

NOUVELLE

Les facteurs de virulence ciblent des protéines clés de l'interactome de l'hôte

Anne-Ruxandra Carvunis, Matija Dreze

Center for Cancer Systems Biology (CCSB) and Department of Cancer Biology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA 02215, États-Unis; Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, États-Unis. anne-ruxandra_carvunis@dfci.harvard.edu

> Les plantes jouent un rôle central dans la plupart des écosystèmes par leur capacité à convertir l'énergie solaire en énergie « biologique ». Unique source d'oxygène gazeux sur terre, les plantes représentent aussi la source principale de l'alimentation humaine et fournissent carburants fossiles et fibres textiles. Pour répondre aux défis agronomiques et environnementaux présents et futurs, il est primordial d'acquérir une connaissance approfondie des mécanismes contrôlant les processus biochimiques et moléculaires retrouvés spécifiquement chez les plantes. À cette fin, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux interactions entre plantes et phytopathogènes à l'échelle moléculaire. En plus de perspectives agronomiques et environnementales évidentes, nos travaux suggèrent l'existence de principes universels régissant l'organisation des systèmes immunitaires lors d'une interaction hôte-pathogène.

Interactions entre plantes

et phytopathogènes: le modèle zigzag Vingt ans de recherche fondamentale utilisant l'Arabette des dames (Arabidopsis thaliana) comme organisme modèle ont abouti à un concept surnommé zigzag, décrivant à l'échelle moléculaire les interactions dynamiques entre cellules végétales et phytopathogènes [1]. La détection de molécules du « nonsoi » par des récepteurs membranaires déclenche une première ligne de défense immunitaire générique, le « zig ». Néanmoins, de nombreux pathogènes sont capables d'injecter à l'intérieur des cel-

lules végétales des effecteurs moléculaires qui, affaiblissant l'effet du zig, augmentent la susceptibilité à l'infection : le « zag ». En réponse, des récepteurs intracellulaires semblent pouvoir reconnaître le « soi modifié » et provoquer une seconde vague de défense immunitaire, un second zig. Le degré de résistance des plantes aux pathogènes dépend de l'amplitude de ces deux lignes de défense, ainsi que de l'intensité de l'attaque.

Malgré son élégance, le modèle zigzag repose sur des hypothèses qui pour la plupart n'ont pas été démontrées systématiquement. En particulier, l'identité des acteurs du système immunitaire demeure largement inconnue, mis à part certains groupes de protéines (principalement des récepteurs). De plus, les interactions physiques que les protéines de l'immunité établissent entre elles et avec les effecteurs pathogéniques ont été peu étudiées.

L'approche interactomique

Aujourd'hui, il apparaît clair que les interactions physiques entre protéines forment des réseaux complexes et hautement dynamiques (interactomes), qui sous-tendent les relations génotypephénotype [2]. La description expérimentale de ces réseaux (cartographie) est indispensable pour une compréhension globale des systèmes biologiques tels que l'immunité - et des mécanismes moléculaires correspondants. L'établissement de cartes interactomiques a offert une foison de ressources dans les espèces non végétales. Malgré une

abondance de connaissances moléculaires et génétiques, il existe un manque notoire de données expérimentales décrivant des interactions entre protéines pour l'Arabette des dames (et pas uniquement entre protéines de l'immunité), et plus généralement pour les espèces du monde végétal.

L'approche interactomique appliquée aux interactions entre plantes et phytopathogènes

Nous avons donc construit deux cartes interactomiques pour l'Arabette des dames en utilisant la méthode du double hybride en levure. La première [3], établie en testant systématiquement plus de 35 millions de paires de protéines de la plante, a permis de détecter environ 6 200 interactions entre 2 700 protéines. Nous estimons que cette carte couvre 2 % de l'interactome complet de l'Arabette des dames. La seconde carte [4] est focalisée sur le système immunitaire et ses interactions avec les effecteurs de deux phytopathogènes : la bactérie Gram-negative Pseudomonas syringae (Psy) et l'oomycète Hyaloperonospora arabidopsidis (Hpa). Cette carte comporte 3 000 interactions entre 900 protéines, dont des effecteurs pathogéniques, des protéines préalablement connues du système immunitaire, ainsi que d'autres protéines de l'hôte que nous avons identifiées comme interagissant avec l'un ou l'autre de ces groupes de protéines (et qui représentent donc probablement de nouveaux acteurs de l'immunité) (Figure 1). L'analyse combinée de ces deux cartes nous a

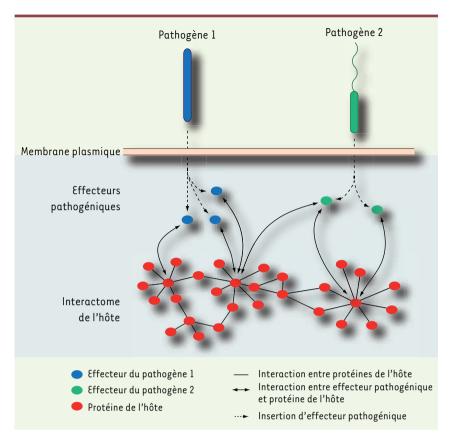


Figure 1. Ciblage des hubs de l'interactome protéique de l'hôte lors d'une attaque de pathogènes (ici Psy et Hpa).

permis de mettre en évidence certains principes fondamentaux des relations hôte-pathogène chez l'Arabette des dames.

Attaques ciblées

Si l'on adopte une métaphore militaire pour décrire les relations hôte pathogène, les effecteurs pathogéniques se livreraient à des attaques ciblées (Figure 1) contre les protéines clefs de l'hôte, dans le but de prendre le contrôle de la cellule et d'affaiblir ses défenses. Même si les théories évolutives et les connaissances actuelles appuient ce modèle, il n'a pour l'instant pas été réellement démontré. Nos simulations prédisent que, si les effecteurs établissaient le même nombre de connexions mais avec des protéines de l'hôte choisies au hasard dans la première carte, ils interagiraient en moyenne avec 320 protéines de l'hôte, dont environ 1 % seraient communes à Hpa et Psy. En

réalité, nos résultats expérimentaux montrent que les protéines effectrices ont ciblé de manière répétitive seulement 165 protéines de l'hôte, dont 10 % partagées par *Hpa* et *Psy*. Un tel degré de convergence de la part de deux pathogènes éloignés d'environ un milliard d'années d'évolution apporte un argument fort en faveur de l'hypothèse des attaques ciblées.

Défenses gardées

Le modèle zigzag repose sur une autre hypothèse, elle aussi aux consonances militaires, selon laquelle certains récepteurs intracellulaires sont capables de détecter le soi modifié et de déclencher une réponse immunitaire de forte amplitude, comme les gardes d'une citadelle [5]. Cette hypothèse s'oppose au modèle « gène pour gène », selon lequel la plante aurait développé des récepteurs intracellulaires pour chaque protéine effectrice pathogénique

possible. Selon ce second modèle, les récepteurs intracellulaires devraient interagir directement avec les protéines effectrices, alors que selon l'hypothèse des défenses gardées, ces interactions seraient indirectes. Les interactions entre protéines effectrices et récepteurs intracellulaires que nous avons expérimentalement détectées se sont avérées majoritairement indirectes, donc en accord avec l'hypothèse des défenses gardées.

Immunité et science des réseaux

Indépendamment de ces mécanismes physiologiques complexes, la science des réseaux propose une élégante prédiction. Dans les réseaux biologiques, un petit nombre de composants, surnommés hubs, établissent de nombreuses connexions tandis que la plupart des autres composants en établissent peu. En conséquence, la structure de ces réseaux est robuste et résiste aux défaillances aléatoires de ses composants, mais en revanche très sensible aux attaques dirigées contre les hubs [6]. La science des réseaux et la mécanistique moléculaire se rejoignent donc dans la question fascinante des interactions hôte-pathogène, en prédisant que les pathogènes pourraient maximiser leur virulence en ciblant les hubs (Figure 1).

Nos expériences de cartographie interactomique confirment que les effecteurs de pathogènes interagissent préférentiellement avec des protéines de l'hôte qui sont des hubs. Nous avons également testé expérimentalement la réponse immunitaire de plantes Arabette des dames mutées pour 16 hubs qui interagissent avec les effecteurs Hpa et Psy. Neuf de ces mutants sont significativement plus sensibles à l'infection que la plante sauvage, et sept sont plus résistants. Sept mutants choisis au hasard ont également été testés, et aucun n'a présenté de phénotype immunitaire.

