituaient pas une population homogène. Ainsi, en réponse à un stress par exemple, une hétérogénéité

des protéines ou de l'ARNr peut être observée, ce qui entraînera une modification quantitative ou qualitative des ARNm traduits (« translato-mé ») [6].

Mécanismes de traduction dépendant de la coiffe versus dépendant d'un IRES

La traduction chez les eucaryotes est majoritairement assurée par un mécanisme dépendant de la coiffe. En effet, simultanément à la transcription de l'ARNm, celui-ci acquiert sa maturation par l'ajout d'une coiffe en 5', épissage, dépôt du complexe EJC (*exon junction complex*), pour se terminer par la polyadénylation en 3'. La coiffe en 5' correspond à l'ajout d'une guanosine méthylée en position N7 (m7G), liée de façon covalente au nucléotide suivant par une liaison 5'-5' triphosphate (m7G(5')-PPP-(5')N). Après transfert de l'ARNm mature du noyau dans le cytoplasme, la coiffe en 5' est reconnue par le facteur d'initiation de la traduction eIF4E, permettant la mise en place du complexe d'initiation de la traduction et le recrutement de la SU40S (Figure 1A). La SU40S arrimée à l'ARNm va alors glisser le long de celui-ci (*scanning*) jusqu'à rencontrer le codon initiateur de la traduction, un codon AUG. Ce mécanisme est largement prédominant pour les ARNm cellulaires. À l'inverse, les virus à ARN effectuent généralement leur cycle biologique dans le cytoplasme, ce qui empêche l'ajout conventionnel d'une coiffe en 5'. Afin de protéger l'extrémité 5' de leur génome, les virus

¹ Inserm UMR1110, Institut de recherche sur les maladies virales et hépatiques, 3, rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France ;

² Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France ;

³ CNRS UPR9022,

Institut de biologie moléculaire et cellulaire, 15, rue Descartes, 67000 Strasbourg, France ;

⁴ Institut hospitalo-universitaire (IHU), pôle hépato-digestif, hôpitaux universitaires de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France.

*adresse actuelle : Inserm U944, Institut universitaire d'hématologie, hôpital Saint-Louis, 75010 Paris, France. catherine.schuster@unistra.fr

ont développé différentes stratégies, comme l'ajout d'une protéine virale (par exemple VPg) ou la synthèse d'une coiffe par une enzyme virale [2]. Certains virus dont le génome est un ARN de polarité positive de type ARNm, possèdent en 5' de leur ARN une séquence formant une structure secondaire et tertiaire, appelée *internal ribosome entry site* ou IRES. L'IRES permet le recrutement du ribosome indépendamment de la coiffe en 5' (Figure 1B). Ce mécanisme de traduction, qui nécessite moins de facteurs d'initiation de la traduction, constitue pour ces virus une manière astucieuse de s'affranchir de la traduction dépendante de la coiffe, mécanisme en général fortement inhibé lors d'une infection virale [7].

Lutte antivirale, les facteurs de l'hôte en ligne de mire

Classiquement, les thérapies antivirales ciblent le virus en proposant des « antiviraux à action directe ou DAA » (il s'agit d'analogues nucléosidiques, d'inhibiteurs de protéases, d'intégrase ou de polymérase) [8]. Ces molécules antivirales sont très efficaces chez la majorité des patients traités, mais peuvent malheureusement induire la sélection de virus mutants résistants qui requièrent la mise au point d'approches complémentaires [9]. Ceci est dû à la dynamique de réplication de ces virus



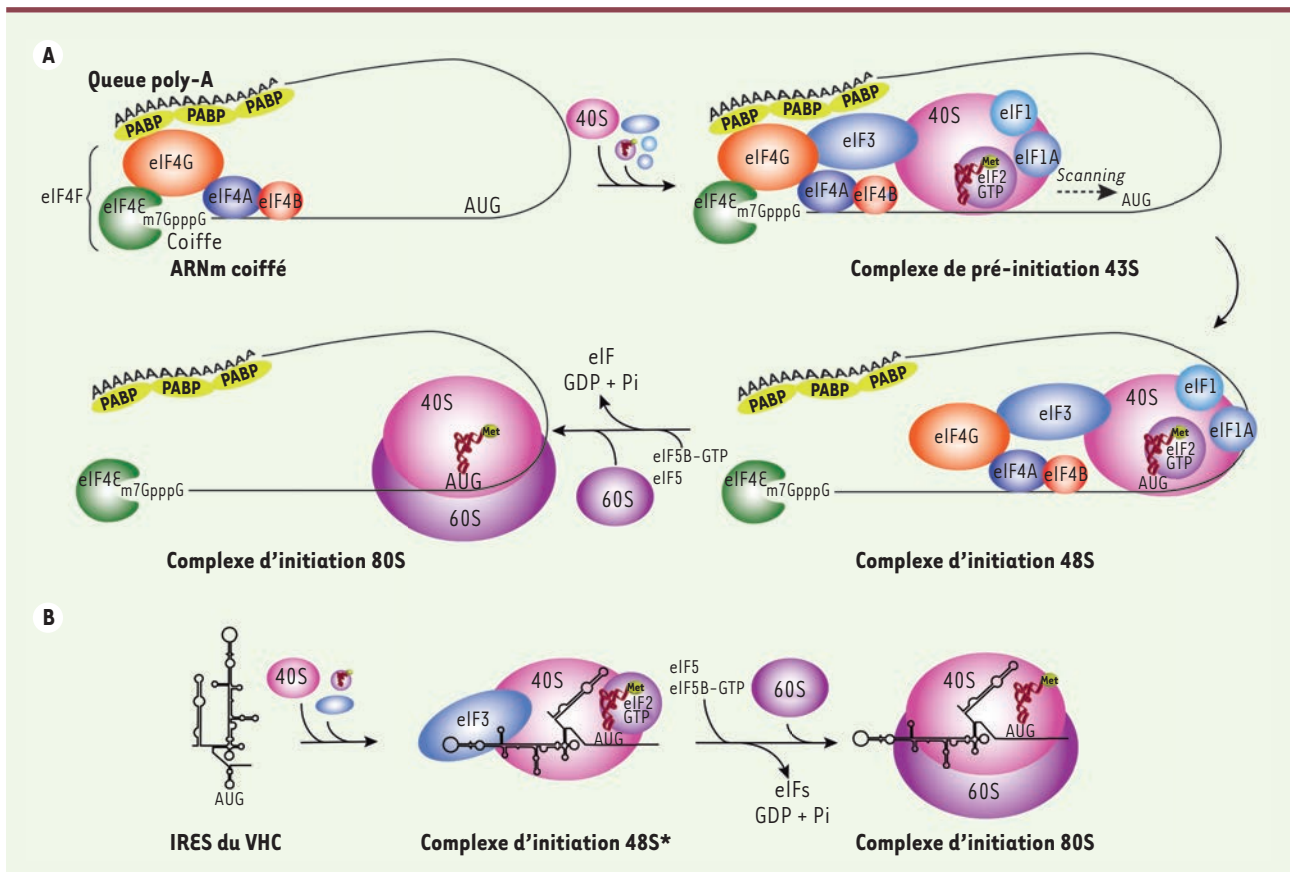


Figure 1. Initiation de la traduction chez les eucaryotes. **A.** L'initiation de la traduction dépendante de la coiffe chez les eucaryotes. L'initiation de la traduction par *scanning* ou balayage implique la formation de trois complexes intermédiaires : le complexe de pré-initiation 43S, le complexe d'initiation 48S et le complexe d'initiation 80S. La majorité des ARNm cellulaires possèdent deux particularités à leurs extrémités : une coiffe en 5' et une queue poly-A en 3'. Alors que la queue poly-A est reconnue par la protéine PABP (*Poly-A binding protein*), la coiffe (m7G-PPP-G) est reconnue par la protéine eIF4E (*eukaryotic initiation factor 4E*) appartenant au complexe d'initiation de la traduction eIF4F. Ce dernier permet le recrutement de la SU40S du ribosome, en association avec les facteurs eIF3, eIF1, eIF1A et le complexe ternaire eIF2-GTP-Met-tRNAi^{Met}, pour former le complexe de pré-initiation 43S. La formation du complexe d'initiation 48S a lieu lorsque le complexe 43S atteint par *scanning* le codon d'initiation AUG et que les interactions codon-anticodon sont établies. Finalement, la formation du complexe d'initiation 80S a lieu lorsque la SU60S rejoint le complexe 48S à l'aide des facteurs eIF5 et eIF5B-GTP. Grâce à son activité GTPase, eIF5B hydrolyse le GTP associé, conduisant à la libération de eIF5B-GDP et des facteurs d'initiation de traduction, permettant à la traduction d'entrer en phase d'élongation. **B.** Initiation de la traduction IRES-dépendante du virus de l'hépatite C (VHC). L'IRES du VHC recrute la SU40S du ribosome en association avec eIF3 et le complexe ternaire eIF2-GTP-Met-tRNAi^{Met} au niveau du codon initiateur AUG (sans *scanning*) pour former le complexe d'initiation 48S* (différent du complexe de pré-initiation 48S canonique). La formation ultérieure du complexe 80S dépend également de l'hydrolyse du GTP par eIF5B.

et à la fidélité limitée des ARN polymérasés viraux lors de la réplication du génome viral. Une alternative thérapeutique consiste à mettre au point des molécules visant des composants cellulaires (*host targeting agents*) nécessaires au virus pour se multiplier, comme les récepteurs membranaires utilisés par le virus pour entrer dans la cellule ou des facteurs cellulaires requis dans la réplication, l'assemblage ou l'export viraux [10].

RACK1, une protéine ribosomale nécessaire à la propagation virale dépendante de l'IRES

Les virus, parasites stricts par essence, ne possèdent ni système de traduction, ni système de production d'énergie. Au regard de la spécialisation fonctionnelle des ribosomes évoquée précédemment, nos récents travaux ont porté sur le rôle des protéines ribosomales de la SU40S dans la réplication virale [11]. RACK1 (*receptor for activated C-kinase*) est une

protéine associée à la SU40S du ribosome. Elle appartient à la famille des *WD repeat proteins* qui, par leur fonction de protéines d'échafaudage, sont impliquées dans les voies de signalisation cellulaires [12]. Contrairement à celle de la plupart des protéines ribosomales, l'inhibition de l'expression de RACK1 n'affecte pas la survie des cellules de drosophile ou des cellules humaines. Chez la drosophile, l'absence de RACK1 induit toutefois une très forte baisse de la réplication des virus

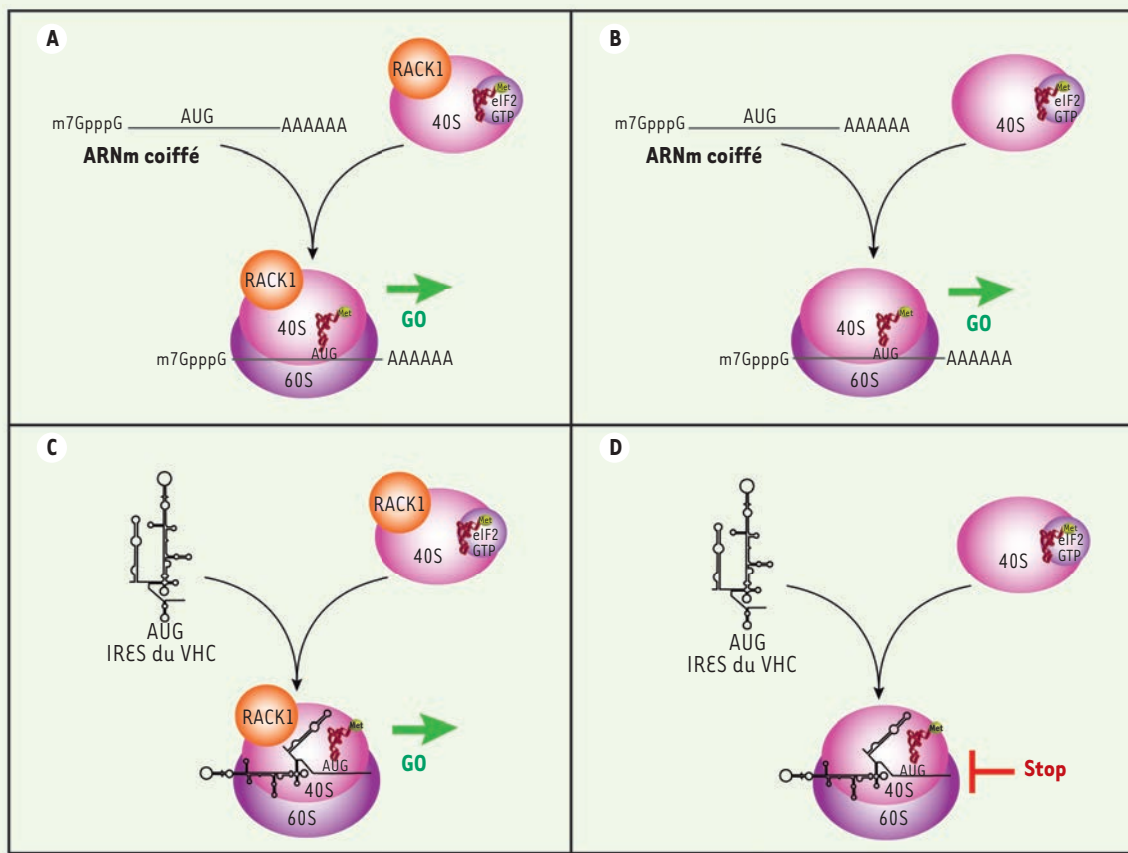


Figure 2. Rôle de RACK1 dans la traduction dépendante de l'IRES. **A, B.** La traduction conventionnelle dépendante de la coiffe est indépendante de la présence (**A**) ou de l'absence (**B**) de RACK1. **C, D.** La traduction dépendante de l'IRES de virus tels que le virus de l'hépatite C (VHC) requiert la présence de RACK1 (**C**) et est inhibée lorsque que les ribosomes sont dépourvus de la protéine RACK1 (**D**).

DCV (*Drosophila C virus*) et CrPV (*cricket paralysis virus*), alors que la réplication d'autres virus, tels que VSV (*vesicular stomatitis virus*) ou FHV (*flock house virus*) reste inchangée. Une différence notable entre ces virus est la présence en 5' de leur génome ARN d'un IRES dans le cas de DCV et CrPV, et d'une coiffe dans le cas de VSV ou de FHV. RACK1 apparaît donc comme une protéine ribosomale discriminant les traductions dépendantes d'un IRES et celles dépendantes de la coiffe. L'importance de RACK1 dans la traduction dépendante d'un IRES a été confirmée chez l'homme en utilisant le virus de l'hépatite C (VHC) comme modèle de virus humain dépendant d'un IRES [13]. L'analyse des différentes étapes de l'infection virale a montré que RACK1 agit au niveau de l'étape de traduction des protéines virales, chez la drosophile comme chez

l'homme. L'étude du mécanisme moléculaire a montré (1) que l'association de RACK1 au ribosome est essentielle dans ce mécanisme, (2) que dans le cas du VHC, RACK1 agit sur la traduction virale indépendamment de miR-122, un microARN hépatique impliqué dans la traduction de ce virus, et (3) que la sous-unité « j » du facteur d'initiation de la traduction eIF3 (eIF3j) est impliquée dans ce mécanisme de traduction particulier. RACK1 apparaît donc comme un facteur cellulaire nécessaire à la traduction des ARN viraux dépendants de l'IRES par les ribosomes (Figure 2).

RACK1 : un facteur cellulaire de choix pour la lutte antivirale ?

Notre découverte suggère un rôle de RACK1 dans la propagation d'autres virus contenant un IRES et ayant développé

la même stratégie de piratage de la traduction cellulaire (par exemple virus de la poliomyélite, de la fièvre aphteuse, entérovirus 71, virus coxsackie B3). Des traitements à large spectre d'action ciblant RACK1 pour lutter contre les infections virales animales ou humaines sont donc envisageables. Décrypter les conditions dans lesquelles RACK1 est nécessaire à la cellule est toutefois un prérequis avant d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques basées sur le blocage spécifique du site de reconnaissance des ARN viraux dépendants de l'IRES sur le ribosome, mais sans perturber le fonctionnement de la cellule hôte. RACK1 est conservée de la drosophile à l'homme, un homologue existe également chez la levure. L'invalidation génétique de RACK1 chez les drosophiles et les souris est létale [14, 15], suggérant un

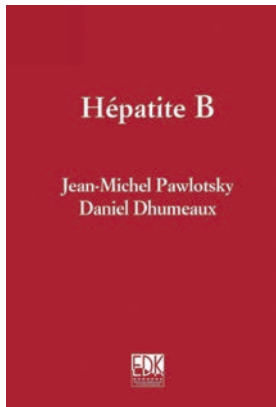
rôle crucial de RACK1 dans le développement. Cependant, lorsque l'inactivation de RACK1 est faite de façon conditionnelle chez des drosophiles adultes, celles-ci sont viables, et, d'autre part, les souris *Rack1*^{-/-} meurent à l'étape de gastrulation [15], ce qui signifie que RACK1 n'est requis que pour la traduction d'une sous-population d'ARNm. Un rôle de RACK1 dans la traduction d'ARNm cellulaires dépendants de l'IRES est donc à considérer, car certains ARNm cellulaires peuvent être traduits à l'aide d'un IRES de manière exclusive (c'est le cas de gènes du développement, d'oncogènes) ou mixte. Dans ce dernier cas, il est proposé que les ARNm utilisent la traduction dépendante de la coiffe en conditions physiologiques et la traduction dépendante de l'IRES en situation d'urgence, la structure IRES ne se dévoilant qu'en réponse à des situations particulières comme la réponse à un stress [16]. La traduction dépendante de l'IRES permet, dans ce cas, une synthèse protéique rapide et efficace en réponse à une situation mettant en jeu la survie de la cellule.

Au niveau fondamental, nos résultats démontrent une fois encore que des études menées sur les virus permettent d'identifier des mécanismes cellulaires fondamentaux impliqués dans la traduction des ARNm, et confirment la complexité du mécanisme de traduction. Nos travaux offrent de nouvelles clés pour comprendre « le code du ribosome » qui, selon la composition en protéines du ribosome, traduirait sélectivement certains ARNm, d'autres non. ♦

From fly to man: RACK1, an essential actor of the dependent viral translation of IRES

RÉFÉRENCES

1. Ramakrishnan, V. The ribosome emerges from a black box. *Cell* 2014 ; 159 : 979-84.
2. Decroly E, Ferron F, Lescar J, Canard B. Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. *Nat Rev Microbiol* 2012 ; 10 : 51-65.
3. Kugel JF, Goodrich JA. Non-coding RNAs: key regulators of mammalian transcription. *Trends Biochem Sci* 2012 ; 37 : 144-51.
4. Schubeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature* 2015 ; 517 : 321-6.
5. Rouault TA. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol* 2006 ; 2 : 406-14.
6. Xue S, Barna M. Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012 ; 13 : 355-69.
7. Balvay L, Soto Rifo R, Ricci EP, et al. Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim Biophys Acta* 2009 ; 1789 : 542-57.
8. Lou Z, Sun Y, Rao Z. Current progress in antiviral strategies. *Trends Pharmacol Sci* 2014 ; 35 : 86-102.
9. Chung RT, Baumert TF. Curing chronic hepatitis C: the arc of a medical triumph. *N Engl J Med* 2014 ; 370 : 1576-8.
10. Zeisel MB, Lupberger J, Fofana I, Baumert TF. Host-targeting agents for prevention and treatment of chronic hepatitis C: perspectives and challenges. *J Hepatol* 2013 ; 58 : 375-84.
11. Majzoub K, Hafirassou ML, Meignin C, et al. RACK1 controls IRES-mediated translation of viruses. *Cell* 2014 ; 159 : 1086-95.
12. Nilsson J, Sengupta J, Frank J, Nissen P. Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep* 2004 ; 5 : 1137-41.
13. Niepmann M. Hepatitis C virus RNA translation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013 ; 369 : 143-66.
14. Kadmas JL, Smith MA, Pronovost SM, Beckerle MC. Characterization of RACK1 function in Drosophila development. *Dev Dyn* 2007 ; 236 : 2207-15.
15. Volta V, Beugnet A, Gallo S, et al. RACK1 depletion in a mouse model causes lethality, pigmentation deficits and reduction in protein synthesis efficiency. *Cell Mol Life Sci* 2013 ; 70 : 1439-50.
16. Fitzgerald KD, Semler BL. Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochim Biophys Acta* 2009 ; 1789 : 518-28.
17. Mace K, Giudice E, Gillet R. La synthèse des protéines par le ribosome. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 282-90.



ISBN : 978-2-8425-4131-6 576 pages

Bon de commande

À retourner à EDK, 109, avenue Aristide Briand - 92541 Montrouge Cedex
Tél. : 01 41 17 74 05 - Fax : 01 55 64 13 94 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : Prénom :
 Adresse :
 Code postal : Ville :
 Pays :
 Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Hépatite B** : 54 € + 3 € de port = **57 € TTC** offre exceptionnelle réservée aux abonnés à m/s jusqu'au 31 décembre 2014

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de **EDK**
 Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | | | | |

Rôle du VEGF dans l'épuisement des lymphocytes T intratumoraux

Thibault Voron¹, Éric Tartour^{1,2}, Julien Taieb^{1,3}, Magali Terme¹

¹ Inserm U970, PARCC

(Paris cardiovascular research center),
Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité,
56, rue Leblanc, 75015 Paris, France ;

² Service d'immunologie biologique,
hôpital européen Georges Pompidou, AP-HP,
20, rue Leblanc, 75015 Paris, France ;

³ Service d'hépatogastroentérologie et d'oncologie digestive,
hôpital européen Georges Pompidou, AP-HP, 20, rue Leblanc,
75015 Paris, France.

magali.term@inserm.fr

thibault.voron@gmail.com



> La reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire et la capacité de ce dernier à réprimer le développement des tumeurs ont été évoquées il y a plus d'un siècle par Paul Ehrlich (1909), puis reformulées en 1957 par Sir Macfarlane Burnet et Lewis Thomas sous le concept d'immunosurveillance antitumorale. Il a toutefois fallu attendre la fin des années 1990, et l'amélioration des modèles pré-cliniques immunodéficients, pour que certaines équipes réexplorent l'influence du système immunitaire dans le contrôle du cancer et valident ce concept d'immunosurveillance. Ce concept est, à l'heure actuelle, à la base des études d'immunologie antitumorale. Cependant, les cellules tumorales acquièrent progressivement des propriétés leur permettant d'échapper à la surveillance continue du système immunitaire. Parmi ces propriétés, la capacité à induire un microenvironnement immunosuppresseur¹ favorisant l'accumulation de cellules immunorégulatrices, telles que les lymphocytes T régulateurs (Treg) et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) [1], ainsi que l'inhibition des fonctions des lymphocytes T CD8⁺ (LT CD8⁺) effecteurs [2]. Cette perte de fonction, appelée « épuisement » (*exhaustion*), est associée à l'expression de molécules de costimulation inhibitrices telles que *program cell death-1* (PD-1), *T-cell immunoglobulin and mucin 3 domain* (TIM-3), *cytotoxic T lymphocyte antigen* (CTLA-4) ou *lymphocyte activation gene 3* (LAG-3). La liaison de ces molécules à leurs ligands (présents dans le microenvironnement

tumoral) aboutit à une perte graduelle des fonctions des LT CD8⁺ infiltrant les tumeurs (prolifération, production de cytokines, cytotoxicité). Au sein de ce microenvironnement tumoral, le *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-A a longtemps été étudié pour ses propriétés proangiogéniques, c'est-à-dire favorisant le développement de vaisseaux sanguins au niveau de la tumeur. Des traitements antiangiogéniques, ciblant, entre autres, le VEGF ou ses récepteurs, ont été développés (tels que le bevacizumab, un anticorps monoclonal anti-VEGF) et sont actuellement utilisés en clinique. Cependant, le VEGF-A possède également des propriétés immunomodulatrices favorisant l'échappement des cellules tumorales à la surveillance par le système immunitaire (induction de Treg et cellules myéloïdes suppressives) [3].

Le blocage de la voie VEGF-A/VEGF-R est suffisant pour diminuer l'expression de PD-1 à la surface des lymphocytes T CD8⁺ infiltrant la tumeur

Plusieurs études laissent supposer un rôle de la voie VEGF-A/VEGFR dans l'épuisement des LT CD8⁺ infiltrant la tumeur et dans l'expression, à leur surface, de molécules de costimulation inhibitrices telles que PD-1. D'une part, Ozao-Choy *et al.* avaient montré que l'administration de sunitinib (inhibiteur de tyrosine kinase multicible bloquant VEGF-R1, -R2, -R3, PDGFRa [*platelet-derived growth factor receptor*], PDGFRb, FLT3 et c-kit [deux récepteurs de facteurs de croissance, FLT3L et la *stem cell factor*, respectivement]) à des souris porteuses de tumeurs limitait l'expression de l'ARNm codant pour PD-1

au niveau des lymphocytes infiltrant les tumeurs [4]. D'autre part, des études *in vitro* avaient révélé que le VEGF pouvait diminuer la fonctionnalité de lymphocytes T humains (prolifération) [5, 6]. Nous avons donc émis l'hypothèse que la voie VEGF-A/VEGFR pouvait être impliquée dans l'épuisement des LT CD8⁺ intratumoraux. Afin d'analyser l'effet du blocage de la voie VEGF-A/VEGFR sur l'épuisement des LT CD8⁺, nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'impact de différents antiangiogéniques, ciblant la voie VEGF-A/VEGFR (sunitinib ou anti-VEGF-A murin) ou non (masitinib), sur l'expression de PD-1 à la surface des LT CD8⁺ infiltrant une tumeur colique CT26 greffée par voie sous-cutanée et produisant de fortes quantités de VEGF-A. Nous avons ainsi observé que seuls les traitements antiangiogéniques bloquant cette voie VEGF-A/VEGFR induisaient une diminution de l'expression de PD-1 à la surface des LT CD8⁺ infiltrant la tumeur, contrairement à un traitement par masitinib, alors même que le ralentissement de la croissance tumorale était similaire quel que soit l'antiangiogénique administré [7]. De plus, cette diminution de l'expression de PD-1 sur les LT CD8⁺ était associée à une restauration de fonction (production d'interféron gamma [IFN γ]). Enfin, lorsque le traitement par anti-VEGF-A était associé à une élimination des LT CD8⁺ (par l'utilisation d'un anticorps anti-CD8), l'effet du traitement anti-VEGF-A était moindre. Ces premiers résultats laissent donc supposer que l'effet antitumoral observé après traitement par anti-VEGF-A n'était pas simplement lié à une activité antiangiogénique, mais également à un effet stimulant

¹ Voir à ce propos le numéro thématique publié par *médecine/sciences* en avril 2014 sur « Microenvironnements tumoraux : conflictuels et complémentaires ».

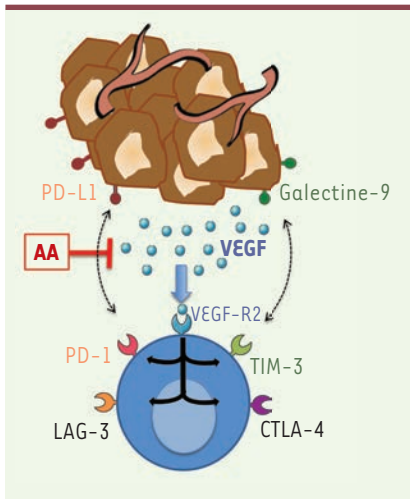


Figure 1. Le VEGF produit par la tumeur est impliqué dans l'épuisement des LT CD8⁺ cytotoxiques.

Le VEGF sécrété par la tumeur augmente l'expression des molécules de costimulation inhibitrices (PD-1, TIM-3, CTLA-4, LAG-3) à la surface des LT CD8⁺ infiltrant la tumeur, via le VEGFR2. Cet effet peut être inhibé par l'utilisation de molécules anti angiogéniques (AA) ciblant la voie VEGF-A/VEGFR. La liaison de ces molécules de costimulation inhibitrices à leurs ligands, présents dans le microenvironnement tumoral (PD-L1 et galectine-9, les ligands de PD-1 et TIM-3 étant exprimés en partie par les cellules tumorales, les ligands de CTLA-4 et LAG-3 étant exprimés par les cellules présentatrices d'antigène présentes dans le microenvironnement tumoral), induit l'épuisement de ces LT CD8⁺.

sur l'immunité antitumorale, et que le VEGF-A pouvait moduler l'expression de PD-1 à la surface des LT CD8⁺.

Le VEGF-A agit directement sur l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD8⁺ activés

Afin de déterminer si le VEGF-A avait une action directe sur les LT CD8⁺, nous avons évalué l'expression des récepteurs du VEGF-A (VEGF-R1 et VEGF-R2) sur les LT CD8⁺ *in vivo*. Nous avons ainsi observé que seuls les LT CD8⁺ infiltrant les tumeurs exprimaient VEGF-R1 et VEGF-R2, contrairement aux LT CD8⁺ spléniques de souris naïves ou porteuses de tumeurs. La stimulation, par des doses croissantes d'anticorps anti-CD3, de LT CD8⁺ purifiés à partir de la rate de souris naïves per-

mettait d'induire l'expression de VEGF-R1 et -R2 à leur surface. Cela suggère que l'expression des récepteurs du VEGF était associée à l'activation des lymphocytes. Dans ces mêmes conditions, l'ajout de VEGF-A permettait d'augmenter l'expression de PD-1 à la surface des LT CD8⁺.

Le VEGF-A module le degré d'épuisement des lymphocytes T cytotoxiques infiltrant la tumeur

Bien que PD-1 soit la molécule de co-stimulation inhibitrice principalement associée à l'épuisement des lymphocytes T, son expression membranaire peut également refléter une activation transitoire de ces lymphocytes [8]. D'autres molécules de costimulation inhibitrices ont été associées à l'épuisement des lymphocytes, telles que TIM-3, CTLA-4 et LAG-3 [9]. De façon intéressante, nous avons mis en évidence, *in vitro*, que non seulement le VEGF-A modulait directement l'expression de PD-1 à la surface des LT CD8⁺ activés, mais qu'il était également responsable d'une augmentation de l'expression d'autres molécules de costimulation inhibitrices (TIM-3, CTLA-4) et d'une augmentation de la densité de ces molécules (TIM-3, CTLA-4 mais aussi LAG-3) [7]. De plus, le VEGF-A favorisait la coexpression simultanée de ces molécules, qui est associée à un degré d'épuisement plus important du lymphocyte [7]. Afin de valider le rôle modulateur de la voie VEGF-A/VEGFR sur l'épuisement des lymphocytes T cytotoxiques, nous avons ensuite évalué l'intérêt d'un traitement par anti-VEGF-A en mesurant l'expression de ces récepteurs associés à l'épuisement des LT CD8⁺ infiltrant des tumeurs sous-cutanées, mais également hépatiques. L'administration d'un anti-VEGF-A permettait de réduire la proportion de LT CD8⁺ intratumoraux coexprimant trois ou quatre molécules de costimulation inhibitrices.

Intérêt d'une combinaison thérapeutique associant un anti-VEGF-A à un anti-PD-1

Avec le développement récent de nouvelles stratégies d'immunothérapies

anticancéreuses bloquant les molécules de costimulation inhibitrices (anti-CTLA-4, anti-PD-1) et offrant des réponses objectives prolongées, les stratégies thérapeutiques visant à restaurer une immunité antitumorale efficace semblent prometteuses. Toutefois, ces réponses objectives ne sont pas observées chez tous les patients (31 % de réponses objectives dans le mélanome avec un anti-PD-1 [10] et 11 % avec un anti-CTLA-4 [11, 12]), suggérant que chez certains patients, cette restauration de l'immunité pourrait être insuffisante. En diminuant la proportion de LT CD8⁺ épuisé, exprimant différentes molécules de costimulation inhibitrices, un traitement par anti-VEGF-A pourrait permettre d'accroître la sensibilisation des tumeurs à des immunomodulateurs tels que l'anti-PD-1. Afin de tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord analysé l'effet d'un traitement par anti-PD-1 sur des sarcomes murins produisant du VEGF (MEF [*murine embryonic fibroblasts*] ou non (MEF-KO)). De façon intéressante, l'effet antitumoral de l'anti-PD1 n'était observé que sur les tumeurs MEF-KO, ce qui suggère que le VEGF-A intratumoral limitait l'action de l'anti-PD-1. De la même manière, le traitement par anti-PD-1 seul paraissait inefficace sur les tumeurs CT26, alors qu'une association anti-PD-1 + anti-VEGF-A avait un effet antitumoral supérieur à celui d'un traitement par anti-VEGF-A seul [7].