Nos travaux démontrent que les effecteurs de deux pathogènes, séparés par

un milliard d'années d'évolution, ciblent recherche agronomique, mais également un nombre restreint de protéines très en recherche médicale. ◊ connectées au sein de l'interactome. Il Virulence effectors target key proteins pourrait s'agir d'une stratégie de viru-

of interactome networks of host plant

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les docteurs Thierry Savin, Christelle Anaclet et Nicolas Thierry-Mieg pour leur aide à la rédaction de cette Nouvelle.

CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

RÉFÉRENCES

- 1. Nishimura MT, Dangl JL, Arabidopsis and the plant immune system. Plant J 2010; 61:1053-66.
- 2. Vidal M, Cusick ME, Barabasi AL. Interactome networks and human disease. Cell 2011; 144: 986-98.

- 3 Arabidopsis Interactome Mapping Consortium. Evidence for network evolution in an Arabidopsis interactome map. Science 2011; 333: 601-7.
- 4 Mukhtar MS, Carvunis AR, Dreze M, et al. Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. Science 2011:333:596-601.
- 5 Dangl IL. Jones ID. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature 2001; 411:
- 6 Albert R, Jeong H, Barabasi AL. Error and attack tolerance of complex networks. Nature 2000; 406:
- 7 Calderwood MA, Venkatesan K, Xing L, et al. Epstein-Barr virus and virus human protein interaction maps. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 7606-11.
- 8 de Chassey B, Navratil V, Tafforeau L, et al. Hepatitis C virus infection protein network. Mol Syst Biol 2008; 4:
- 9 Dyer MD, Neff C, Dufford M, et al. The humanbacterial pathogen protein interaction networks of Bacillus anthracis, Francisella tularensis, and Yersinia pestis. PLoS One 2010; 5: e12089.
- 10 Navratil V, de Chassey B, Combe CR, Lotteau V. When the human viral infectome and diseasome networks collide: towards a systems biology platform for the aetiology of human diseases. BMC Syst Biol 2011;

NOUVELLE

HIP/PAP, un nouveau médicament contre les hépatites aiguës graves

Nicolas Moniaux^{1,2}, Marion Darnaud^{1,2}, Alexandre Dos Santos^{1,2}, Laure Jamot³, Didier Samuel^{1,2}, Paul Amouyal, Gilles Amouyal³, Christian Bréchot^{1,2}, Jamila Faivre^{1,2}

L'hépatite aiguë sévère et fulminante : gravissime et sans traitement spécifique L'hépatite aiguë sévère et fulminante est une nécrose massive et brutale du foie conduisant à une défaillance plus ou moins rapide des fonctions hépatiques. Elle se définit par des troubles majeurs de l'hémostase - le taux de prothrombine est inférieur à 50 % - associés ou non à des troubles neurologiques (encéphalopathie hépatique et coma). Les causes de cette affection sont multiples: virales, médicamenteuses, toxiques, auto-immunes. Elles doivent être activement recherchées afin d'instaurer les traitements spécifigues qui conviennent. Cette affection survient la plupart du temps sur un foie sain. Elle peut évoluer soit vers la guéri-

lence du pathogène ciblant des protéine-

clefs de l'hôte, ou à l'inverse, d'une stra-

tégie immunitaire de l'hôte qui utiliserait un nombre limité de protéines pour se

défendre contre une source variée de pathogènes. D'autres études ont montré

que les protéines de pathogènes viraux

et bactériens interagissent aussi préfé-

rentiellement avec les hubs du réseau

interactome humain [7-10]. La guestion

de leur convergence demeure cependant

inexplorée. Nos investigations sur l'Ara-

bette des dames pourraient mettre à jour

de nouveaux mécanismes de patholo-

gies infectieuses dans le domaine végé-

tal, avec des retombées évidentes en

son spontanée (avec ou sans phase d'aggravation), soit vers la mort du patient (en absence de transplantation hépatique réalisée en urgence). Sur le plan moléculaire, l'activation de nombreuses voies de signalisation entraînant la mort cellulaire par apoptose, nécrose et stress oxydatif est responsable des dommages massifs du foie et de l'inhibition de la prolifération cellulaire. Il n'existe pas de biomarqueur prédictif du devenir des patients (guérison, transplantation ou décès). L'évolution clinique imprévisible de ce syndrome en fait une véritable urgence médicochirurgicale nécessitant une hospitalisation en soins intensifs à proximité d'un centre spécialisé en transplantation hépatique [1, 2].

¹ Inserm, U785, centre hépatobiliaire, Villejuif, 94800, France; ² université Paris-Sud, faculté de médecine, Villejuif, 94800, France; ³ ALFACT Innovation, Paris, 75001, France jamila.faivre@inserm.fr

Le traitement médical est essentiellement symptomatique et peut inclure une assistance hépatique extracorporelle de détoxification sanguine. Aucun traitement pharmacologique visant à protéger le foie et stimuler sa régénération n'a jusqu'à présent montré son efficacité. La seule drogue disponible, dans le cas d'une intoxication au paracétamol, est la N-acétylcystéine (NAC) qui, si elle est administrée très précocement, corrige l'insuffisance hépatique. Véritable antidote du surdosage au paracétamol, NAC restaure les stocks de glutathion hépatique dont la consommation inactive les métabolites réactifs cytotoxiques et réduit les lésions oxydatives du foie. Plus récemment, l'administration de

NAC dans les hépatites fulminantes qui ne sont pas liées au paracétamol a été proposée, et une amélioration de la survie sans transplantation a été observée dans certains sous-groupes de patients [3]. Ce résultat clinique, associé à une absence d'effet iatrogène de NAC, a conduit certains auteurs à prescrire systématiquement NAC dans toute hépatite aiguë sévère ou fulminante, et cela malgré l'absence de preuve formelle de son efficacité. On ne saurait alors trop souligner combien le besoin médical de nouvelles molécules ciblant les insuffisances hépatocellulaires aiguës et sévères est important.

La protéine HIP/PAP : une molécule antioxidante efficace dans les hépatites fulminantes

Parmi les candidats pharmacologiques actuellement à l'étude, la protéine HIP/ PAP (hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis associated protein) ou Reg-3α (regenerating islet-derived protein 3α) exerce des effets biologiques démontrés en matière de réparation et de régénération tissulaires, ainsi qu'une protection vis-à-vis du stress et de la mort cellulaires. HIP/PAP est une lectine de type C (possédant un seul domaine de liaison aux hydrates de carbone) de 16 kDa, qui est sécrétée et qui exerce ses activités biologiques de façon autocrine et paracrine. HIP/PAP exerce une activité anti-inflammatoire dans le pancréas [4] et antibactérienne dans le tube digestif [5, 6]. Elle favorise la survie et la guidance axonale des motoneurones [7], la prolifération des cellules de Schwann et, enfin, la survie et la régénération des cellules hépatiques [8-10]. Les mécanismes moléculaires que met en jeu HIP/PAP dans la protection tissulaire sont largement méconnus.

Des modèles de souris génétiquement modifiées ont permis de montrer que HIP/PAP stimule la régénération hépatique après hépatectomie majeure et protège les animaux transgéniques d'une hépatite mortelle induite par l'acétaminophène ou par l'anticorps agoniste du récepteur de mort Fas/ CD95 (Fas) [9-11]. Dès lors, la guestion des capacités thérapeutiques d'une protéine-médicament dans l'hépatite aiguë sévère se posait. Nous avons donc produit une protéine recombinante humaine HIP/PAP (rcHIP/PAP) et entrepris d'évaluer son effet curatif vis-à-vis de l'insuffisance hépatocellulaire aiguë, et de caractériser son mode d'action. La protéine rcHIP/PAP a été produite dans un système bactérien Escherichia coli puis purifiée à plus de 99 % suivant les normes réglementaires en vigueur pour une utilisation clinique. Le mécanisme d'action de HIP/PAP, les résultats des études précliniques ainsi que les premières données cliniques ont été publiés dans la revue Hepatology [11].