Conclusion

L'ensemble de ces résultats montrent pour la première fois le rôle clé, et direct, du VEGF-A présent dans le microenvironnement tumoral sur l'épuisement des LT CD8⁺ intratumoraux (Figure 1), et suggère un effet synergique de l'association d'un anti-VEGF-A à un anti-PD1. Deux essais cliniques associant le bévaccizumab (anti-VEGF) à un anti-PD-1 sont en cours pour évaluer l'intérêt d'une telle combinaison dans le cancer du rein métastatique (NCT02348008) et dans



le cancer pulmonaire non à petites cellules métastatique (NCT02039674). **Impact of VEGF-A in exhaustion of intratumoral T cells**

LIENS D'INTÉRÊT

Julien Taieb déclare participer à des activités de conseil et colloques pour l'entreprise Roche.

Thibault Veron, Éric Tartour et Magali Terme déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été financés et soutenus par Roche, Pfizer, Association pour la recherche contre le cancer, Ligue contre le cancer, et association des gastroentérologues oncologues. Thibault Veron a été financé par l'association Benoit Malassagne, la société française de chirurgie digestive, l'assistance publique-hôpitaux de Paris (APHP-FERCM). Magali Terme a été financée par le site de

recherche intégré sur le cancer -programme cancer research for personalized medicine (CARPEM), l'association des gastroentérologues oncologues, le labex immuno-oncology.

RÉFÉRENCES

1. Bruchard M, Ghiringhelli F. Microenvironnement tumoral : cellules régulatrices et cytokines immunosuppressives. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 429-35.
2. Galon J, Bindea G, Mlecnik B, et al. Microenvironnement immunitaire et cancer : intérêt de l'immunoscore pour prédire l'évolution clinique. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 439-44.
3. Voron T, Marcheteau E, Pernot S, et al. Control of the immune response by pro-angiogenic factors. *Front Oncol* 2014 ; 4 : 70.
4. Ozao-Choy J, Ma G, Kao J, et al. The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. *Cancer Res* 2009 ; 69 : 2514-22.
5. Gavalas NG, Tsiatas M, Tsitsilonis O, et al. VEGF directly suppresses activation of T cells from ascites secondary to ovarian cancer via VEGF receptor type 2. *Br J Cancer* 2012 ; 107 : 1869-75.
6. Ziogas AC, Gavalas NG, Tsiatas M, et al. VEGF directly suppresses activation of T cells from ovarian cancer patients and healthy individuals via VEGF receptor type 2. *Int J Cancer* 2012 ; 130 : 857-64.
7. Voron T, Colussi O, Marcheteau E, et al. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8⁺ T cells in tumors. *J Exp Med* 2015 ; 212 : 139-48.
8. Badoual C, Hans S, Merillon N, et al. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res* 2013 ; 73 : 128-38.
9. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, et al. Coregulation of CD8⁺ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* 2009 ; 10 : 29-37.
10. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* 2014 ; 32 : 1020-30.
11. Wolchok JD, Neyns B, Linette G, et al. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol* 2010 ; 11 : 155-64.
12. Robert C, Mateus C. Anticorps anti-CTLA-4 : une avancée thérapeutique majeure dans le traitement du mélanome métastatique. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 850-8.

NOUVELLE

Le dernier sursaut des cellules mourantes

Étape clé de la morphogénèse tissulaire

Bruno Monier^{1,2}, Melanie Gettings^{1,2}, Guillaume Gay³, Thomas Mangeat^{1,2}, Sonia Schott^{1,2}, Ana Guarner⁴, Magali Suzanne^{1,2}

¹ Université de Toulouse, UPS, LBCMCP, F-31062 Toulouse, France ;

² CNRS, LBCMCP, F-31062 Toulouse, France ;

³ DamCB, Data Analysis and Modelling for Cell Biology, 13005 Marseille, France ;

⁴ Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, Nicolás Cabrera 1, Cantoblanco, 28049 Madrid, Espagne.

magali.suzanne@univ-tlse3.fr

L'apoptose, sculpteur passif de formes cellulaires

L'apoptose - ou mort cellulaire programmée - est un processus cellulaire essentiel dont la dérégulation peut entraîner de nombreuses pathologies [1]. Elle joue un rôle majeur dans la prévention naturelle du développement d'un cancer au sein d'un organisme, par l'élimination de cellules endommagées ou mal placées. En effet, l'inhibition de l'apoptose permet aux cellules cancéreuses de survivre, malgré leur localisation aberrante et leur prolifération anormale. Au contraire, l'excès d'apoptose peut entraîner le développement de maladies

neurodégénératives. Ainsi, l'apoptose apparaît comme un processus cellulaire qui doit être finement régulé.

Outre son rôle dans différents contextes pathologiques, l'apoptose est essentielle au cours du développement [2, 3]. C'est d'ailleurs dans ce contexte qu'elle a été initialement identifiée chez des organismes modèles tels que le ver à soie et le têtard. Il a ensuite été montré que ce phénomène était extrêmement conservé au cours de l'évolution. En effet, son déclenchement repose sur l'activation de protéases spécifiques appelées caspases, retrouvées dans la chaîne évolutive du ver à soie jusqu'aux

mammifères, et qui se chargent de dégrader de façon coordonnée les différentes structures cellulaires [4]. Cette dégradation progressive aboutit à la formation de corps apoptotiques constitués de débris des différents organites enveloppés d'une membrane. Ces corps apoptotiques permettent une élimination « propre » des cellules, sans déversement du contenu cellulaire à l'extérieur, et donc sans inflammation ; ils seront ensuite éliminés par les macrophages.

Au cours du développement, l'apoptose permet de réguler le nombre de cellules au sein d'un tissu, mais aussi de sculpter

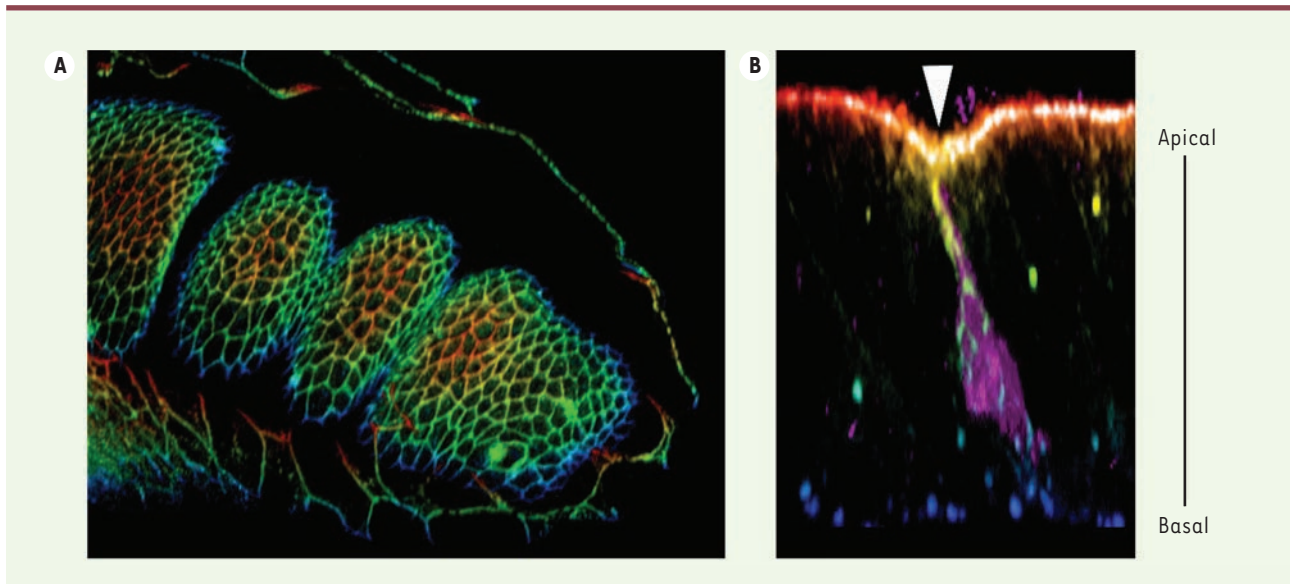


Figure 1. Analyse de l'apoptose au cours du processus de développement de la patte de drosophile. **A.** Modèle de remodelage tissulaire dépendant de l'apoptose : tissu de patte en cours de développement. Le code couleur permet de différencier des éléments situés à différentes profondeurs dans le tissu. **B.** Cellule débutant le processus de mort cellulaire programmée ou apoptose, reconnaissable par le marquage violet (qui marque l'activité des caspases, protéases spécifiquement activées lors de l'apoptose). Dans cette cellule, on observe une structure particulière formée par le cytosquelette d'acto-myosine (dégradé vert-jaune-orange) qui est responsable de la génération d'une force spécifiquement dans la cellule mourante, entraînant la déformation apicale de l'épithélium (tête de flèche blanche).

différentes structures [2, 3]. Parmi les différents modèles de morphogenèse dépendant de l'apoptose (cœur, intestin, mains), la formation des doigts chez les vertébrés a été très étudiée. Selon ces études, l'apoptose, par la simple élimination de cellules, agirait comme un sculpteur sur pierre qui élimine progressivement de petits fragments afin de révéler une nouvelle forme. Dans ce modèle, le rôle de l'apoptose sur son environnement était considéré comme essentiellement passif, se bornant à la simple élimination des cellules qui n'étaient plus nécessaires [5]. Les travaux de notre équipe révèlent, que loin d'être une simple élimination passive de cellules, la mort cellulaire programmée ou apoptose intervient activement dans la morphogenèse.

Le rôle actif de l'apoptose dans la morphogenèse tissulaire chez la drosophile

C'est dans ce contexte de morphogenèse - ou changement de forme tissulaire - que le processus d'apoptose est étudié dans notre équipe. Nous avons montré que loin de se limiter à l'élimination

pure et simple de cellules, l'apoptose joue un rôle actif dans le remodelage tissulaire, notamment dans la formation de plis au sein d'un épithélium au cours du développement. Afin de tester l'influence des cellules apoptotiques sur leur environnement, nous avons utilisé comme modèle d'étude la patte de Drosophile [6]. Ce modèle présente de nombreux avantages. Tout d'abord, l'apoptose y survient de façon spontanée (il n'est pas nécessaire de l'induire artificiellement) et stéréotypée à un moment précis - au tout début de la métamorphose - et à un endroit précis - au niveau des futures articulations de la patte. Un second avantage est la disponibilité de nombreux outils génétiques et un temps de génération court chez ces drosophiles, qui permettent de disséquer la fonction de différents gènes aisément. Enfin, le tissu de la patte en cours de développement peut être mis en culture et son développement suivi au cours du temps directement par observation au microscope, ce qui permet d'aborder la dynamique du processus à différentes

échelles, tissulaire, mais aussi cellulaire (Figure 1 A-B).

En utilisant ce modèle, nous avons montré que chaque cellule apoptotique génère avant de mourir une force reposant sur la formation d'un câble apico-basal contractile d'acto-myosine (l'un des principaux moteurs moléculaires responsables des changements de forme cellulaire). La contraction de ce câble entraîne la déformation transitoire de la surface apicale de l'épithélium, et, en conséquence, une augmentation de tension dans les cellules voisines. Finalement, la synergie de plusieurs cellules apoptotiques dans un domaine restreint permet une augmentation de tension suffisante pour entraîner la formation d'un pli, étape clé dans le remodelage tissulaire ou morphogenèse [7].

Afin de tester si ces forces apoptotiques constituent le signal initial responsable du changement de forme du tissu, un modèle biophysique de l'épithélium a été élaboré en collaboration avec la société DamCB. Dans ce

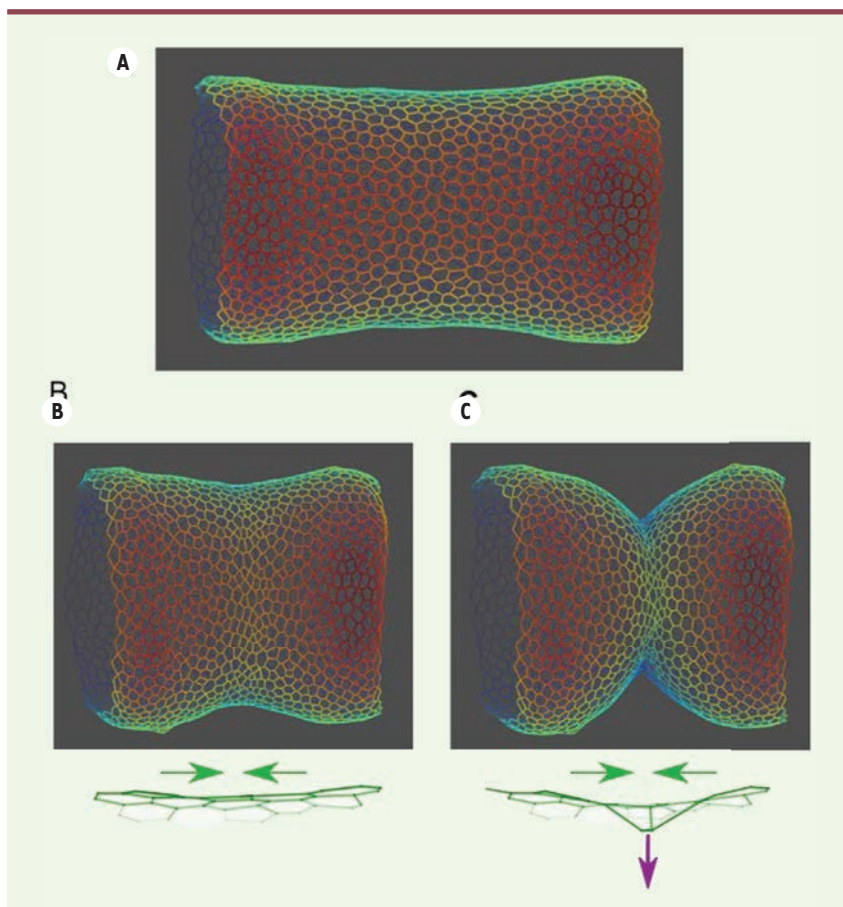


Figure 2. Modélisation de l'épithélium en cours de remodelage. **A.** Modèle de tissu de patte avant l'élimination des cellules apoptotiques. **B.** Modèle de tissu après la disparition de 30 cellules apoptotiques, en présence d'une contraction apicale (flèches vertes) mais en l'absence de force apico-basale. **C.** Modèle de tissu après la disparition de 30 cellules apoptotiques, en présence d'une force apico-basale (flèche violette) et d'une contraction apicale (flèches vertes).

modèle théorique tridimensionnel, il a été montré que les forces apoptotiques (force apico-basale suivie de sa propagation apicale) sont à la fois nécessaires et suffisantes pour entraîner la formation d'un pli. Le modèle permet d'explorer des situations hypothé-

tiques inaccessibles *in vivo* : le pli ne se forme pas dans le modèle si, toutes choses égales par ailleurs, la force de traction apico-basale n'est pas exercée (Figure 2). Le modèle montre aussi la robustesse de l'enchaînement des évènements conduisant à la forma-

tion du pli, suggérant que ce nouveau mécanisme pourrait survenir dans tout type d'épithélium [7, 8].

Ce travail constitue une avancée importante avec, notamment, la démonstration que les cellules apoptotiques peuvent jouer un rôle moteur dans la morphogenèse. L'apoptose est également impliquée chez les vertébrés dans la courbure du tube neural, et son absence peut entraîner des malformations nommées *spina bifida*. Il sera donc très intéressant de déterminer si les cellules mourantes génèrent également une force dans les cellules mammifères, dans des contextes développementaux et pathologiques. ♦

The last surge of cell death, the key stage of the tissular morphogenesis

RÉFÉRENCES

1. Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* 2011 ; 147 : 742-58.
2. Suzanne M, Steller H. Shaping organisms with apoptosis. *Cell Death Differ* 2013 ; 20 : 669-75.
3. Penaloza C, Lin L, Lockshin RA, Zakeri Z. Cell death in development: shaping the embryo. *Histochem Cell Biol* 2006 ; 126 : 149-58.
4. Crawford ED, Wells JA. Caspase substrates and cellular remodeling. *Annu Rev Biochem* 2011 ; 80 : 1055-87.
5. Montero JA, Hurlé JM. Sculpturing digit shape by cell death. *Apoptosis* 2010 ; 15 : 365-75.
6. Manjón C, Sánchez-Herrero E, Suzanne M. Sharp boundaries of Dpp signalling trigger local cell death required for Drosophila leg morphogenesis. *Nat Cell Biol* 2007 ; 9 : 57-63.
7. Monier B., Gettings M, Gay G, et al. Apico-basal forces exerted by apoptotic cells drive epithelium folding. *Nature* 2015 ; 518 : 245-8.
8. Yamaguchi Y, Miura M. How to form and close the brain: insight into the mechanism of cranial neural tube closure in mammals. *Cell Mol Life Sci* 2013 ; 70 : 3171-86.



Tarifs d'abonnement m/s - 2014

Abonnez-vous

à médecine/sciences

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement page 492 dans ce numéro de m/s



L'enfer après le plaisir

Contribution de l'habénula latérale aux symptômes dépressifs des drogues

Kristina Valentinova^{1,2,3*}, Anna Tchenio^{1,2,3*}, Frank J. Meye^{1,2,3}, Salvatore Lecca^{1,2,3}, Manuel Mameli^{1,2,3}

¹ Institut du Fer à Moulin, bâtiment Inserm, 8-10, rue des Fossés-Saint-Marcel, 75005 Paris, France ;

² Inserm, UMR-S 839, 75005 Paris, France ;

³ Université Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France.

kristina.valentinova@inserm.fr

manuel.mameli@inserm.fr

anna.tchenio@inserm.fr

* Les deux auteurs ont eu une contribution égale.

> La prise de drogue est initialement associée à l'euphorie qu'elle engendre. Au niveau cellulaire, cela implique une libération accrue et rapide de la dopamine, connue comme le « neuromodulateur du plaisir ». Cet effet hédonique s'oppose à des états émotionnels négatifs intenses, tels que l'anxiété et la dépression, qui se manifestent lors de périodes de manque [1]. Cette brève revue a pour but de décrire les connaissances actuelles de ces effets négatifs des drogues, leur importance dans l'addiction, et les circuits neuronaux les sous-tendant. En particulier, nous détaillerons l'importance de l'habénula latérale et ses adaptations neurophysiologiques, à la lumière des résultats de nos travaux récemment publiés dans *Nature Neuroscience* [2].

Les symptômes dépressifs dans l'addiction

Des symptômes d'anxiété et de dépression ont été rapportés par les individus présentant une addiction à la cocaïne pendant la période de manque [3]. L'émergence d'états négatifs après l'administration de cocaïne chez les rongeurs [4] suggère que des symptômes similaires peuvent être observés chez des modèles animaux. En effet, le syndrome de manque chez le rat est marqué par une perte d'intérêt pour les récompenses naturelles (alimentaires ou sexuelles) [5]. Selon la théorie des processus

opposés, les états négatifs induits par les drogues seraient dus à une adaptation des circuits neuronaux codant un message « d'anti-récompense » [1]. Notamment, des études *in vivo* chez le rat montrent une réduction des taux extracellulaires de dopamine lors du sevrage [6].

L'usage de drogues n'est pas en soi un comportement addictif. De même, l'installation d'une addiction ne dépend pas uniquement de la prise répétée de drogue, mais est tributaire de plusieurs facteurs, notamment l'environnement dans lequel la substance est consommée ainsi que la vulnérabilité individuelle [15] et le type de drogue (Figure 1A-B) (→). Seuls environ 20 % des utilisateurs développent une addiction

(→) Voir page ??? de ce numéro

[7]. Celle-ci correspond à la transition d'une consommation contrôlée et occasionnelle de drogues à une consommation excessive, et ce, en dépit de la connaissance de ses conséquences négatives. À plus long terme, la recherche ou la prise de drogues deviennent irrésistibles et compulsives, c'est la perte de contrôle associée à l'émergence d'états émotionnels négatifs, qui marquent le stade tardif et complet de l'addiction sévère [1] (Figure 1A). L'aspect négatif devient de plus en plus prédominant avec la prise chronique de drogue. La consommation de drogue pour supprimer l'état aversif pourrait jouer un rôle important dans l'installation de l'addiction, son maintien et les rechutes [1]. Cette hypothèse a justifié l'utilisation d'antidépresseurs, qui, malgré leur faible

efficacité, diminuent dans certains cas la consommation et l'envie irrésistible de drogues lors du sevrage chez les cocaïnomanes [3].

La compréhension des mécanismes moléculaires de ces effets négatifs reste incomplète, les circuits neuronaux impliqués sont mal connus, ce qui explique qu'aucun traitement rapide et efficace contre ces effets négatifs n'ait été proposé.

Le cerveau et l'effet des drogues : des molécules aux circuits

Au cours de ces dernières années, plusieurs modifications cellulaires induites par la prise répétée de drogues ont été identifiées ainsi que leurs conséquences au niveau des circuits neuronaux. Parmi celles-ci, la modulation de la force des synapses - structures dédiées à la communication entre les neurones - semble cruciale dans l'effet des drogues. Ce processus, appelé plasticité synaptique, conduit à un apprentissage inadapté des actions liées à la prise et à la recherche de drogue [8]. Cette plasticité aberrante touche en particulier les structures cérébrales liées à la libération de dopamine, qui constituent le système de la récompense.

Le circuit de la récompense a pour rôle de favoriser des comportements adaptés à la survie de l'individu ; il est composé des structures méso-cortico-limbiques (aire tegmentale ventrale, cortex préfrontal, noyau accumbens (NAc) (Figure 1C). Au centre de ce circuit se situe l'aire tegmentale ventrale, qui libère la dopamine au niveau du noyau accumbens et du cortex préfrontal. De nombreuses modifications ont été identifiées au niveau

Voir la série « addiction » que publie *médecine/sciences* depuis le numéro d'avril 2015, et notamment l'article de M. Arrango-Lievano et M.G. Kaplitt, page ??? de ce numéro [15].

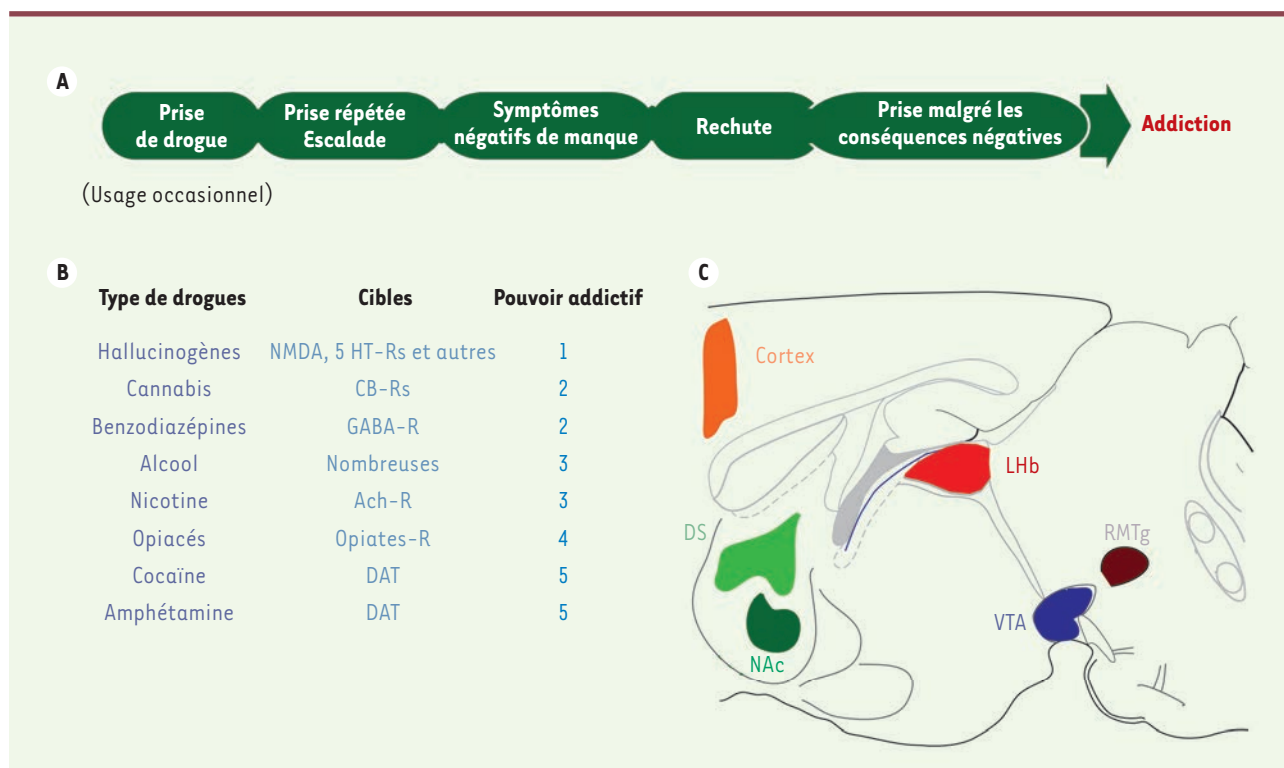


Figure 1. Les drogues, leurs cibles au niveau du cerveau et la transition vers l'addiction. **A.** Les différentes phases de l'addiction. **B.** Comparaison de différents types de drogues selon leur cible et leur pouvoir addictif. **C.** Structures du circuit de la récompense impliquées dans les effets des drogues : le cortex, le striatum dorsal (DS) et ventral (noyau accumbens ; NAc), l'habénula latérale (LHb), le noyau rostro-médio-tegmental (RMTg) et l'aire tegmentale ventrale (VTA).

de cette structure en réponse à une exposition aux drogues. Ainsi, une seule injection de cocaïne suffit à augmenter la fonction synaptique des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale projetant sur le noyau accumbens. On parle de potentialisation synaptique [9]. Lors d'une exposition prolongée, la cocaïne induit une plasticité synaptique persistante au niveau de cette aire, responsable d'une réorganisation fonctionnelle au niveau du noyau accumbens. L'ensemble de ces modifications contribue à l'émergence d'une recherche compulsive de drogue [10]. Dans ce contexte de réorganisation des circuits neuronaux, on peut se demander si un contrôle en amont pourrait être responsable des perturbations au niveau de l'aire tegmentale ventrale.

Il a été démontré que les neurones de l'habénula latérale (LHb) communiquent directement ou indirectement avec

l'aire tegmentale ventrale. Ces neurones réduisent l'activité des neurones dopaminergiques via l'activation des neurones GABAergiques inhibiteurs du noyau tegmental rostromédial (RMTg) [11] (Figure 2AB). De plus, l'habénula latérale contrôle des comportements aversifs et sous-tend la formation de souvenirs associés à des événements négatifs via sa connexion avec le noyau tegmental rostromédial [12]. Ces deux actions de l'habénula latérale, le contrôle qu'elle exerce sur le système de récompense et son rôle dans le traitement des informations aversives, suggèrent que cette structure pourrait jouer un rôle dans les effets négatifs des drogues. Cette hypothèse est confortée par de récentes données. L'étude *in vivo* chez le rat réalisée par Jhou et ses collègues [13] révèle une réponse des neurones de l'habénula latérale à la cocaïne 15 à 25 minutes après l'exposition à cette drogue. Cette

augmentation d'activité des neurones dans cette région correspond au codage d'états aversifs [13]. Cette même étude précise que les neurones de l'habénula latérale activés par la cocaïne projettent spécifiquement vers le noyau tegmental rostromédial (neurones LHb-RMTg) qui inhibe les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale. En accord avec ces observations, notre équipe a démontré que cette connexion entre l'habénula latérale et le noyau tegmental rostromédial est une cible importante dans les effets de la cocaïne [14].

Cocaïne, habénula latérale et symptômes dépressifs

Dans notre étude récemment publiée, nous avons utilisé un test courant pour étudier les états de type dépressif chez la souris, le test de nage forcée (*forced swim test*, FST). Les souris sont plongées dans l'eau et les critères mesurés sont le

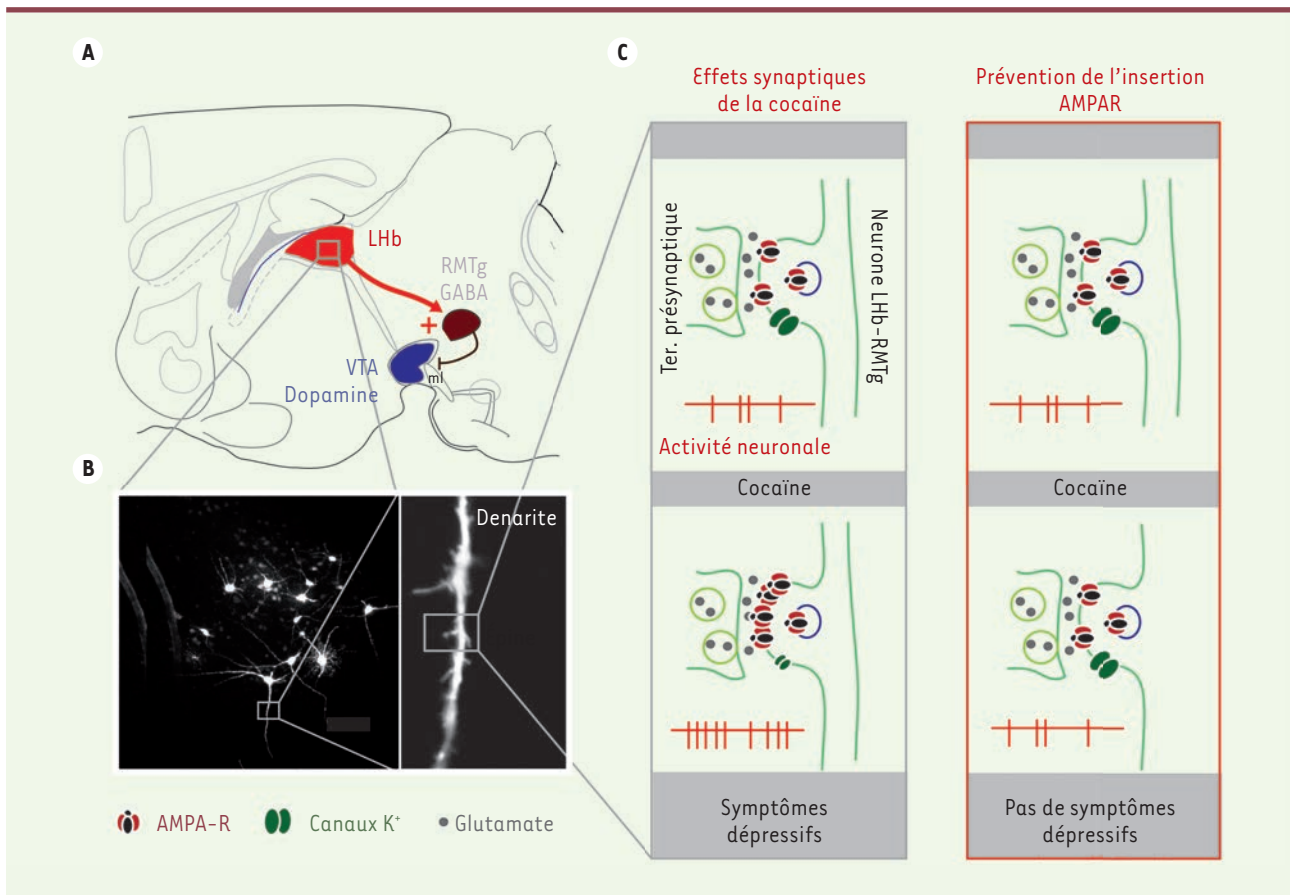


Figure 2. Rôle de l'habenula latérale dans les effets dépressifs de la cocaïne. **A.** Contrôle du système dopaminergique par l'habenula latérale (LHb). La LHb excite les neurones du noyau rostro-médio-tegmental (RMTg) qui, eux-mêmes, inhibent l'aire tegmentale ventrale. **B.** Image des neurones de la LHb et grossissement de leurs dendrites et de leurs épines. **C.** Effet de la cocaïne au niveau des synapses de la LHb. La cocaïne induit une insertion des récepteurs AMPA à la membrane synaptique, une diminution de l'activité des canaux potassiques, et une augmentation de l'activité neuronale, nécessaires à l'émergence des comportements dépressifs (à gauche). En perturbant l'insertion des récepteurs AMPA à la synapse, on prévient les effets de la cocaïne sur les canaux potassiques, l'activité neuronale ainsi que les symptômes dépressifs émergeant lors du manque (à droite). Ter. présynaptique : terminaison présynaptique

temps d'immobilité et de nage. Une augmentation du temps d'immobilité reflète une perte de motivation et un état dépressif. Dans notre étude, nous avons exposé des souris à la cocaïne de façon chronique ; cette période était suivie d'un temps de sevrage à la suite duquel les souris étaient soumises au test de nage forcée. Nous avons constaté que ces animaux restent immobiles plus longtemps, ce qui indique la présence de symptômes dépressifs.