Une première série d'expériences a conclu à l'efficacité thérapeutique de rcHIP/PAP dans un modèle murin d'hépatite sévère induite par un agoniste du récepteur de mort Fas. Des souris sauvages de fond génétique C57BI/6] ont reçu tout d'abord une dose d'anti-Fas calibrée pour induire 60 % de mortalité à 24 h, puis, à différents temps après l'agoniste de Fas, une dose de rcHIP/PAP (0,05 à 2,5 mg/kg par voie intraveineuse). L'étude dose-réponse a montré qu'une dose unique de rcHIP/PAP améliorait significativement la survie à 24 et 48 h des souris sauvages traitées par l'anti-Fas, la dose optimale étant de 0,750 mg/kg. Cette survie était statistiquement meilleure dans les groupes à un stade tardif (6 h), voire très tardif (9 h et 11 h), de la maladie hépatique induite par l'anti-Fas que dans les groupes ayant recu rcHIP/PAP à un stade précoce, moins sévère, de la maladie. Les niveaux d'expression et d'activation des facteurs impliqués dans les voies de l'apoptose, de la prolifération ou de la survie étaient similaires dans le foie de souris traitées par rcHIP/PAP ou par le tampon. En revanche, une nette diminution de la quantité des biomolécules oxydées a été observée, qu'elle soit identifiée par la mesure de la peroxydation lipidique ou celle de la carbonylation protéique, suggérant le rôle majeur de l'effet anti-oxydant hépatique de rcHIP/PAP dans la survie des souris. Cette inhibition du stress oxydatif hépatique par rcHIP/PAP était associée à une nette diminution des lésions nécrotiques et inflammatoires à l'examen histologique et à un meilleur index de prolifération hépatocytaire comparé aux foies contrôles. Les expériences réalisées in vitro sur des cultures primaires d'hépatocytes murins et humains ont montré que rcHIP/PAP améliorait très nettement la viabilité des cellules primaires agressées par différents effecteurs de mort comme le tumor necrosis factor α (TNF α)/actinomycine D, le transforming growth factor β (TGF β) ou encore le peroxyde d'hydrogène, et ce de manière dose dépendante. Cette cytoprotection était associée, comme dans les expériences in vivo, à une diminution du stress oxydatif des biomolécules. Enfin, nous avons montré que le pouvoir anti-oxydant de rcHIP/PAP reposait sur sa capacité à piéger les radicaux libres de type superoxyde et hydroxyle. Cette capacité de rcHIP/PAP à éliminer le radical hydroxyle est particulièrement intéressante en raison du caractère toxique de l'hydroxyle et de l'incapacité des cellules à l'éliminer, à la différence du radical superoxyde qui est détoxifié par la superoxide dismutase.

Prise dans son ensemble, cette étude préclinique montre que la protéine rcHIP/PAP est un candidat médicament très prometteur dans le traitement de l'insuffisance hépatocellulaire aiguë et sévère. Nous avons montré que rcHIP/PAP, par son action anti-oxydante importante, protège les cellules hépatiques de la mort cellulaire induite par divers signaux de mort et améliore la survie dans un modèle expérimental reconnu d'hépatite aiguë et sévère.

De la découverte de la molécule à l'essai clinique

Un essai clinique de phase 1 a été entrepris pour évaluer l'innocuité, la tolé-

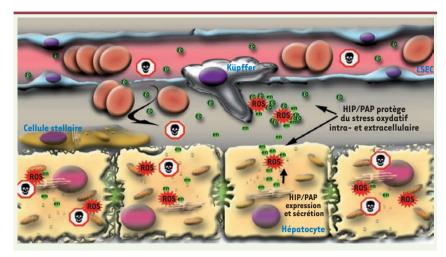


Figure 1. Mode d'action de la protéine HIP/PAP dans le foie atteint d'hépatite aiguë sévère. L'agression du foie par un agent toxique (symbole avec une tête de mort) induit la production en excès d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), aux niveaux intracellulaire (en réponse au stress du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie) et extracellulaire (par les NADPH oxydases activées dans les macrophages). La protéine HIP/PAP, produite de façon endogène (symbole vert « en ») en réponse aux mécanismes d'inflammation et de stress oxydatif, ou administrée par voie intraveineuse sous sa forme recombinante (symbole vert « rc ») permet le piégeage des ROS (activité scavenger) (symbole rouge), et en particulier des radicaux hydroxyles très cytotoxiques. Cette action favorise la survie des différents types cellulaires du foie et, in fine, la régénération hépatique. LSEC : cellules endothéliales sinusoïdales ; Kuppfer : macrophages résidents ; cellule stellaire : péricytes spécialisés.

rance et les paramètres pharmacocinétiques de rcHIP/PAP chez le volontaire sain. Cette étude a conclu à une absence de toxicité de la protéine recombinante chez l'homme quelle que soit la dose testée. Fin 2010, un essai clinique de phase 2 multicentrique en double aveugle et contrôlé contre placebo a été débuté: il évalue l'innocuité et l'efficacité thérapeutique de rcHIP/PAP chez des patients atteints d'une hépatite aiguë sévère ou fulminante. Les premiers résultats sont attendus fin 2012.

Il s'agit (à notre connaissance) de l'un des médicaments les plus prometteurs en phase de développement. Son développement thérapeutique permettra d'assurer la protection des cellules hépatiques contre une agression majeure, de stimuler la régénération et, peut-être ainsi, de limiter le besoin de recourir en urgence à la transplantation orthotopique. En conclusion, la protéine recombinante HIP/PAP est la seule lectine humaine possédant une activité anti-oxydante de piégeage des espèces oxygénées réactives. Cette propriété lui confère de réels atouts dans le traitement des hépatites aiguës sévères et fulminantes chez l'homme. Les perspectives d'avenir sont d'étendre les indications de la protéine recombinante HIP/

PAP à d'autres pathologies sévères du foie, en particulier l'hépatite alcoolique aiguë et les poussées d'insuffisance hépatocellulaire aiguë sur foie cirrhotique, cause la plus fréquente de décompensation des cirrhoses. HIP/PAP, a new drug for acute liver failure

CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

RÉFÉRENCES

- Stravitz RT, Kramer DJ. Management of acute liver failure. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2009; 6: 542-53
- 2. Ichai P, Samuel D. Epidemiology of liver failure. Clin Res Hepatol Gastroenterol 2011: 35: 610-7.
- Lee WM, Hynan LS, Rossaro L et al.. Intravenous N-acetylcysteine improves transplant-free survival in early stage non-acetaminophen acute liver failure. Gastroenterology 2009; 137: 856-64.
- Gironella M, Folch-Puy E, LeGoffic A, et al. Experimental acute pancreatitis in PAP/HIP knockout mice. Gut 2007; 56: 1091-7.
- Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV.
 Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. Science 2006; 313: 1126-30.
- 6. Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, et al. The antibacterial lectin RegIllgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. Science 2011; 334: 255-8.
- Nishimune H, Vasseur S, Wiese S, et al. Reg-2 is a motoneuron neurotrophic factor and a signalling intermediate in the CNTF survival pathway. Nat Cell Biol 2000: 2:906-14.
- Lieu HT, Batteux F, Simon MT, et al. HIP/PAP accelerates liver regeneration and protects against acetaminophen injury in mice. Hepatology 2005; 42: 618-26
- Lieu HT, Simon MT, Nguyen-Khoa T, et al.
 Reg2 inactivation increases sensitivity to Fas hepatotoxicity and delays liver regeneration posthepatectomy in mice. Hepatology 2006; 44: 1452-64.
- 10. Simon MT, Pauloin A, Normand G, et al. HIP/ PAP stimulates liver regeneration after partial hepatectomy and combines mitogenic and antiapoptotic functions through the PKA signaling pathway. FASEB J 2003; 17: 1441-50.
- Moniaux N, Song H, Darnaud M, et al. Human hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitisassociated protein cures fas-induced acute liver failure in mice by attenuating free-radical damage in injured livers. Hepatology 2011; 53:618-27.



Les connexions neuronales en pleine lumière

L'organisation des réseaux inhibiteurs dans le néocortex

Élodie Fino

Équipe dynamique et physiopathologie des réseaux neuronaux, centre interdisciplinaire de recherche en biologie (CIRB), CNRS UMR7241 Inserm U1050, Collège de France, 75005 Paris, France. elodie.fino@gmail.com

> D'un point de vue phylogénétique, le cortex est la structure cérébrale la plus évoluée. Il constitue la base neuronale de nombreuses fonctions allant de fonctions sensorielles ou motrices jusqu'à des fonctions cognitives élaborées. Le fonctionnement du cortex repose sur la mise en jeu de réseaux neuronaux complexes. La connaissance exacte de l'organisation anatomique et fonctionnelle de ces réseaux est donc déterminante pour une meilleure compréhension des fonctions corticales. Cependant, cette tâche est rendue très délicate en raison du nombre et de la variété des neurones aui composent ces réseaux et parce au'il est nécessaire de comprendre comment chaque type cellulaire s'intègre au cœur des circuits corticaux.