Nous nous sommes ensuite demandé si des modifications au niveau de l'habenula latérale pouvaient être à l'origine de ces états. Nous avons constaté une augmentation durable de la trans-

mission excitatrice sur les neurones de l'habenula qui se projettent sur le noyau tegmental rostromédial. Parallèlement, nous avons observé une augmentation de la décharge de ces neurones accompagnée d'une réduction de la fonction des canaux potassiques, des acteurs fondamentaux pour l'activité neuronale. Ces données sont en accord avec le rôle de cette connexion entre l'habenula latérale et le noyau tegmental rostromédial dans les comportements aversifs [13].

Un résultat majeur de cette étude réside dans l'identification d'un mécanisme moléculaire qui permet d'expliquer ces modifications. En effet, nous avons

trouvé que la cocaïne provoquait l'insertion des récepteurs au glutamate (AMPA) à la membrane synaptique (Figure 2C, à gauche). En perturbant ce mécanisme, nous avons empêché la mise en place des changements cellulaires induits par la cocaïne dans les neurones de l'habenula qui se projettent sur le noyau tegmental rostromédial (Figure 2C, à droite). De plus, cette intervention était suffisante pour supprimer le comportement dépressif qui suit le sevrage des animaux de la cocaïne.

L'ensemble de ces résultats suggèrent une relation causale entre des modifications cellulaires dans l'habenula latérale et les symptômes



comportementaux dépressifs émergeant lors de périodes de manque. Cette étude contribue à la compréhension des mécanismes impliqués dans les différentes phases menant à l'addiction. **◇**

Hell after the pleasure: drug-induced negative symptoms involve lateral habenula

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Koob GF, Le Moal M. Addiction and the brain antireward system. *Annu Rev Psychol* 2008 ; 59 : 29-53.
2. Meye FJ, Valentinova K, Lecca S, et al. Cocaine-evoked negative symptoms require AMPA receptor trafficking in the lateral habenula. *Nat Neurosci* 2015 ; 18 : 376-8.
3. Gawin FH. Cocaine addiction: psychology and neurophysiology. *Science* 1991 ; 251 : 1580-6.
4. Ettenberg A. Opponent process properties of self-administered cocaine. *Neurosci Biobehav Rev* 2004 ; 27 : 721-8.
5. Barr AM, Markou A, Phillips AG. A crash course on psychostimulant withdrawal as a model of depression. *Trends Pharmacol Sci* 2002 ; 23 : 475-82.
6. Weiss F, Paulus MP, Lorang MT, et al. Increases in extracellular dopamine in the nucleus accumbens by cocaine are inversely related to basal levels: effects of acute and repeated administration. *J Neurosci* 1992 ; 12 : 4372-80.
7. Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV. Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science* 2004 ; 305 : 1014-7.
8. Lüscher C, Malenka RC. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 2011 ; 69 : 650-63.
9. Lammel S, Ion DI, Roeper J, et al. Projection-specific modulation of dopamine neuron synapses by aversive and rewarding stimuli. *Neuron* 2011 ; 70 : 855-62.
10. Mameli M, Halbout B, Creton C, et al. Cocaine-evoked synaptic plasticity: persistence in the VTA triggers adaptations in the NAc. *Nat Neurosci* 2009 ; 12 : 1036-41.
11. Ji H, Shepard PD. Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABA(A) receptor-mediated mechanism. *J Neurosci* 2007 ; 27 : 6923-30.
12. Stamatakis AM, Stuber GD. Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance. *Nat Neurosci* 2012 ; 15 : 1105-7.
13. Zhou TC, Good CH, Rowley CS, et al. Cocaine drives aversive conditioning via delayed activation of dopamine-responsive habenular and midbrain pathways. *J Neurosci* 2013 ; 33 : 7501-12.
14. Maroteaux M, Mameli M. Cocaine evokes projection-specific synaptic plasticity of lateral habenula neurons. *J Neurosci* 2012 ; 32 : 12641-6.
15. Arango-Lievano M, Kaplitt MG. Comorbidité entre la dépression et l'addiction : vers une cible moléculaire commune ? *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : ???-???

NOUVELLE

Identification de Toddler/Elabela ou la double vie du récepteur de l'apéline

Jean Lesage, Delphine Eberlé, Christophe Breton

Unité environnement périnatal et santé, EA4489, Université de Lille 1, bâtiment SN4, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.
jean.lesage@univ-lille1.fr
delphine.eberle@univ-lille1.fr
christophe.breton@univ-lille1.fr

En 1993, O'Dowd *et al.* [1] identifièrent, par clonage d'une banque génomique humaine, un récepteur orphelin de 380 acides aminés appartenant à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G et qui partageait 30 % d'identité de séquence protéique avec le récepteur de type 1 des angiotensines (AT1). Ce récepteur fut nommé APJ pour protéine putative reliée au récepteur AT1. Cinq ans plus tard, Tatemoto *et al.* [2] isolèrent un ligand endogène de ce récepteur à partir d'extraits d'estomac de bœuf qui fut dénommé apéline. Il existe de nombreuses formes moléculaires de l'apéline dérivant de son précurseur (la proapéline), et qui sont fortement conservées dans de nombreuses espèces de mammifères et chez l'homme. La pré-proapéline est un précurseur de 77 acides aminés qui

donne naissance par clivage à différentes isoformes moléculaires d'apéline comme l'apéline-36, l'apéline-17, l'apéline-13 et sa forme pyroglutamylée (pyr-Apl-13) ou encore l'apéline-12. Ces formes partagent toutes une conservation stricte de leurs 12 derniers acides aminés carboxy-terminaux (Figure 1) nécessaires à la liaison au récepteur APJ [10] (→). Le système apélinergique (apéline et APJ) est exprimé dans de très nombreux tissus et particulièrement dans le cœur, les poumons, l'endothélium vasculaire, les reins, le cerveau et les tissus adipeux. Plusieurs formes moléculaires (majoritairement l'apéline-13) sont circulantes et confèrent le statut d'hormone à l'apéline. Une décennie d'études a démontré que le système apélinergique est impliqué dans

(→) Voir la Synthèse de B. Masri *et al.*, *m/s* n° 3, mars 2015, page 275.

des fonctions biologiques très variées. Il joue notamment un rôle particulièrement important dans le maintien de l'homéostasie du système cardiovasculaire, dans la régulation hydrominérale et celle du métabolisme énergétique [3].

Biologie du récepteur APJ et découverte de Toddler/Elabela

Depuis sa découverte, de nombreuses études ont démontré que le récepteur APJ présente des fonctions singulières comme par exemple la capacité d'être activé par simple étirement dans les cardiomyocytes, de former des hétérodimères avec d'autres récepteurs comme avec celui de l'angiotensine 1 induisant l'inhibition d'AT1, ou encore de fonctionner comme un corécepteur permettant l'entrée du virus VIH-1 (virus de l'immunodéficience

Formes moléculaires de l'apéline

Proapéline (apéline-55)	GSLMPLPDGNGLEDGNVRHLVQPRGSRNGPGPWQGGRRKFRRQ	RPRLSHKGPMPF
Apéline-36	LVQPRGSRNGPGPWQGGRRKFRRQ	RPRLSHKGPMPF
Apéline-17		KFRRQRPRLSHKGPMPF
Pyr-apéline-13		Pyr-RPRLSHKGPMPF
Apéline-13		QRPRLSHKGPMPF
Apéline-12		RPRLSIKGPMPF

Formes moléculaires de Toddler/Elabela

Preprotodder (Toddler-54)	MRFQQFLFAFFIFIMSLLLISGQEPVNLTMRRKLRKHNC	QRRCMPLHSRVVFPF
Protodder (Toddler-32)	QEPVNLTMRRKLRKHNC	QRRCMPLHSRVVFPF
Toddler-22	KLRKHNC	QRRCMPLHSRVVFPF
Toddler-11		CMPLHSRVVFPF

Figure 1. Formes moléculaires des différents ligands de APJ. Les séquences des peptides dérivés de l'apéline chez l'homme et du peptide Toddler/Elabela, les deux ligands endogènes du récepteur APJ, sont figurées. L'alignement des séquences montre une conservation stricte des 12 derniers acides aminés pour l'apéline et des 11 derniers pour Toddler/Elabela, sans homologie de séquences entre ces deux facteurs.

humaine) dans des cellules humaines [4]. La liaison des isoformes peptidiques de l'apéline à APJ entraîne une très large gamme de réponses biochimiques : citons l'inhibition de la production d'AMPc, la phosphorylation de la protéine kinase B (Akt), de ERK 1/2, de P70S6K, la mobilisation de calcium intracellulaire, ou la synthèse de monoxyde d'azote ; ces actions pouvant être spécifiques de tissus, mais aussi spécifiques des isoformes de l'apéline qui sont incriminées dans les tissus et les y induisent [4]. Récemment, la découverte concomitante par deux groupes de recherche d'un nouveau ligand peptidique endogène d'APJ, dénommé Elabela [5] ou Toddler [6], et identifié chez le poisson zèbre, ajoute un niveau de complexité supplémentaire à ce système.

Implication de Toddler/Elabela dans la gastrulation et la cardiogénèse

Chez la souris, on savait que l'inactivation du gène codant le récepteur APJ causait la mort précoce de près de 50 % des embryons en raison de profondes altérations cardiaques et vasculaires [7]. En revanche, les souris ayant une inactivation génique du gène codant le ligand apéline naissaient en bonne santé, sans pathologie cardiovasculaire [8]. Cette discordance indiquait

l'existence probable d'un autre ligand endogène d'APJ durant le développement embryonnaire. De fait, deux études indépendantes et simultanées, menées l'une par une équipe américaine [6] et l'autre par des chercheurs de Singapour [5], ont récemment identifié un nouveau ligand peptidique circulant d'APJ chez le poisson zèbre, baptisé Toddler ou Elabela. Ces auteurs se sont intéressés à des séquences génomiques très courtes contenant des cadres de lecture, mais qui étaient jusqu'alors considérées comme des gènes non codants. Des expériences d'inactivation et une démarche de caractérisation peptidique leur a permis d'identifier de nouveaux facteurs impliqués dans le développement embryonnaire du poisson zèbre. L'équipe de Pauli *et al.* [6] a montré que la perte de fonction du peptide Toddler/Elabela ou sa surexpression inhibent les mouvements cellulaires d'épibolie¹ durant la gastrulation de l'œuf, ce qui perturbe la mise en place du mésoderme. Dans cette étude publiée dans le journal *Science*, les chercheurs ont aussi démontré que Toddler/Elabela est un peptide sécrété qui gouverne l'orientation précoce des cellules embryonnaires vers les pôles animal ou végétatif durant

la gastrulation, ce qui fait de Toddler/Elabela la toute première hormone du développement identifiée. On considérerait en effet jusqu'à maintenant que les étapes précoces de division cellulaire de l'œuf fécondé n'étaient gouvernées que par un programme génétique complexe, et ne faisait pas intervenir de peptides/hormones sécrétés.

L'étude menée à Singapour par Chng *et al.* [5] a également observé cette implication de Toddler/Elabela dans les migrations cellulaires au cours de la gastrulation. Mais ces chercheurs se sont ensuite focalisés sur le devenir *in vivo* des embryons après l'inactivation de ce peptide. Celle-ci induit de profondes perturbations dans la différenciation de l'endoderme, qui affectent principalement les processus de cardiogénèse ; en l'absence de Toddler/Elabela, les embryons de poisson zèbre ne forment qu'une ébauche rudimentaire de cœur ; parfois le cœur est absent, ce qui est rapidement létal [5]. Enfin, ces auteurs ont montré que, chez le poisson zèbre, l'expression de Toddler/Elabela, forte durant la gastrulation, diminue ensuite parallèlement à l'émergence de l'expression du gène codant l'apéline [6]. Dans cette espèce, le peptide Toddler/Elabela est donc le premier ligand endogène du récepteur APJ, l'apéline venant, dans un second temps, agir

¹ Ce terme désigne les mouvements cellulaires en cause dans la gastrulation chez le poisson zèbre.

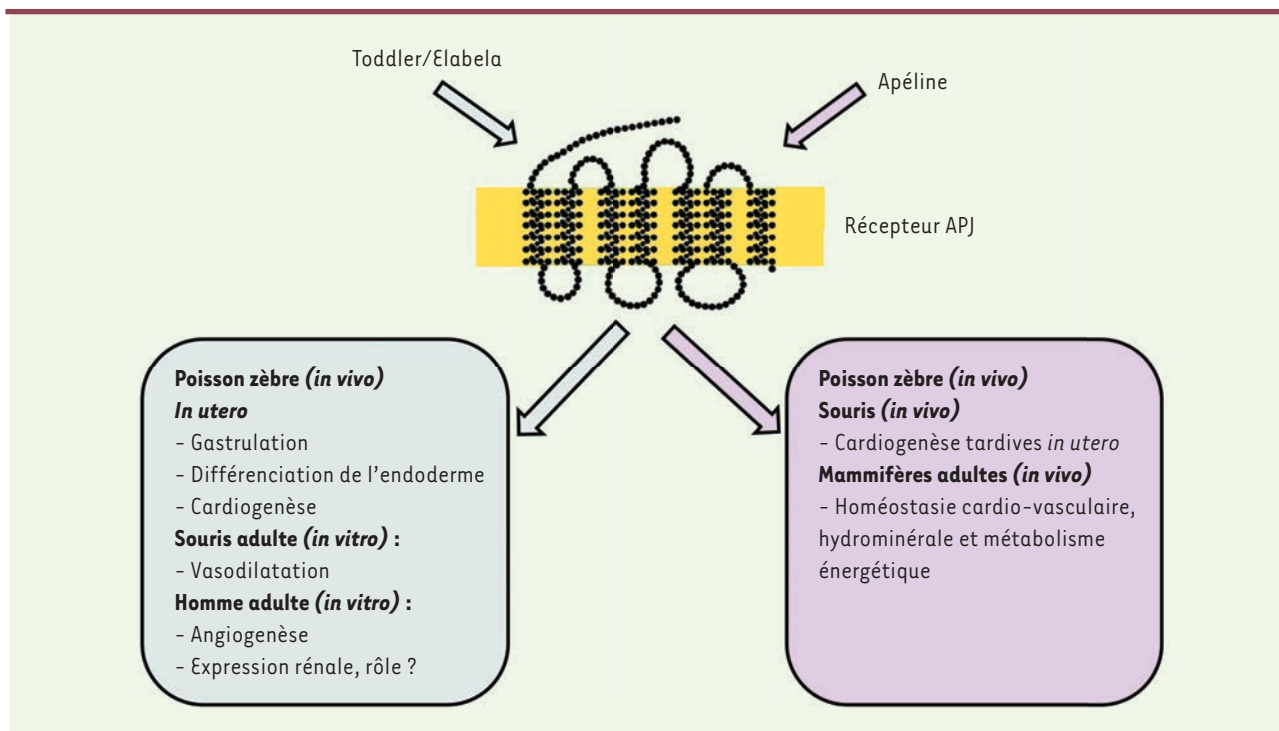


Figure 2. Principales fonctions biologiques de Toddler/Elabela et de l'apéline chez l'homme et dans d'autres espèces.

en synergie avec Toddler/Elabela pour contrôler notamment la formation cardiaque.

Biologie de Toddler/Elabela chez les mammifères et perspectives

Chez le poisson zèbre, Toddler/Elabela est un peptide de 58 acides aminés, avec une forte conservation phylogénétique chez le poussin, la grenouille, la souris, et l'homme, en particulier au niveau de la région carboxy-terminale [5, 6]. Il est donc très probable qu'il intervienne dans le développement du système cardiovasculaire chez les mammifères. Une étude très récente [9] vient de démontrer que les transcrits du gène codant Toddler/Elabela sont détectables dans le rein humain adulte ainsi que dans des cellules souches pluripotentes humaines. L'expression prédominante de Toddler/Elabela dans le rein et dans ces cellules souches semble indiquer que celui-ci pourrait être impliqué - comme facteur paracrine et/ou hormonal - dans la régulation de l'activité rénale et cardiovasculaire chez les mammifères. Ces

auteurs ont aussi démontré [9] qu'un peptide de 32 acides aminés correspondant à la forme maturée et sécrétée de Toddler/Elabela était capable d'induire, *in vitro*, un processus d'angiogenèse chez l'homme et la relaxation de vaisseaux sanguins de souris. Ces processus seraient moins dépendants de l'endothélium que lorsqu'ils sont induits par l'apéline-13, indiquant que les voies de signalisation intracellulaire mises en jeu par ces deux ligands du récepteur APJ pourraient être différentes. Les perspectives suscitées par ces études sont nombreuses. Ce peptide pourrait s'avérer être un nouveau régulateur paracrine, voire endocrine, de nombreuses fonctions physiologiques, en particulier au cours du développement et dans les régulations hydrominérale, cardiovasculaire et métabolique chez les mammifères. ♦

Discovery of Toddler/Elabela ligand and the double life of the apelin receptor

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, *et al.* A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 1993 ; 136 : 355-60.
2. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, *et al.* Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 ; 251 : 471-6.
3. O'Carroll AM, Lolait SJ, Harris LE, Pope GR. The apelin receptor APJ: journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis. *J Endocrinol* 2013 ; 219 : 13-35.
4. Chapman NA, Dupré DJ, Rainey JK. The apelin receptor: physiology, pathology, cell signalling, and ligand modulation of a peptide-activated class A GPCR. *Biochem Cell Biol* 2014 ; 92 : 431-40.
5. Chng SC, Ho L, Tian J, Reversade B. ELABELA: a hormone essential for heart development signals via the apelin receptor. *Dev Cell* 2013 ; 27 : 672-80.
6. Pauli A, Norris ML, Valen E, *et al.* Toddler: an embryonic signal that promotes cell movement via Apelin receptors. *Science* 2014 ; 343 : 1248636.
7. Charo DN, Ho M, Fajardo G, *et al.* Endogenous regulation of cardiovascular function by apelin-APJ. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009 ; 297 : 1904-13.
8. Kuba K, Zhang L, Imai Y, *et al.* Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circ Res* 2007 ; 101 : 32-42.
9. Wang Z, Yu D, Wang M, *et al.* Elabela-apelin receptor signaling pathway is functional in mammalian systems. *Sci Rep* 2015 ; 5 : 8170.
10. Masri B, Dray C, Knauf C, *et al.* Le récepteur de l'apéline. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 275-281.

Implications cliniques de l'immunosénescence dans les maladies rénales chroniques

Jamal Bamoulid^{1,2}, Clémence Carron¹, Thomas Crépin^{1,2}, Philippe Saas¹, Didier Ducloux^{1,2}

¹Inserm U1098, EFS B/FC, Université de Franche-Comté, LabEx LipSTIC, FHU INCREASE, 8, rue JFX Girod, F-25020 Besançon, France ;

²CHRU Besançon, néphrologie, F-25030 Besançon, France. jbamoulid@chu-besancon.fr

> L'insuffisance rénale chronique (IRC) est caractérisée par une perte progressive de la capacité des reins à filtrer le sang avec pour conséquences une accumulation sanguine de toxines urémiques et l'apparition de troubles hydroélectrolytiques. Elle s'accompagne de la perte de certaines fonctions hormonales entraînant l'apparition de troubles phosphocalciques et d'une anémie. Les causes d'insuffisance rénale chronique sont multiples, mais les complications communes : anémie, œdèmes, ostéopathie, augmentation du risque de mortalité, notamment d'origine infectieuse et cardiovasculaire. Au stade d'insuffisance rénale terminale, deux traitements de suppléance sont disponibles : l'épuration extrarénale, encore appelée dialyse, et/ou la transplantation rénale. Alors que la dialyse s'accompagne d'une forte morbi-mortalité, la transplantation rénale améliore la qualité et l'espérance de vie des patients, et reste à ce jour le traitement de choix de l'insuffisance rénale terminale.

Modifications du système immunitaire au cours de l'insuffisance rénale

Des travaux récents suggèrent que les modifications phénotypiques et fonctionnelles du système immunitaire au cours de l'insuffisance rénale chronique pourraient contribuer à l'état inflammatoire chronique décrit chez ces patients et expliquer en partie la surmortalité constatée. En effet, l'insuffisance rénale chronique s'accompagne d'une diminution de l'immunité adaptative dont témoignent la diminution de la réponse vaccinale et

l'augmentation de la susceptibilité aux infections, toutes deux caractéristiques de ce que l'on observe chez les personnes âgées [1]. Carerro *et al.* [2] ont rapporté une augmentation des marqueurs d'immunosénescence (ce terme désigne le vieillissement du système immunitaire) chez les patients en hémodialyse. Cette immunosénescence prématurée serait secondaire au stress oxydatif et au statut inflammatoire chronique, induits à la fois par des facteurs « urémiques » et par les stimulations antigéniques répétées, liées aux matériaux bio-incompatibles utilisés en dialyse. Betjes *et al.* [3] ont confirmé cette association entre insuffisance rénale terminale et immunosénescence prématurée. En revanche, l'immunosénescence est très peu documentée chez les patients après une transplantation rénale. L'amélioration de la fonction rénale et le sevrage de la dialyse pourraient induire une réversibilité de l'immunosénescence après la transplantation.

Immunosénescence : concept et marqueurs immunologiques

L'inflammation chronique et l'activation lymphocytaire sont deux pierres angulaires de l'immunosénescence liée à l'âge. Celle-ci contribue au risque accru de complications dégénératives (cancers, infections) et de mortalité caractérisant les personnes âgées.

L'involution thymique, ou perte de la fonction du thymus, organe impliqué dans l'éducation des lymphocytes T naïfs, est caractéristique de l'immunosénescence [4]. Elle débute dès l'adolescence et se poursuit tout au long de la vie adulte.

Histologiquement, elle se traduit par une transformation grasseuse du tissu thymique, expliquant la réduction constante de la capacité de ce tissu à produire des lymphocytes T naïfs et à maintenir un répertoire immunitaire T polyclonal, garant de l'efficacité du système immunitaire de la réponse à tout nouvel antigène. Cette involution s'accompagne d'altérations de la composition et de la fonction des lymphocytes T : réduction du compartiment de lymphocytes T naïfs, expansion de celui des lymphocytes T mémoires caractérisés par la capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ [interféron], TNF- α [*tumor necrosis factor*]), restriction oligoclonale du répertoire lymphocytaire T, raccourcissement de la taille des télomères des lymphocytes T (sénescence répllicative), diminution de la capacité fonctionnelle des lymphocytes T à contrôler les infections et à répondre aux vaccins [5]. Les lymphocytes T CD4⁺ deviennent plus sensibles à l'apoptose que les lymphocytes T CD8⁺, ce qui conduit à une inversion du rapport CD4/CD8. Certaines données suggèrent également une expansion associée du compartiment des lymphocytes T régulateurs [6]. Les infections virales latentes, en particulier par le cytomégalovirus (CMV), contribuent à l'accélération du phénomène d'immunosénescence par la stimulation antigénique chronique qu'elles entretiennent et qui favorise l'expansion périphérique d'une population oligoclonale de lymphocytes T anti-CMV au détriment des autres populations lymphocytaires T, conduisant ainsi à la perte du caractère polyclonal du répertoire T [5].

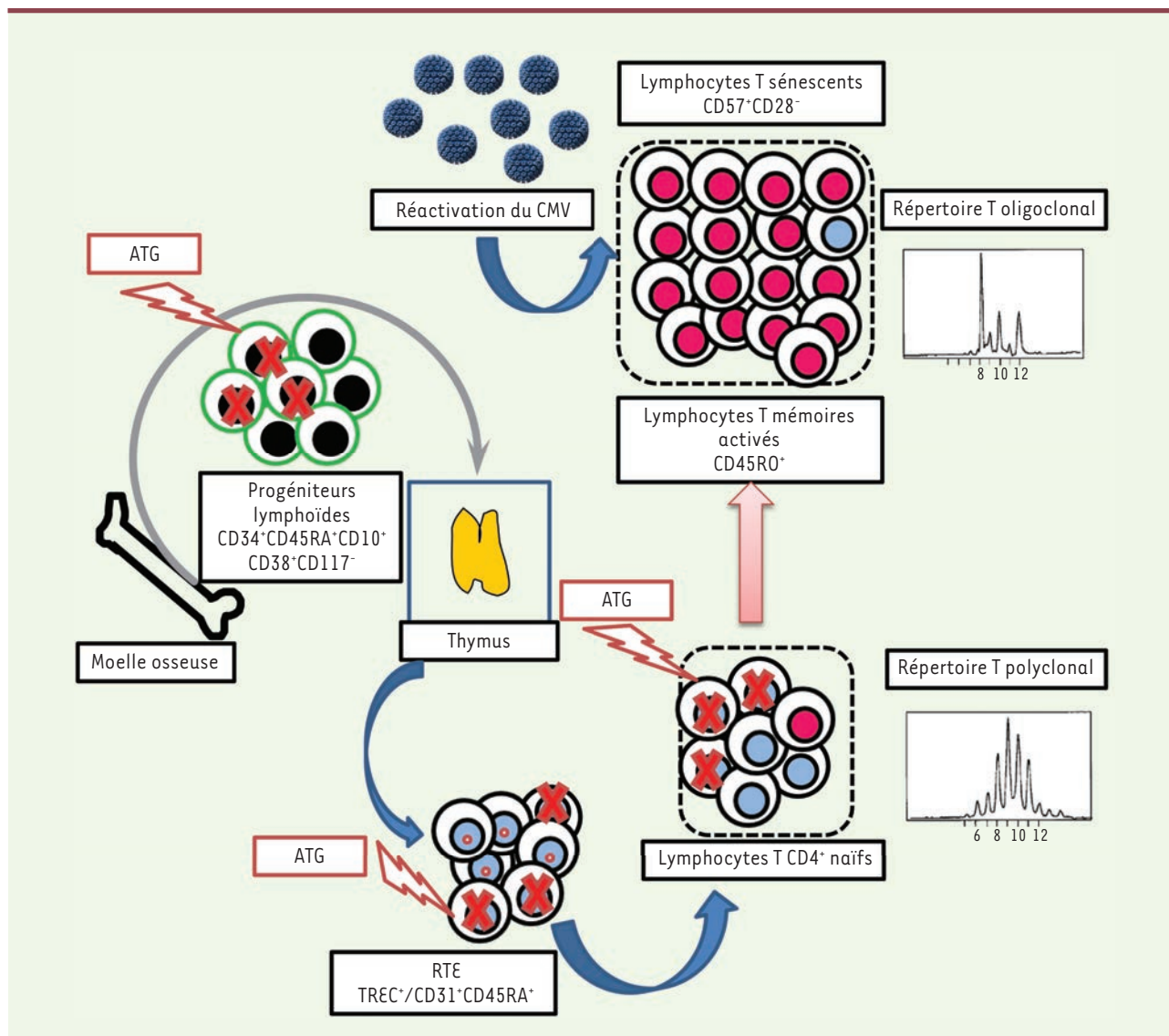


Figure 1. Facteurs contribuant à la persistance ou à l'aggravation de l'immunosénescence accélérée après transplantation rénale. Rôle conjoint de l'ATG (globulines polyclonales antilymphocytaires) sur les progéniteurs lymphoïdes en amont du thymus, sur les RTE (*recent thymic emigrants*, lymphocytes T naïfs émigrant du thymus) et les lymphocytes T CD4⁺ naïfs et du CMV augmentant le *pool* de lymphocytes T mémoires, puis sénescents. TREC : *T cell receptor excision circles*.

Immunosénescence accélérée et états pathologiques

Plusieurs travaux ont mis en évidence un phénomène d'immunosénescence accélérée dans des états pathologiques associés à une inflammation chronique et une morbi-mortalité élevée, proche de celle qui est observée dans la population âgée et la population dialysée. Les patients irradiés, survivants des catastrophes atomiques d'Hiroshima et de Nagasaki, développent une lymphopénie T CD4⁺ prolongée associée à une

augmentation de l'incidence d'infarctus du myocarde [7]. L'analyse des lymphocytes T met en évidence un renouvellement faible des populations naïves et une restriction du répertoire entraînant une altération de l'immunité anti-infectieuse [8]. Le renouvellement à long terme du pool lymphocytaire se fait aux dépens de lymphocytes T CD8⁺ mémoires [9]. Cette reconstitution s'accompagne d'une augmentation des marqueurs d'inflammation (protéine C réactive, IL-6) [10]. Les mêmes observations cli-

niques et immunologiques ont été rapportées dans la lymphopénie induite par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [11]. En outre, l'exposition chronique de cette population immunodéprimée à des pathogènes tels que le CMV accélérerait l'immunosénescence [12].

Immunosénescence et transplantation d'organe

Nous avons récemment confirmé qu'une immunosénescence accélérée existait chez les patients atteints d'insuffisance

réale terminale au moment de la transplantation rénale [13]. On observe ainsi (1) une dysfonction thymique ; (2) une proportion élevée de lymphocytes T sénescents (CD57⁺CD28⁻) ; (3) un raccourcissement de la taille des télomères et une activité télomérase¹ lymphocytaire effondrée. L'amélioration de la fonction rénale et le sevrage de la dialyse induites par la transplantation permettent de corriger – au moins partiellement – l'immunosénescence chez un certain nombre de patients. En revanche, chez d'autres, paradoxalement, l'immunosénescence persiste, voire s'aggrave. Deux facteurs principaux semblent contribuer à ce phénomène : l'utilisation de globulines anti-lymphocytaires polyclonales ou ATG, un traitement de prévention du rejet aigu d'allogreffe qui entraîne une profonde lymphopénie T, et l'infection par le CMV. L'ATG induit : (1) une dysfonction thymique et une diminution du pourcentage des progéniteurs lymphoïdes circulants en amont du thymus ; (2) une augmentation de la proportion des lymphocytes T sénescents, accentuée par la séropositivité pour le CMV ; (3) une augmentation du pourcentage des lymphocytes T régulateurs d'origine périphérique, accentuée par la dysfonction thymique ; (4) la persistance d'un raccourcissement de la taille des télomères et d'une activité télomérase lymphocytaire effondrée (Figure 1). Ces anomalies ne sont pas observées chez des patients transplantés, mais qui ont reçu, comme alternative à l'ATG, un traitement d'induction par basiliximab,

un anticorps monoclonal anti-CD25 bloquant l'activation des lymphocytes T sans entraîner de lymphopénie. Les conséquences cliniques de la persistance ou de l'accélération de l'immunosénescence après l'administration d'ATG restent à éclaircir (toxicité thymique directe ou indirecte, myélotoxicité).