Connaître la structure des circuits corticaux pour comprendre leur fonction

Les premières études des réseaux corticaux se sont focalisées sur les connexions excitatrices existant entre les cellules pyramidales, les neurones principaux du cortex. Les cellules pyramidales sont les éléments clés du traitement de l'information. Cependant, le cortex est également constitué d'interneurones inhibiteurs GABAergiques qui représentent environ 20 % des neurones corticaux. Ces interneurones jouent un rôle déterminant puisqu'ils exercent un effet inhibiteur important sur les cellules pyramidales en contrôlant leur activité de décharge. Leur rôle est dramatiquement illustré dans des pathologies sévères, telles que l'épilepsie ou la schizophrénie, puisqu'un dysfonctionnement de l'activité inhibitrice

de ces neurones serait à l'origine des symptômes observés [1, 2]. L'étude des réseaux GABAergiques inhibiteurs est donc essentielle à la compréhension du traitement des informations corticales. Il existe différents types d'interneurones corticaux qui établissent des contacts spécifiques avec différentes parties des cellules pyramidales, allouant à chacun d'entre eux une spécificité dans la régulation de l'activité de ces cellules et donc du réseau cortical [3]. Il est donc nécessaire d'étudier indépendamment chaque type d'interneurones. Dans cette Nouvelle, nous nous intéresserons aux interneurones GABAergiques qui expriment la somatostatine et qui représentent 30 % des interneurones GABAergiques corticaux. Ils ciblent préférentiellement les dendrites des cellules pyramidales, contrôlant ainsi l'excitabilité dendritique et l'intégration des entrées synaptiques [4, 5]. Mais pour comprendre pleinement le rôle de ces interneurones dans la modulation des réseaux fonctionnels excitateurs, il est également nécessaire de caractériser l'organisation anatomique et fonctionnelle des réseaux inhibiteurs. Ceci nécessite de quantifier la proportion des afférences inhibitrices, mais également de déterminer si elles ciblent de manière très spécifique les réseaux fonctionnels excitateurs ou si, au contraire, elles exercent un contrôle global.

Comment étudier la connectivité neuronale ?

La majorité des études de connectivité neuronale sont réalisées au moyen

d'enregistrements électrophysiologiques doubles en patch-clamp qui permettent, à l'aide d'électrodes, de tester les connexions entre les neurones présynaptique et postsynaptique. Cependant, cette approche ne permet pas d'avoir une vue d'ensemble du réseau et de sa connectivité en raison du faible nombre de cellules enregistrées simultanément. Pour résoudre ce problème, il est nécessaire d'utiliser une technique qui permet de tester rapidement plusieurs connexions dans les mêmes conditions expérimentales tout en gardant une résolution cellulaire. Une combinaison de techniques dynamiques associant la photolyse de glutamate, la microscopie biphotonique et le multi patchclamp permet maintenant la dissection anatomofonctionnelle des microcircuits neuronaux [6]. Cette combinaison de techniques permet de définir simultanément les connexions fonctionnelles entre plusieurs dizaines de cellules avec une résolution spatiale extrêmement fine (de l'ordre du micromètre) et, ainsi, de tester à une large échelle l'organisation des réseaux inhibiteurs au sein d'un microcircuit cortical.

La photolyse biphotonique de glutamate : un outil pour révéler les connexions neuronales

La photolyse biphotonique de glutamate permet d'activer optiquement, grâce à un laser, les neurones de manière extrêmement ciblée. Le principe consiste à libérer du glutamate à proximité immédiate d'un neurone, pour qu'il se fixe sur les récepteurs du neurone ciblé et entraîne

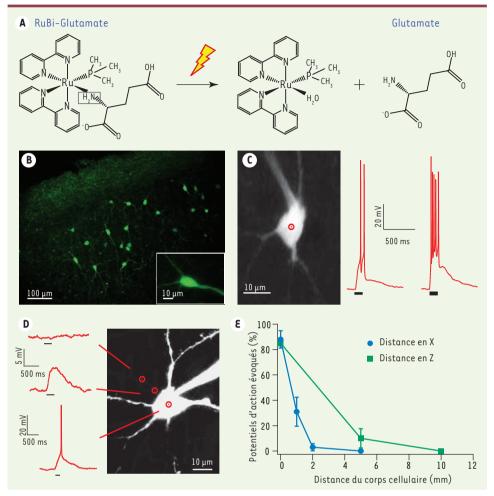


Figure 1. Le RuBi-Glutamate : une nouvelle molécule optimisée pour la photolyse biphotonique. A. Lorsque le RuBi-Glutamate (gauche) est illuminé par le laser, la liaison entre la cage et le glutamate est rompue et le glutamate est libéré (droite). B. Photographie en microscopie biphotonique d'une tranche de cortex de souris dont les interneurones à somatostatine expriment la GFP. C. Exemple d'un neurone enregistré en patch-clamp sur lequel on cible le laser (photographie de gauche). La photolyse biphotonique de RuBi-Glutamate (indiquée par les traits en gras) entraîne l'activation du neurone et le déclenchement de potentiels d'action (courbes rouges). D-E. Le RuBi-Glutamate permet d'activer les neurones avec une excellente résolution spatiale car le déplacement du laser de quelques micromètres en dehors du corps cellulaire annule les potentiels d'action évoqués (repris de [7, 8]).

son activation par le déclenchement de potentiels d'action. Cette technique utilise un composé de glutamate « cagé », où le glutamate est couplé à une molécule (appelée molécule cage) le rendant ainsi biologiquement inactif et donc incapable de se fixer à ses récepteurs (Figure 1A). Le RuBi-Glutamate [7], un composé développé récemment, s'avère la plus efficace des molécules utilisées jusqu'ici. En réponse à l'illumination du RuBi-Glutamate par le laser, le glutamate est libéré et peut désormais

activer le neurone ciblé (Figure 1A). Ainsi, il est possible de cibler et d'activer un type neuronal précis dans des tranches de cerveaux de souris dans lesquelles une sous-population neuronale exprime la green-fluorescent protein (GFP). L'enregistrement simultané en patch-clamp du neurone ciblé permet de voir les potentiels d'action déclenchés par la photolyse du glutamate (Figure 1C). De plus, l'illumination à des longueurs d'onde élevées (possible uniquement en microscopie biphoto-

nique) permet d'activer les neurones avec une très bonne résolution spatiale et temporelle. Ainsi, si l'on déplace le laser de quelques micromètres en dehors du neurone ciblé, le glutamate ne pourra plus évoquer de potentiels d'action car il sera libéré « trop loin » (Figure 1DE). Cette technique permet donc d'activer les neurones avec une très grande précision, à la fois spatiale et temporelle. De plus, le déplacement rapide (de l'ordre de quelques millisecondes) du laser d'un neurone à l'autre permet d'analyser un grand nombre de connexions neuronales et ce très rapidement.

Identification de réseaux inhibiteurs denses dans les circuits corticaux

En utilisant cette combinaison de techniques, nous avons étudié l'organisation des réseaux inhibiteurs que forment les interneurones GABAergiques à somatostatine contactant les cellules pyramidales dans le cortex frontal (dans les couches superficielles 2/3) [8]. Ainsi, les interneurones localisés dans les tranches de cortex frontal de souris exprimant la somatostatine-GFP

(Figure 1B) ont été activés séquentiellement par photolyse biphotonique du RuBi-Glutamate et les réponses évoquées dans deux ou trois cellules pyramidales ont été enregistrées simultanément en multi patch-clamp (Figure 2A). Afin de prendre en compte un maximum d'interneurones présents dans le réseau étudié, nous avons choisi un large champ d'investigation de 600 x 800 μm. La microscopie biphotonique permet de stimuler les interneurones séquentiellement dans différents plans axiaux

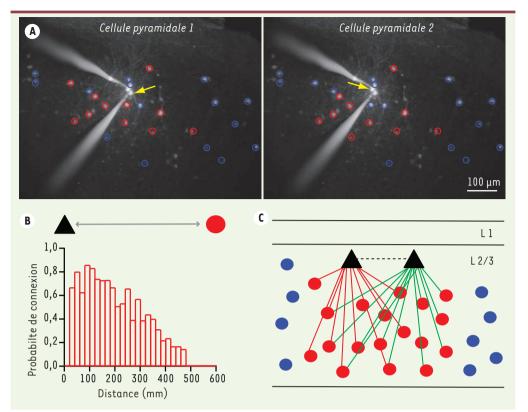


Figure 2. Cartographie des connexions inhibitrices dans la couche 2/3 du cortex frontal. A. Photographies en microscopie biphotonique montrant l'ensemble des interneurones GFP stimulés par photolyse biphotonique du RuBi-Glutamate avec un enregistrement parallèle des réponses évoquées dans deux cellules pyramidales. Les cercles rouges indiquent les interneurones connectés aux cellules pyramidales et les bleus les interneurones non connectés (cellule 1 à gauche, cellule 2 à droite). B. La probabilité de recevoir des connexions inhibitrices pour une cellule pyramidale est très importante localement et décroit en fonction de la distance. C. Représentation schématique de la densité des connexions inhibitrices sur les cellules pyramidales, que celles-ci soient connectées entre elles ou non (repris de [8]).

et sur une profondeur de l'ordre de 100 µm. Ainsi, l'ensemble des interneurones présents autour des cellules pyramidales et appartenant à un microcircuit local ont pu être testés, soit de 10 à 45 interneurones dans le même champ cortical. Cette méthodologie permet d'analyser un grand nombre de connexions dans les mêmes conditions expérimentales (Figure 2A).

Ces expériences ont permis de construire des cartographies de réseaux inhibiteurs (Figure 2A). Ces cartographies ont montré que les cellules pyramidales reçoivent une innervation massive des interneurones à somatostatine puisque, localement, 70 à 80 % des interneurones sont en contact avec les cellules pyramidales enregistrées. Ce pourcentage est

deux à trois fois plus élevé que celui qui est observé avec des doubles ou triples enregistrements en patch-clamp [9]. Cette différence s'explique probablement par le nombre beaucoup plus élevé de connexions inhibitrices qui ont pu être testées, mais également par le fait que la microscopie biphotonique permet d'étudier les cellules localisées profondément dans la tranche de cerveau, optimisant les chances de préserver les connexions intactes. Il existe également une forte corrélation entre la connectivité et la distance entre les interneurones et les cellules pyramidales (Figure 2B). Ainsi, une cellule pyramidale proche des interneurones aura plus de chances d'être en contact avec ces interneurones qu'une cellule plus éloignée. Cependant, même

pour des distances supérieures à 300 µm, 40 % des interneurones sont connectés aux cellules pyramidales. Ces expériences révèlent donc que la densité des réseaux inhibiteurs locaux est beaucoup plus importante que ce qui avait été décrit précédemment.

D'autre part, grâce à l'enregistrement électrophysiologique simultané de plusieurs cellules pyramidales voisines, nous avons pu comparer les cartographies de réseaux inhibiteurs pour des cellules pyramidales connectées, appartenant à un même réseau fonctionnel, ou des cellules pyramidales non connectées, appartenant à des réseaux fonctionnels distincts. La Figure 2A illustre un exemple de cartographies inhibitrices pour deux cellules pyrami-

dales voisines non connectées. On y observe la similitude des réseaux inhibiteurs pour ces deux cellules pyramidales voisines. De façon surprenante, nous avons observé un même degré de similitude que les cellules pyramidales soient connectées ou non (Figure 2C). Ces résultats démontrent que la spécificité de connectivité des entrées inhibitrices est indépendante de la connectivité entre les cellules pyramidales.

L'organisation anatomofonctionnelle des réseaux inhibiteurs ainsi cartographiée révèle une densité des connexions inhibitrices beaucoup plus importante que ce qui avait été observé précédemment, renforçant l'importance fonctionnelle de l'inhibition dans les circuits corticaux. De plus, de manière surprenante, la spécificité de connexion de ces réseaux inhibiteurs semble indépendante des microcircuits excitateurs locaux. Le rôle des réseaux inhibiteurs n'apparaît donc pas comme restreint au contrôle précis d'un réseau fonctionnel mais plutôt comme un contrôle global local de la balance excitation/inhibition et une modulation de la sortie fonctionnelle des circuits corticaux. Dense inhibitory neuronal networks revealed by two-photon activation of RuBi-Glutamate

CONFLIT D'INTÉRÊTS

L'auteur déclare n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Cossart R, Bernard C, Ben-Ari Y. Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. Trends Neurosci 2005; 28 · 108-15
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. Nat Rev Neurosci 2005; 6:312-24.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, et al. Interneurons of the neocortical inhibitory system. Nat Rev Neurosci 2004; 5: 793-807.

- Silberberg G, Markram H. Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells mediated by Martinotti cells. *Neuron* 2007; 53: 735-46.
- Murayama M, Pâerez-Garci E, Nevian T, et al. Dendritic encoding of sensory stimuli controlled by deep cortical interneurons. Nature 2009; 457: 1137-41.
- Nikolenko V, Poskanzer KE, Yuste R. Two-photon photostimulation and imaging of neural circuits. Nat Methods 2007; 4: 943-50.
- Fino E, Araya R, Peterka DS, et al. RuBi-Glutamate: Two-photon and visible-light photoactivation of neurons and dendritic spines. Front Neural Circuits 2009; 3:2.
- 8. Fino ε, Yuste, R. Dense inhibitory connectivity in neocortex. *Neuron* 2011; 69: 1188-203.
- 9. Thomson AM, Lamy C. Functional maps of neocortical local circuitry. Front Neurosci 2007; 1:19-42.

NOUVELLE

Le Yin et le Yang de la sénescence

Est-il possible de vieillir sans développer de cancer ?

Matthieu Lacroix, Laetitia K. Linares, Laurent Le Cam

➤ La sénescence, encore appelée vieillissement cellulaire, se caractérise par un arrêt irréversible de la prolifération cellulaire associé à certains changements morphologiques, métaboliques et sécrétoires (→) [11, 12]. Découvert par

Leonard Hayflick dans les années 1960 comme une réponse antiproliférative de la cellule originellement associée

(→) Voir l'article de J.M. Brondello et al., page ??? de ce numéro

au raccourcissement télomérique, il est maintenant établi que ce processus de sénescence peut intervenir dans d'autres conditions de stress, telles que différents stress génotoxiques, métaboliques, ou oncogéniques.

Si la sénescence fût longtemps considérée comme un artéfact de culture cellulaire in vitro, plusieurs études indépendantes ont permis de démontrer son existence in vivo. Les travaux récents des laboratoires de J.M. Van Deursen [1] et de L. Zender [2] confirment, via des arguments génétiques importants, le rôle in vivo de la sénescence au cours du vieillissement et dans certaines réponses antitumorales.

Les cellules sénescentes exprimant p16 participent au vieillissement de l'organisme

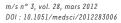
Un modèle d'élimination sélective des cellules sénescentes

Le premier modèle murin génétiquement modifié décrit dans ces études repose sur une approche de type « gène suicide » dont l'expression est restreinte aux cellules sénescentes. Dans ce modèle expérimental, la mort cellulaire intervient spécifiquement dans les cellules sénescentes. Elle est déclenchée par l'administration in vivo d'une drogue, le AP20187, qui active une protéine de fusion constituée par une forme activée de la caspase 8 fusionnée à un fragment de la protéine liant la FK506 (FK506BP). L'expression de cette protéine est placée sous le contrôle d'une partie du promoteur du gène codant pour la protéine pl6^{lnk4a}, un marqueur de la sénescence (Figure 1) [1]. Grâce à l'utilisation de deux promoteurs spécifiques et deux phases de lecture distinctes, le locus CDKN2A code pour 2 protéines à activité suppresseur de Institut de recherche en cancérologie de Montpellier, Inserm U896, centre de lutte contre le cancer Paul Lamarque Val d'Aurelle, Montpellier, 34298, France. laurent.lecam@inserm.fr

tumeur: les protéines p16^{INK4A} et ARF (alternative reading frame, p14^{Arf} chez l'homme ou p19^{Arf} chez la souris). Ce locus constitue un point de convergence de nombreux signaux de stress conduisant in fine à la modulation des voies impliquant les suppresseurs de tumeur Rb et p53 [3]. Ces derniers sont des régulateurs clé de la sénescence, et les voies qu'ils empruntent représentent l'archétype des voies des suppresseurs de tumeurs. De fait, ces voies de signalisation sont inactivées, à un niveau ou à un autre, dans pratiquement toutes les tumeurs.