Notre travail montre également que, chez les patients traités exclusivement par ATG, une proportion élevée de lymphocytes T sénescents au moment de la transplantation est associée à un risque plus élevé de maladies à CMV et à une augmentation de l'incidence cumulée de rejets aigus. Ceci suggère que l'ATG accroît les conséquences de ces altérations immunologiques. Un travail récent suggère aussi que l'expansion des lymphocytes T sénescents après transplantation est associée à une dysfonction chronique du greffon rénal à long terme [14]. Le rôle pathogène des lymphocytes T sénescents reste controversé, même s'il est de plus en plus décrit dans diverses maladies auto-immunes ou auto-inflammatoires [15]. Les mécanismes physiopathologiques impliquant ces lymphocytes sont encore mal connus, notamment en transplantation rénale. Enfin, si cette implication était avérée, il resterait néanmoins à découvrir comment prévenir ou inverser ce phénomène. ♦

Clinical consequences of immunosenescence in chronic kidney diseases

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.


RÉFÉRENCES

1. Verkade MA, van de Wetering J, Klepper M, et al. Peripheral blood dendritic cells and GM-CSF as an

adjuvant for hepatitis B vaccination in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2004 ; 66 : 614-21.

2. Carrero JJ, Stenvinkel P, Fellstrom B, et al. Telomere attrition is associated with inflammation, low fetuin-A levels and high mortality in prevalent haemodialysis patients. *J Intern Med* 2008 ; 263 : 302-12.
3. Betjes MG, Langerak AW, van der Spek A, et al. Premature aging of circulating T cells in patients with end-stage renal disease. *Kidney Int* 2011 ; 80 : 208-17.
4. Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing. *J Pathol* 2007 ; 211 : 144-56.
5. Derhovanessian E, Maier AB, Beck R, et al. Hallmark features of immunosenescence are absent in familial longevity. *J Immunol* 2010 ; 185 : 4618-24.
6. Wang L, Xie Y, Zhu LJ, et al. An association between immunosenescence and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: a systematic review. *Biomed Environ Sci* 2010 ; 23 : 327-32.
7. Kusunoki Y, Kyoizumi S, Yamaoka M, et al. Decreased proportion of CD4⁺ T cells in the blood of atomic bomb survivors with myocardial infarction. *Radiat Res* 1999 ; 152 : 539-43.
8. Kusunoki Y, Yamaoka M, Kasagi F, et al. Long-lasting changes in the T-cell receptor V beta repertoires of CD4 memory T-cell populations in the peripheral blood of radiation-exposed people. *Br J Haematol* 2003 ; 122 : 975-84.
9. Yamaoka M, Kusunoki Y, Kasagi F, et al. Decreases in percentages of naive CD4 and CD8 T cells and increases in percentages of memory CD8 T-cell subsets in the peripheral blood lymphocyte populations of A-bomb survivors. *Radiat Res* 2004 ; 161 : 290-8.
10. Hayashi T, Kusunoki Y, Hakoda M, et al. Radiation dose-dependent increases in inflammatory response markers in A-bomb survivors. *Int J Radiat Biol* 2003 ; 79 : 129-36.
11. Deeks SG. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu Rev Med* 2011 ; 62 : 141-55.
12. Hsue PY, Hunt PW, Sinclair E, et al. Increased carotid intima-media thickness in HIV patients is associated with increased cytomegalovirus-specific T-cell responses. *AIDS* 2006 ; 20 : 2275-83.
13. Crépin T CC, Carron C, Roubiou C, et al. ATG-induced accelerated immune senescence: clinical implications in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2015 ; 15 : 1028-38..
14. Yap M, Boeffard F, Clave E, et al. Expansion of highly differentiated cytotoxic terminally differentiated effector memory CD8⁺ T cells in a subset of clinically stable kidney transplant recipients: a potential marker for late graft dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2014 ; 25 : 1856-68.
15. Broux B, Markovic-Plese S, Stinissen P, Hellings N. Pathogenic features of CD4⁺CD28⁻ T cells in immune disorders. *Trends Mol Med* 2012 ; 18 : 446-53.

¹ La télomérase est l'enzyme qui ajoute des répétitions d'ADN télomérique aux extrémités des chromosomes, évitant leur raccourcissement.



Tarifs d'abonnement m/s - 2015


Abonnez-vous

à médecine/sciences

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement

page 492 dans ce numéro de m/s



Vue de l'intérieur

Des circuits génétiques pour l'analyse de profils moléculaires intracellulaires

Nicolas Lapique, Yaakov Benenson

Rencontre entre biologie naturelle et synthétique

La capacité des organismes multicellulaires à coordonner les fonctions de cellules spécialisées est parfois menacée par la dérégulation d'une fonction particulière. Afin d'identifier un dysfonctionnement pouvant être d'origine endogène ou produit par un agent extérieur, l'organisme ne cesse de contrôler une myriade de paramètres pour se tenir prêt à opposer une réponse adaptée au problème. Il peut arriver que le corps produise une meilleure réponse avec l'aide d'un agent médicamenteux, mais il est très rare que les molécules thérapeutiques agissent avec autant de parcimonie et de précision que le système vivant. Il est évidemment souhaitable que les traitements chimiques soient toujours mieux ciblés, et on peut envisager produire des médicaments capables d'analyser leur environnement avant de décider de libérer leur(s) agent(s) actif(s). Dans *Le voyage fantastique*¹, un film de 1966, un traitement « intelligent » avait été imaginé à partir d'un sous-marin qui avait été miniaturisé avec un équipage de scientifiques à bord, le tout injecté chez une personne dans le coma. Avec quatre personnes aux commandes, le vaisseau-médicament pouvait intégrer une quantité innombrable d'informations et, ainsi, agir de manière très ciblée et efficace. Les machines fabriquées de nos jours ont une capacité d'analyse toujours plus grande, mais elles restent très limitées

dans leur capacité de décryptage des réseaux d'informations des systèmes vivants. La construction, à partir des processus d'ingénierie classiques, de « nanomachines » capables de pénétrer dans les cellules et d'interagir avec des molécules présentes en quantités infinitésimales n'est pas une mince affaire. Un système créé à partir de composants biologiques se révèle être généralement bien mieux adapté pour fonctionner dans les cellules. La biologie synthétique est un nouveau domaine de recherche qui applique les principes de l'ingénierie, et crée, à partir des « briques » élémentaires du vivant, un dispositif susceptible d'accomplir une fonction désirée. Grâce à l'unicité du code de la vie, il est possible d'assembler et de connecter entre eux des éléments biologiques provenant du monde bactérien, végétal et animal, pour les faire fonctionner dans une grande variété de cellules appartenant à tous les règnes du vivant. Ces nouvelles « machines biologiques » ont été principalement développées à partir de circuits génétiques : ces circuits sont des ensembles de gènes sensibles à leur environnement et connectés entre eux par des mécanismes d'activation et de répression, dans le but de transmettre une réponse adaptée aux signaux reçus. Des systèmes biosynthétiques ont ainsi été conçus pour des applications très diverses, telles que l'utilisation de bactéries pour stocker de l'information dans leur ADN [1], de l'optogénétique pour stabiliser l'homéostasie du glucose [2, 9] (→) ou encore la reprogrammation de bactéries afin de limi-

Department of Biosystems Science and Engineering, École polytechnique fédérale de Zurich (ETHZ),
Mattenstrasse 26, 4058 Bâle, Suisse.
nicolas.lapique@bsse.ethz.ch

ter leur multiplication dans les tumeurs et détruire les cellules cancéreuses [3]. À partir du concept de calcul biomoléculaire [4], on peut concevoir des systèmes dont la puissance d'analyse est de plus en plus poussée. Dans cet article, nous détaillons les première et seconde générations de circuits génétiques capables d'intégrer le signal d'une demi-douzaine de molécules, afin d'identifier précisément différents types de cellules humaines en fonction des logiques implémentées [5, 6].

Des combinaisons de microARN pour identifier les cellules cancéreuses

De nombreux critères morphologiques, métaboliques ou moléculaires caractérisent les cellules cancéreuses. Leur identification à partir de l'expression de facteurs endogènes tels que les récepteurs, les facteurs de transcription et les microARN est couramment utilisée, et certaines de ces molécules représentent des cibles thérapeutiques. Les microARN sont de courtes séquences d'ARN inhibitrices, qui s'hybrident à un ARN messager cible, et en régulent négativement la concentration et la traduction en protéine. Nous décrivons ici un circuit génétique que nous avons conçu pour analyser la signature microARN des cellules et agir sur celles-ci en fonction de leur profil moléculaire. Le circuit est programmé pour répondre à la détection d'une combinaison de microARN très précise, sous la forme de l'expression d'une molécule fluorescente ou d'une molécule toxique, selon que l'on souhaite respectivement identifier ou tuer les cellules exprimant un profil

¹ Film américain de science-fiction réalisé par Richard Fleischer en 1966.

(→) Voir la Synthèse de G.P. Dugué et L. Tricoire, *m/s* n° 3, 2015, page 291



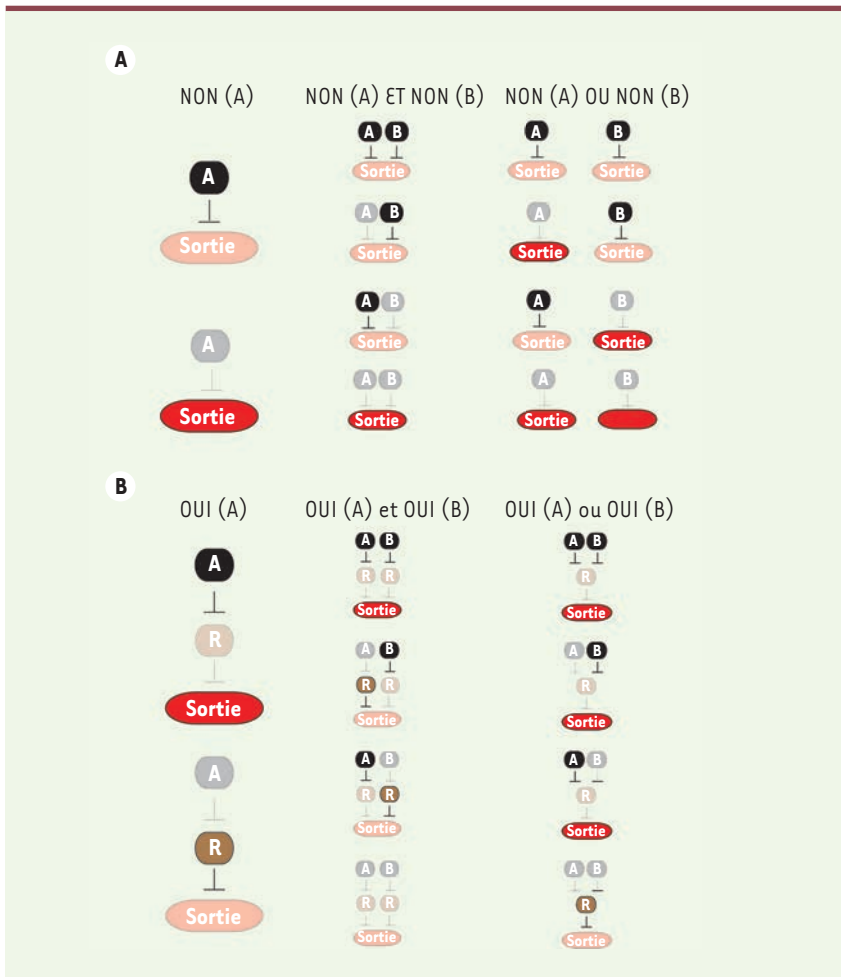


Figure 1. Fonction logique avec des molécules d'entrées répressives. Le(s) signal(aux) d'entrée du circuit est (sont) en noir, le signal de sortie est en rouge et le(s) élément(s) d'inversion du signal en brun(s). La couleur estompée indique l'absence de la molécule. Les connecteurs à extrémité droite indiquent une action de répression. Table de vérité (A) entrée(s) NON ; (B) entrée(s) OUI.

moléculaire prédéfini. Il existe des milliers de microARN différents, et chacune de ces molécules est relativement facile à détecter, car il suffit d'insérer la séquence complémentaire dans n'importe quel gène pour le réguler négativement.

Avec les répresseurs tels que les microARN, la fonction logique la plus évidente à créer est l'opérateur NON, qui signifie qu'une sortie est produite uniquement en l'absence de la molécule d'entrée ; ainsi, en présence du répresseur, la protéine réponse du circuit est réprimée (Figure 1A, gauche). Il n'est pas plus difficile de produire la fonction

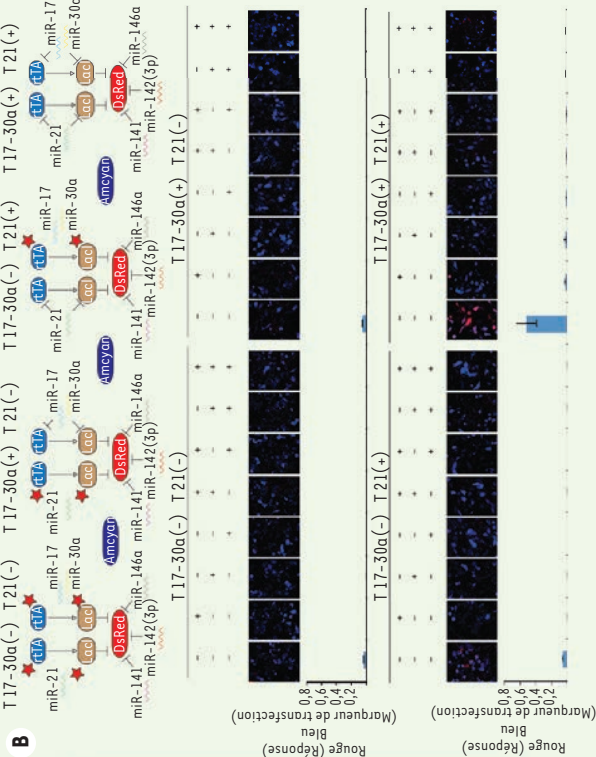
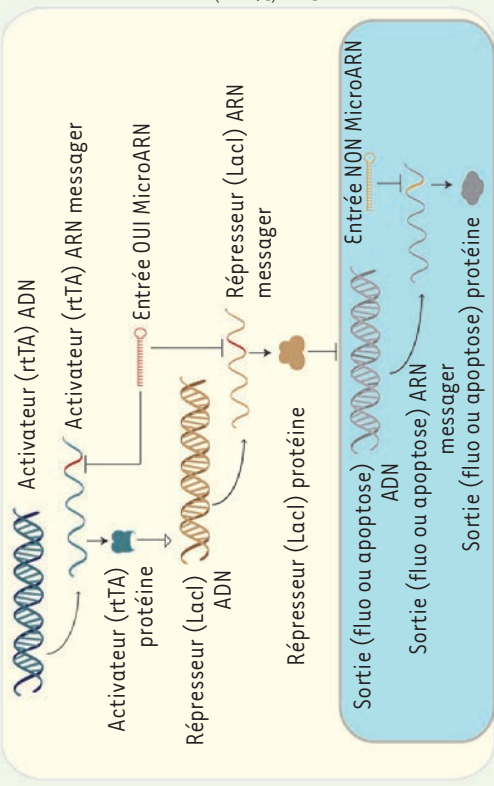
logique ET avec deux opérateurs NON : dans ce cas, une sortie n'est produite qu'en l'absence de deux types de molécules, toutes deux contrôlant négativement la réponse (Figure 1A, centre). Enfin, la fonction OU de deux opérateurs NON produira une réponse dans tous les cas, excepté quand les deux entrées sont présentes (Figure 1A, droite). Pour les fonctions OUI, la sortie n'est pas directement contrôlée par l'entrée, un niveau intermédiaire constitué d'un système répresseur doit être intercalé. L'entrée microARN va réguler négativement un répresseur synthétique, qui, à son tour, va réprimer la production de la sortie.