Cette stratégie originale a permis à Baker et al. [1] de montrer que la destruction des cellules sénescentes exprimant p16^{lnk4a} (et donc le gène suicide) améliorait significativement certains symptômes associés à un vieillissement prématuré dans un modèle murin progéroïde basé sur l'expression d'un allèle hypomorphe de la kinase BubR1 (Bub-R1^{Hyp/Hyp}) [4]. Ces travaux font écho à de précédentes études démontrant une expression accrue de p16^{lnk4a} et de





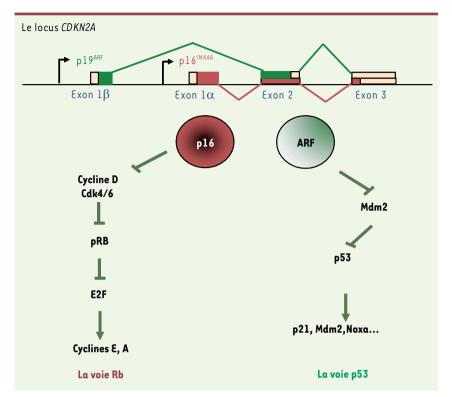


Figure 1. Représentation schématique du locus CDKN2A. En utilisant deux promoteurs différents et deux phases de lecture ouvertes distinctes, le locus CDKN2A (encore appelé Ink4a/Arf) code pour 2 protéines sans homologie de séquence : p16^{lnk4a} et ARF (alternative reading frame). p16^{lnk4a} est un inhibiteur de certains complexes à activité kinase dépendante des cyclines (cycline-cdk) qui jouent un rôle important dans la progression du cycle cellulaire en amont du suppresseur de tumeur pRb. ARF (p14^{Arf} chez l'homme ou p19^{Arf} chez la souris) est un inhibiteur de Mdm2 (mouse double minute), une protéine à activité ubiquitine €3 ligase impliquée dans la dégradation du suppresseur de tumeur p53. Les voies de signalisation impliquant p16^{lnk4a} et ARF jouent un rôle important au cours de la sénescence et du développement tumoral.

p19^{Arf} dans différents tissus de ce même modèle murin. L'inactivation génétique de pl6^{lnk4a}, alors que l'expression de p19^{ARF} reste intacte, améliore certains des symptômes de vieillissement prématuré dans ce modèle [5]. Cette « cure de jouvence » tissulaire corrèle avec une diminution de l'expression de plusieurs cytokines et chimiokines sécrétées par les cellules sénescentes, dont l'expression inopinée est à l'origine d'une réponse inflammatoire. Cette capacité sécrétrice des cellules sénescentes pourrait avoir des effets délétères en conduisant d'autres cellules, localement ou à plus grande distance, à entrer en sénescence, amplifiant ainsi les défauts tissulaires qui participent au vieillissement [6-8].

Quelles leçons tirer de ces expériences ?

Les travaux de cette équipe constituent une des premières preuves génétiques que les cellules sénescentes exprimant pl6^{lnk4a} participent au vieillissement in vivo, et ils ouvrent des perspectives thérapeutiques intéressantes. Cependant, ces études suggèrent également que de telles stratégies ne pourront vraisemblablement pas être mises en œuvre audelà d'un certain âge, l'installation des phénotypes associés au vieillissement devenant irréversible. De plus, ce modèle expérimental montre aussi que tous les tissus ne vieillissent pas via les mêmes mécanismes moléculaires. C'est le cas notamment de certaines arythmies cardiaques ou de l'épaississement des parois vasculaires observés dans ce

modèle expérimental et qui ne sont pas améliorés par l'élimination des cellules exprimant p16^{lnk4a}. Ainsi, il n'existe vraisemblablement pas un seul mécanisme de vieillissement universel et il semble même que selon les organes, certains des acteurs clés de la sénescence pourraient avoir des effets paradoxaux sur le vieillissement [9, 10].

Ces résultats nous amènent également à nous interroger sur certains des mécanismes impliqués dans le vieillissement. En effet, selon un modèle assez couramment admis, le vieillissement impliquerait, du moins en partie, un dysfonctionnement du compartiment des cellules souches adultes, dont l'altération fonctionnelle participerait aux défauts de renouvellement ou de réparation tissulaires associés au vieillissement (→) [12]. Le modèle génétique

utilisé par l'équipe de J.M. Van Deursen, basé sur une approche de « gène

(→) Voir l'article de S. Galas, page ??? de ce numéro

suicide » remet en question cette hypothèse, au moins en partie. En effet, si la sénescence des cellules souches était un élément déclencheur et majeur du processus de vieillissement, la destruction des cellules souches exprimant p16^{lnk4a} via l'activation du gène suicide dans ce modèle murin devrait conduire, au même titre que leur dysfonctionnement, à des défauts tissulaires semblables à ceux qui interviennent au cours du vieillissement. Cette simple déduction repose la question des mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant in fine à l'altération de la fonctionnalité des cellules souches ou de certains progéniteurs immatures au cours du vieillissement, et suggère que ces défauts interviennent tardivement mais ne constituent vraisemblablement pas l'évènement initial du vieillissement.

La sénescence constitue une barrière antitumorale efficace

Ces travaux prometteurs ouvrent la voie au développement de nouvelles stratégies antivieillissement. Cependant, les

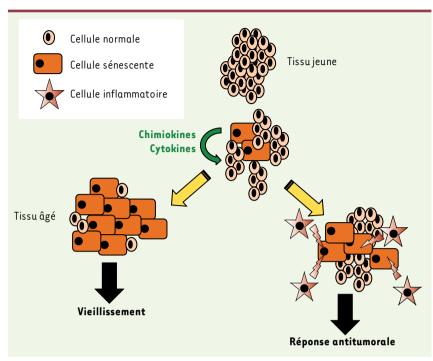


Figure 2. Rôles paradoxaux du phénotype sécrétoire des cellules sénescentes. Les cellules sénescentes sécrètent des cytokines et chimiokines pouvant influencer le vieillissement et la surveillance immune antitumorale. Certaines de ces molécules sécrétées par les cellules sénescentes (par exemple les IGFBP (insulin-like growth factor binding protein) ou l'interleukine [IL]-6) interviennent directement dans la sénescence des cellules environnantes, amorçant une boucle vicieuse participant au dysfonctionnement et au vieillissement tissulaires. À l'inverse, les cytokines (notamment celles de la famille de l'interféron ou de l'IL-1) sécrétées par les cellules sénescentes sont à l'origine d'une réponse inflammatoire et immune permettant l'élimination des cellules sénescentes. L'échappement à ce mécanisme de surveillance antitumoral permettrait le passage vers des stades de transformation plus avancés.

études récentes de l'équipe de L. Zender laissent présager que si l'objectif de telles stratégies était de moduler les capacités sécrétrices des cellules sénescentes, il ne faudrait pas qu'elles perturbent la réponse immunitaire dirigée contre ces cellules sénescentes, ce qui risquerait d'accroître la survenue de certaines tumeurs [2]. En effet, plusieurs modèles génétiques murins renforcent maintenant l'idée que la sénescence, en particulier la sénescence induite par les oncogènes (oncogene-induced senescence ou OIS), est un mécanisme qui bloque la prolifération anarchique des cellules dont certaines voies oncogéniques sont activées de façon incontrôlée. Les phénotypes sécrétoires de ces cellules sénescentes constituent une arme à double tranchant : certaines des cytokines et chimiokines sécrétées par-

ticipent à l'établissement et au maintien de la sénescence, alors que d'autres induisent une réponse inflammatoire qui permet d'éliminer de l'organisme ces cellules prénéoplasiques. Ce mécanisme de surveillance antitumoral fait appel, au moins dans le cas des hépatocytes activés par l'oncogène Ras - modèle utilisé par l'auteur - aux lymphocytes T CD4 Th1 et aux monocytes. L'ablation de cette réponse immune permet aux hépatocytes sénescents d'échapper à cette surveillance antitumorale, conduisant in fine au développement d'hépatocarcinomes cellulaires (HCC). Il semble que ce mécanisme soit conservé chez l'homme puisque chez les patients immunodéprimés, par un traitement immunosuppresseur après une greffe d'organes ou parce qu'ils sont infectés par le VIH, le nombre d'hépatocytes sénescents est augmenté et la prévalence d'HCC en réponse à une infection par le virus de l'hépatite C est plus élevée [2].

En conclusion

L'ensemble de ces résultats expérimentaux révèle l'intérêt potentiel de stratégies visant à éliminer les cellules sénescentes pour ralentir le vieillissement, mais souligne la nécessité de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en œuvre pour s'affranchir d'effets néfastes en termes de développement tumoral. • The Yin and the Yang of senescence: is it possible to age without developing

CONFLIT D'INTÉRÊTS

cancer?

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

RÉFÉRENCES

- Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageingassociated disorders. Nature 2011; 479: 232-6.
- Kang TW, Yevsa T, Woller N, et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. Nature 2011; 479: 547-51.
- Lanigan F, Geraghty JG, Bracken AP. Transcriptional regulation of cellular senescence. *Oncogene* 2011; 30: 2901-11.
- Baker DJ, Jeganathan KB, Cameron JD, et al. BuRb1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. Nat Genet 2004; 36:744-9.
- Baker DJ, Perez-Terzic C, Jin F, et al. Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. Nat Cell Biol 2008; 10:825-36.
- Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, et al. Role for IGFBP7 in senescence induction by BRAF. Cell 2010; 141: 746-7.
- Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, et al.
 Oncogene-induced senescence relayed by an
 interleukin-dependent inflammatory network. Cell
 2008: 133: 1019-31.
- Rodier F, Coppé JP, Patil CK, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. Nat Cell Biol 2009; 11:973-9.
- Baker DJ, Perez-Terzic C, Jin F, et al. Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. Nat Cell Biol 2008; 10:825-36.
- Matheu A, Maraver A, Klatt P, et al. Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. Nature 2007; 448: 375-9.
- Brondello JM, Prieur A, Philippot D, et al. La sénescence cellulaire: un nouveau mythe de Janus? Med Sci (Paris) 2012; 28:???-???
- Galas S, Château MT., Pomiès P, et al. Nouvelles pistes ouvertes par les modèles animaux dédiés à l'étude du vieillissement. Med Sci (Paris) 2012; 28: ???-???.

TBX2, un nouvel acteur de la sénescence cellulaire induit par PML

Nadine Martin¹, Anne Dejean², Oliver Bischof²

> La protéine PML (promyelocytic leukemia protein) a été identifiée il y a 20 ans dans le produit de la translocation t(15,17) causant la leucémie aiguë promyélocytaire [1, 2]. La protéine de fusion PML-RARα (retinoic acid receptor α) issue de cette translocation bloque la différenciation des cellules progénitrices hématopoïétiques. PML fait partie, avec p53 et Rb (retinoblastoma protein) notamment, de facteurs suppresseurs de tumeur induisant la sénescence cellulaire. Celle-ci est caractérisée par un arrêt permanent du cycle cellulaire en réponse à divers signaux tels que l'érosion des télomères ou l'activation d'oncogènes. En empêchant la prolifération illimitée des cellules, la sénescence constitue une puissante barrière antitumorale (→) [3]. Depuis la découverte du rôle de PML dans la sénes-(→) Voir l'article cence cellulaire en de J.M. Brondello 2000, la compréhension et al., page ??? de ce numéro des mécanismes impliqués dans sa fonction de suppresseur

PML, un suppresseur de tumeur

de tumeur constitue un enjeu majeur.

Le gène PML donne naissance, par épissage alternatif de l'ARN, a au moins sept isoformes de PML, désignées PML-I à -VII. Hormis PML-VII qui est cytoplasmique, toutes les isoformes de PML sont nucléaires et se concentrent au sein de petites structures appelées corps nucléaires PML, détruites dans la leucémie aiguë promyélocytaire et dont la fonction est encore mal définie. La première preuve de l'action de suppresseur de tumeur de PML est venue de

l'observation d'une augmentation de la prolifération cellulaire et de la susceptibilité aux tumeurs lors de son inactivation génétique chez la souris [4]. Deux études ont ensuite montré que l'oncogène Ras activé stimule l'expression de PML et que celle-ci induit la sénescence cellulaire dans les fibroblastes primaires humains et murins [5, 6]. PML est requis pour l'implémentation de la sénescence par Ras [6].

Parmi les diverses isoformes de PML. seule PML-IV induit la sénescence [7]. en mettant en jeu les suppresseurs de tumeurs p53 et Rb. PML agit avec p53 au sein d'une boucle de régulation positive de la sénescence. PML promeut d'une part l'activité transcriptionelle de p53 au sein d'un complexe trimérique formé avec CBP (CREB-binding protein, un coactivateur transcriptionnel) [6, 7]. D'autre part, le gène PML est luimême activé par p53, agissant comme médiateur de son action antiproliférative [8]. Concernant l'implication des protéines Rb (Rb1/p105, RbL1/p107 et RbL2/p130), connues pour inhiber l'activité des facteurs de transcription E2F, il a été montré récemment que PML recrute les complexes Rb/E2F au sein des corps nucléaires, dans un environnement riche en hétérochromatine. La répression des gènes cibles d'E2F est requise pour l'implémentation de la sénescence par PML [9]. PML est considérée depuis longtemps comme un facteur jouant un rôle dans la régulation transcriptionnelle. Cependant, peu de gènes cibles directs de PML ont été identifiés et son mode de fonctionnement dans ce contexte est encore mal connu.

¹ Cell proliferation group, MRC clinical sciences centre, faculty of medicine, Imperial College, London W12 ONN, Royaume-Uni; ² Unité d'organisation nucléaire et oncogenèse, Inserm U993, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. obischof@pasteur.fr

PML inhibe le proto-oncogène TBX2

Afin de mieux comprendre son action dans la sénescence cellulaire, nous avons souhaité caractériser l'impact de PML sur l'expression des gènes associés à ce phénomène [10]. Nous avons pour cela établi le profil transcriptionnel de fibroblastes primaires humains soit en phase proliférative, soit après induction de la sénescence via la surexpression de PML-IV ou de l'oncogène Ras^{V12} (sénescence prématurée) ou via leur culture prolongée (sénescence réplicative). La comparaison de ces transcriptomes a permis de définir une liste de 262 gènes réprimés spécifiquement dans les trois cas de sénescence, parmi lesquels figure le gène TBX2 (T-box protein 2). TBX2 est un facteur de transcription dont la surexpression provoque l'immortalisation des fibroblastes embryonnaires murins en inhibant l'expression des gènes suppresseurs de tumeur p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p21^{CIP} et p14^{ARF}. TBX2 coopère de plus avec des oncogènes dans la transformation cellulaire et retarde l'entrée en sénescence des fibroblastes primaires humains [11]. En rapport avec cette action, le gène TBX2 est fréquemment surexprimé dans divers cancers tels que le mélanome, le cancer du poumon à petites cellules, celui du sein, du pancréas, du foie et de la vessie [12]. Du fait de son rôle important dans l'oncogenèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à TBX2 dans le contexte de la sénescence induite par

Nous avons tout d'abord établi que *TBX2* est un gène cible direct de PML-IV (et pas des autres isoformes PML). PML-IV

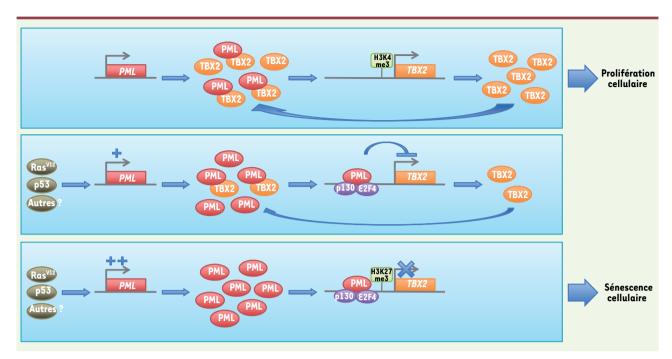


Figure 1. PML et TBX2 agissent au sein d'une boucle de régulation contrôlant la sénescence cellulaire. En conditions normales de prolifération cellulaire, la chromatine au niveau du promoteur du gène TBX2 est transcriptionnellement active (représentée par la modification H3K4me3, triméthylation de la lysine 4 de l'histone 3) et TBX2 est fortement exprimée. Par interaction protéique directe, TBX2 séquestre PML loin de son promoteur et de celui de ses autres gènes cibles et inhibe ainsi l'action prosénescente de PML. Ce mécanisme, associé en situation pathologique à l'amplification du gène TBX2 [11] et à la réduction de l'abondance de la protéine PML [13], favorise la tumorigenèse. En réponse à l'activation de facteurs tels que l'oncogène Ras^{V12} ou p53, l'expression de PML augmente progressivement. La protéine PML s'associe au promoteur du gène TBX2 en conjonction avec les facteurs p130/E2F4 et induit l'établissement d'un environnement chromatinien inactif (représenté par la modification H3K27me3, triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3). Ceci entraîne la répression puis l'extinction de l'expression de TBX2 et la mise en place de la sénescence cellulaire.

réprime TBX2 spécifiquement lors de la sénescence et non lors de la prolifération ou de la quiescence des cellules. TBX2 est également un gène cible d'E2F. Le recrutement au niveau du promoteur TBX2 de PML-IV, qui ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN, requiert son interaction avec un complexe p130/E2F4 fonctionnel, qui crée un environnement de chromatine transcriptionnellement inactive au niveau du promoteur. L'intégrité des corps nucléaires PML n'est pas requise pour l'inhibition de l'expression de TBX2 et l'induction de la sénescence par PML-IV, mais elle favorise son association au promoteur TBX2. Nous avons de plus observé que PML contribue à l'inhibition de l'expression de TBX2 lors de l'établissement de la sénescence par l'oncogène Ras^{V12}. Les fibroblastes embryonnaires murins PML^{-/-} présentent un niveau constitutivement élevé de

TBX2, reflétant leur résistance à l'entrée en sénescence précédemment décrite [5]. La diminution de l'expression de TBX2 dans les fibroblastes primaires humains est suffisante pour induire l'entrée des cellules en sénescence.