Ainsi, en présence de l'entrée, le répresseur sera réprimé et un signal sortie sera produit. Inversement, en l'absence d'entrée, le répresseur est présent, ce qui empêche la production de la sortie (Figure 1B, gauche). Comme pour l'opérateur NON, il est également possible d'implémenter des fonctions logiques ET et OU (Figure 1B).

Fonctionnement d'un profileur de microARN cellulaire

L'inversion d'un signal répresseur en signal activateur nécessaire à l'implémentation de la logique OUI du microARN est évidemment la plus complexe, et compose la majeure partie du circuit (Figure 2A) [5]. Le répresseur synthétique est contrôlé négativement tant au niveau transcriptionnel que post-transcriptionnel par le microARN entrée. Pour le premier, le microARN va agir sur un activateur (rtTA) situé en amont qui va agir positivement sur la production du répresseur (LacI), ainsi que sur le répresseur lui-même (Figure 2A encadrement jaune). Les microARN implémentés avec la fonction OUI ciblent directement la sortie en l'empêchant de produire une protéine réponse (Figure 2A, encadrement bleu). Un profil moléculaire de six molécules a été établi à partir d'un atlas d'expression de microARN [7], qui reconnaît spécifiquement une lignée cellulaire dérivée d'un cancer du col de l'utérus (HeLa). Le profil cellulaire peut être décrit sous la forme d'une fonction booléenne, miR-21 ET miR-17-30a ET NON (miR-141) ET NON (miR-142[3p]) ET NON (miR-146a). Avec cinq entrées, il existe 32 configurations possibles, dont 31 doivent rester éteintes (Off) et une seule doit produire une réponse (On). Chacune des possibilités a été testée, et seule la configuration du profil désiré produit le signal voulu (On) (Figure 2B). Lorsque les trois entrées NON sont absentes, on peut observer que la réponse est légèrement produite. Afin d'éliminer au mieux le signal lorsque le profil moléculaire ne

A Détection de micro-ARN OUI



C Circuit miR-21 ET miR-17-30a ET NON (miR-141) ET NON [miR-142(3p)] ET NON (miR-146a)

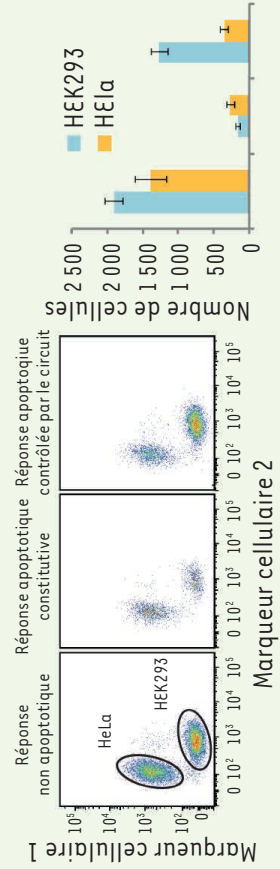
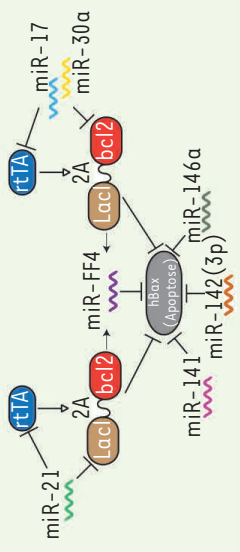


Figure 2. Première génération de profileur de microARN. Dans les schémas, les flèches en arête indiquent la transcription (ADN → ARNm), les flèches à pointes noires indiquent la traduction (ARNm → protéine), les flèches à pointes blanches indiquent une activation et les connecteurs à extrémité droite indiquent la répression. **A.** Schéma de fonctionnement d'un circuit détectant un microARN OUI et un microARN NON. **B.** En haut, les schémas montrent les circuits utilisés pour tester les différents profils de microARN, les étoiles indiquent que le module est rendu insensible au microARN. En bas, sont montrés les résultats de la table de vérité avec les niveaux correspondants des signaux réponses. Sur les photographies d'analyse en microscopie, la réponse apparaît en rouge et le marqueur de transfection indiquant la présence du circuit dans la cellule apparaît en bleu. **C.** Circuit avec une réponse apoptotique pour éliminer les cellules HeLa. La figure centrale montre un graphique de cytométrie de flux utilisé pour identifier et compter les cellules. La réponse non apoptotique est une molécule fluorescente, la réponse apoptotique constitutive est la protéine hAx exprimée sans contrôle, la réponse apoptotique contrôlée par le circuit est la protéine hAx régulée par le circuit montré dans le schéma de gauche.

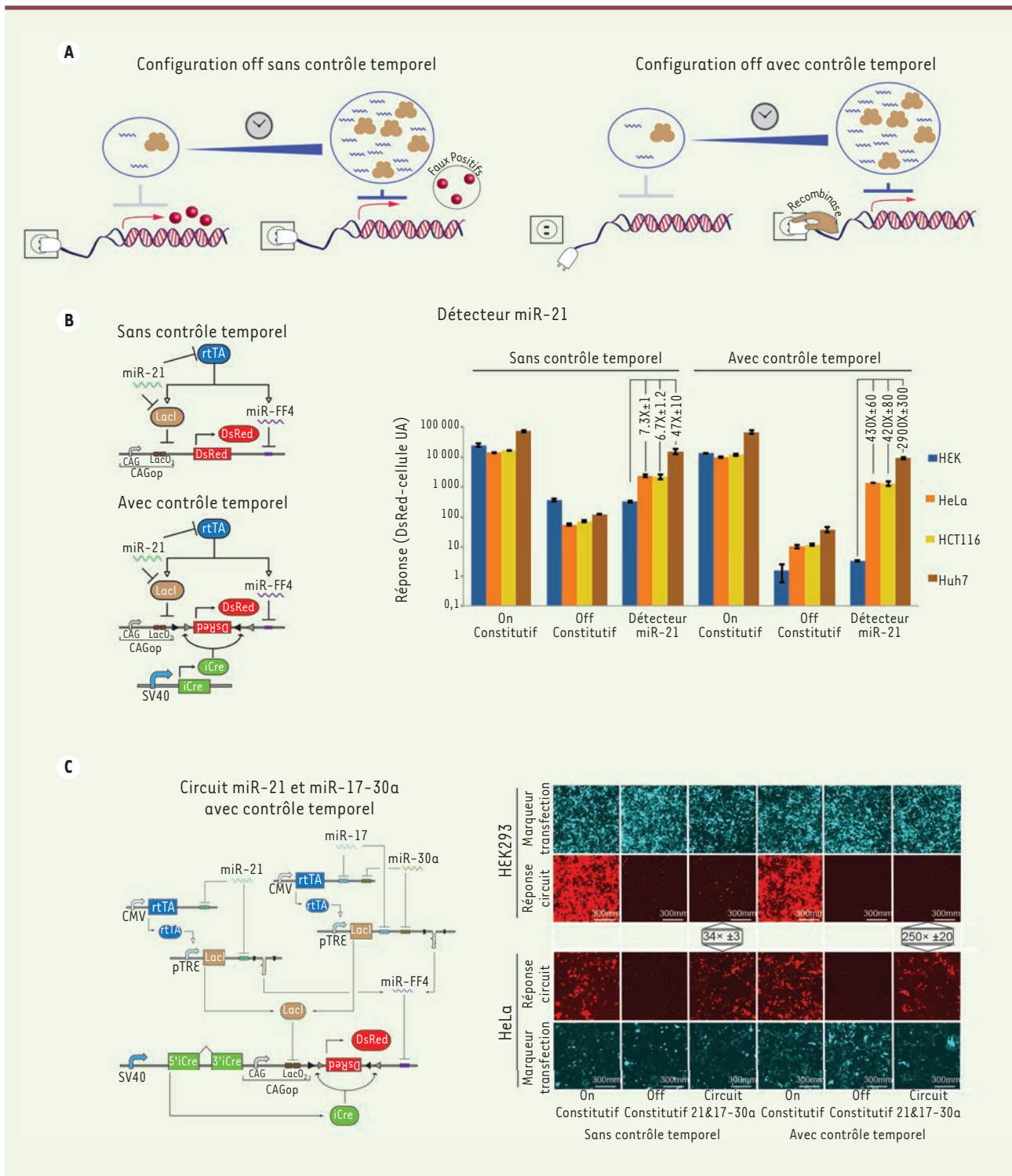


Figure 3. Deuxième génération de profil de microARN. **A.** Le schéma de gauche illustre le problème de « fuite » de la réponse, avant que les régulateurs soient pleinement opérationnels. Le schéma de droite illustre l’allumage tardif de la réponse pour permettre l’accumulation de modules régulateurs. **B, C.** Comparaison des performances du circuit avec et sans contrôle temporel. On constitutif indique la production de la réponse sans contrôle, Off constitutif indique la répression de la réponse sans contrôle, et détecteur miR-21 ou circuit 21/17-30a indiquent l’expression différentielle de la réponse en fonction du type cellulaire. **B.** À gauche, les schémas montrent les modules détecteur de miR-21 avec (bas) et sans (haut) contrôle temporel et leurs performances respectives (droite). **C.** À gauche, le schéma montre le circuit classificateur de cellule HeLa avec contrôle temporel, et les performances illustrées avec des prises de vues au microscope.



correspond pas (Off), un second répresseur a été ajouté sous la forme d'un microARN synthétique (miR-FF4) épissé à partir de l'ARN messager du premier répresseur (Figure 2C). La réponse de ce système prend la forme d'une protéine apoptotique (hBax), dont l'expression déclenche la mort cellulaire. L'action de hBax a été atténuée par une molécule antidote (Bcl-2), qui sera détruite par certains microARN lorsque la réponse est produite. La spécificité et la sensibilité du circuit génétique ont été testées sur des cellules non cancéreuses issues de rein embryonnaire (HEK-293), mélangées à des cellules cancéreuses HeLa (cancer du col de l'utérus). Dans l'enchevêtrement cellulaire *in vitro*, le circuit parvient à identifier et éliminer les cellules cancéreuses tout en préservant les autres (Figure 2C).

Pour dépasser la preuve de concept, il était important de comprendre pourquoi le circuit se déclenchait dans certaines cellules qui ne contiennent pas le bon profil moléculaire (~10 %), ce qui constituait un faux positif. En étudiant la dynamique de production du circuit grâce à la cytométrie de flux, nous avons observé que l'immense majorité des erreurs étaient produites lors de la phase d'assemblage du circuit [6] (Figure 3A, haut). Les composants régulateurs tels que rtTA, LacI, miR-FF4 mettent un certains temps (4-6 h) avant d'être pleinement opérationnels. Durant ce laps de quelques heures, le circuit n'est soumis à aucun contrôle. L'état par défaut de la réponse étant allumé, le circuit produit la molécule de sortie à pleine puissance avant d'être progressivement régulé par le module répresseur lorsque ce dernier atteint la concentration optimale. Un méca-

nisme retardant la production de la réponse a été introduit, de façon à ce que la cellule contienne suffisamment de molécules de contrôle lorsque la réponse commence à être produite (Figure 3A, bas). Ce retard est généré par l'intermédiaire d'une recombinaison génétique [8] : initialement la réponse est en position inversée, ce qui empêche sa synthèse, puis est finalement recombinaisonnée dans le sens de production (Figure 3B, bas). Cette opération – la production de l'enzyme (Cre recombinase) et la recombinaison – requiert un certain temps, ce qui permet d'éliminer presque intégralement les faux positifs. Les modules détectant les microARN ont été testés individuellement, et leur différence d'expression entre les cellules non cancéreuses dépourvues de miR-21 (HEK-293) et les cellules cancéreuses exprimant miR-21 (HeLa, HCT-116 et Huh-7) a été améliorée plus de 50 fois (Figure 3B). Le mécanisme de recombinaison a également été installé dans le circuit d'identification des cellules HeLa, ce qui améliore de près de 10 fois ses performances. Cette nouvelle architecture permet une reconnaissance des cellules de manière digitale en éliminant pratiquement toutes les erreurs d'identification positive. Une configuration du système a également été testée dans laquelle la réponse s'exprime sous la forme d'une molécule extrêmement toxique (HSV-TK), et comme précédemment, le ciblage est sélectif, un seul type cellulaire est éliminé.

Les performances de la seconde génération de circuits permettront d'analyser des profils moléculaires de plus en plus complexes et, ainsi, d'agir sur des types de cellules extrêmement précis. Le circuit présenté ici

a été spécifiquement développé à des fins thérapeutiques pour reconnaître les cellules cancéreuses. De nombreuses autres applications, en recherche comme dans une démarche diagnostique, requièrent une identification cellulaire fiable et robuste. La facilité avec laquelle le circuit peut être programmé pour reconnaître un profil moléculaire particulier permettra bientôt son utilisation dans de très nombreuses applications. ♦

View of the inside: genetic circuits for the analysis of intracellular molecular profiles

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Farzadfard F, Lu TK. Synthetic biology. Genomically encoded analog memory with precise *in vivo* DNA writing in living cell populations. *Science* 2014 ; 346 : 1256272.
2. Ye H, Daoud-El Baba M, Peng RW, Fussenegger M. A synthetic optogenetic transcription device enhances blood-glucose homeostasis in mice. *Science* 2011 ; 332 : 1565-8.
3. Anderson JC, Clarke EJ, Arkin AP, Voigt CA. Environmentally controlled invasion of cancer cells by engineered bacteria. *J Mol Biol* 2006 ; 355 : 619-27.
4. Benenson Y. Biomolecular computing systems: principles, progress and potential. *Nat Rev Genet* 2012 ; 13 : 455-68.
5. Xie ZI, Wroblewska L, Prochazka L, et al. Multi-input RNAi-based logic circuit for identification of specific cancer cells. *Science* 2011 ; 333 : 1307-11.
6. Lapique N, Benenson Y. Digital switching in a biosensor circuit via programmable timing of gene availability. *Nat Chem Biol* 2014 ; 10 : 1020-7.
7. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 2007 ; 129 : 1401-14.
8. Schnütgen F, Doerflinger N, Calléja C, et al. A directional strategy for monitoring Cre-mediated recombination at the cellular level in the mouse. *Nat Biotechnol* 2003 ; 21 : 562-5.
9. Dugué GP, Tricoire L. Principes et applications de l'optogénétique en neuroscience. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 291-303.



Depuis 30 ans déjà, *m/s* vous fait vivre en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

S'abonner, c'est profiter de nombreux avantages

La revue offre à ses lecteurs une grande diversité de textes sur les avancées de la recherche biologique et médicale, nationale et internationale. Elle se compose :

- d'une partie Magazine, reflet de l'actualité scientifique,
- de Synthèses, articles de fond dressant l'état des lieux sur une question scientifique, rédigés par des auteurs spécialistes du domaine,
- d'un Forum accueillant des textes variés d'histoire des sciences, de réflexion sur des questions de société, de sciences sociales et de santé publique, des faits et chiffres, ou des réactions à des articles publiés, tous rédigés avec une grande liberté d'expression,
- d'analyses critiques et de comptes rendus d'ouvrages.



Plus d'infos sur www.medecinesciences.org

OUI Je m'abonne aux 10 numéros/an de *m/s* (2015, vol. 31)

Nom - Prénom :

Institution :

Adresse :

CP Localité : Pays :

Tél. : E-mail (obligatoire) :

PRIX TVA 2,1%	Institutions		Individuels		Étudiants*		Enseignants*	
	P + E	E	P + E	E	P + E	E	P + E	E
France	○ 528 € HT 539,09 € TTC	Nous contacter	○ 230 € TTC	○ 137 € TTC	○ 122 € TTC	○ 81 € TTC	○ 152 € TTC	○ 108 € TTC
Reste de l'U.E.	○ 644 € HT 657,52 € TTC		○ 312 € TTC		○ 172 € TTC		○ 262 € TTC	
Reste du Monde	○ 668 €		○ 312 €	○ 135 €	○ 194 €	○ 79 €	○ 282 €	○ 107 €

Paiement Envoyez-moi une facture proforma
 Chèque joint (à l'ordre d'EDP Sciences)
 Carte de crédit : Visa Eurocard American Express

N° de carte _____ Date de validité _____ Code crypto _____

P + E : Papier et Électronique / E : Électronique seule

Date : / /

Signature : _____

* joindre un justificatif