Une boucle de régulation

Nous avons ensuite testé si la protéine TBX2, de même qu'elle est capable de retarder la sénescence réplicative [11], a un impact sur la sénescence induite par PML-IV. En effet, la surexpression de TBX2 concomitante à celle de PML-IV abroge l'entrée des cellules en sénescence. TBX2 entraîne une diminution de l'association de PML-IV au promoteur de TBX2 et de CDC6 (cell division cycle 6) et une augmentation de la transcription de ces gènes et de celle d'autres gènes cibles d'E2F réprimés par PML (BUBI, ORC6L, USP1, ASFIB, BRCA1, NEK2, CDC2

et CCN2A¹). Cet antagonisme exercé par TBX2 est dépendant de son domaine RD1 (repression domain 1), décrit comme un module d'interaction protéine-protéine. Nous avons montré que la protéine TBX2 est capable de se lier à la protéine PML-IV endogène et que son domaine RD1 est le principal médiateur de cette association. Ceci suggère que TBX2 interfère avec l'activité prosénescente de PML-IV par une interaction directe.

Notre étude a ainsi mis en lumière un nouveau gène cible direct de PML mis en jeu dans son action de suppresseur de tumeur et une boucle de régulation dans laquelle PML et TBX2 interagissent

¹ BUB1 : sérine/thréonine protein kinase ; ORC6L : origin recognition complex, subunit 6 like ; USP1 : ubiquitin specific peptidase 1 ; ASF1B : anti-silencing function 1 homolog B (S. cerevisiae) ; BRCA1 : breast cancer 1 ; NEK2 : never in mitosis gene a-related kinase 2 ; CDC2 : cell cycle controlling gene 2, code pour Cdk1 une sérine/thréonine kinase ; CCN2A : connective tissue growth factor.

pour contrôler l'induction de la sénescence cellulaire (Figure 1). La relation fonctionnelle entre TBX2 et PML dépend de leur abondance respective - inversement corrélées - et du contexte cellulaire. Un niveau élevé de TBX2 inhibe la fonction prosénescente de la protéine PML-IV en la séguestrant par interaction directe et en l'éloignant ainsi des promoteurs de ses gènes cibles. Inversement, une augmentation du niveau de PML entraîne la répression de l'expression de TBX2. Dans le contexte de la sénescence, il est probable que d'autres facteurs que l'oncogène Ras et p53 [5, 6, 8], qui restent à découvrir, activent l'expression de PML. Dans le cas du cancer, il a été montré que la fonction de PML est fréquemment supprimée. Cette inhibition a lieu au niveau posttraductionnel : en effet, dans de nombreux cancers d'origines histologiques diverses, l'abondance de la protéine PML est fortement réduite alors que celle de son ARNm reste intacte [13]. Le ciblage de PML vers la voie de dégradation fait ainsi pencher la balance vers une prolifération cellulaire illimitée. Il est fort probable que, hormis l'antagonisme de TBX2 rapporté ici, d'autres mécanismes suppriment l'action de la protéine PML et contribuent ainsi à la tumorigenèse. A new player in PML-mediated cellular senescence: TBX2 gets into the loop

CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

RÉFÉRENCES

- Kakizuka A, Miller WH Jr, Umesono K, et al.
 Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. Cell 1991; 66: 663-74.
- De Thé H, Lavau C, Marchio A, et al. The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. Cell 1991; 66: 675-84.
- Brondello JM, Prieur A, Philippot D, et al.
 La sénescence cellulaire: un nouveau mythe de
 Janus? Med Sci (Paris) 2012; 28:???-???.

- Wang ZG, Delva L, Gaboli M, et al. Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. Science 1998; 279: 1547-51
- Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido E, et al. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. Genes Dev 2000; 14: 2015-27.
- Pearson M, Carbone R, Sebastiani C, et al. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. Nature 2000; 406: 207-10.
- Bischof O, Kirsh O, Pearson M, et al. Deconstructing PML-induced premature senescence. EMBO J 2002; 21: 3358-69.
- De Stanchina E, Querido E, Narita M, et al. PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. Mol Cell 2004: 13:523-35.
- Vernier M, Bourdeau V, Gaumont-Leclerc MF, et al. Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. Genes Dev 2011; 25: 41-50.
- Martin N, Benhamed M, Nacerddine K, et al. Physical and functional interaction between PML and TBX2 in the establishment of cellular senescence. EMBO J 2012; 31:95-109.
- Jacobs JJ, Keblusek P, Robanus-Maandag E, et al.
 Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers. Nat Genet 2000; 26: 291-9.
- Abrahams A, Parker MI, Prince S. The T-box transcription factor Tbx2: its role in development and possible implication in cancer. IUBMB Life 2010; 62: 92-102.
- Gurrieri C, Capodieci P, Bernardi R, et al. Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. J Natl Cancer Inst 2004; 96: 269-79.

NOUVELLE

Rôle des facteurs de transcription Fox0 dans la maintenance des cellules souches

Pauline Rimmelé¹, Xin Zhang¹, Saghi Ghaffari^{1,2,3,4}

- ¹ Department of developmental and regenerative biology;
- ² Department of medicine division of hematology, oncology;
- ³ Black Family Stem Cell Institute;
- ⁴ Tisch Cancer Institute, Mount Sinai School of Medicine, 1425 Madison Avenue, New York, New York 10029, États-Unis. saghi.ghaffari@mssm.edu

> Les avancées scientifiques dans le domaine des cellules souches ont favorisé les thérapies cellulaires visant à restaurer les fonctions d'un tissu ou d'un organe altérées par une pathologie ou par le vieillissement. Le remarquable potentiel thérapeutique des cellules souches est attribué à leurs deux propriétés majeures : l'autorenouvellement, qui désigne la capacité à se multiplier en donnant de nouvelles cellules souches, et la pluripotence, qui désigne la capacité à se différencier en tout type cellulaire d'un organisme. Ces dernières années,

de nombreux acteurs moléculaires gouvernant la destinée des cellules souches ont été identifiés et nourrissent l'espoir d'une médecine régénérative. Parmi eux, les facteurs de transcription FoxO se sont imposés comme des molécules critiques pour le maintien des propriétés des cellules souches.

Comprendre la maintenance des cellules souches, clé d'une perspective thérapeutique? Les cellules souches embryonnaires, dérivées de la masse cellulaire interne d'embryons au stade blastocyste, et les cellules souches adultes, résidant dans la majorité des organes ou tissus adultes, constituent les deux grands types de cellules souches. Les cellules souches embryonnaires, pluripotentes, sont capables de se différencier en trois feuillets embryonnaires : endoderme, mésoderme et ectoderme, et d'engendrer tous les tissus de l'organisme adulte. Pour des raisons scientifiques et éthiques, l'utilisation des cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) est limitée. En revanche, les avancées

NOUVELLES

dans l'identification de régulateurs essentiels à leur pluripotence ont été à la base des stratégies de reprogrammation des cellules somatiques en cellules souches pluripotentes (iPS, induced pluripotent stem cells) [1, 2] et ont permis d'approfondir la compréhension de ce processus de reprogrammation, approche qui pourrait révolutionner la thérapie cellulaire.

Même si elles n'ont pas un potentiel de différenciation aussi vaste que celui des cellules souches embryonnaires, les cellules souches adultes sont capables de générer un (unipotence) ou plusieurs (multipotence) lignages et de s'autorenouveler. Elles sont spécifiques des organes dans lesquels elles résident, et leur potentiel de différenciation est généralement limité aux cellules qui composent le tissu. Elles sont localisées dans un microenvironnement spécialisé appelé « niche » [20], qui contrôle leur prolifération, leur migration et leur différenciation. La majorité des cellules

souches adultes sont maintenues dans un état aujescent que caractérisent une activité métabolique et des besoins en facteurs de croissance réduits. Bien que ce processus ne soit pas clairement compris, il a été postulé que la guiescence protège les cellules souches de potentielles agressions aui les endommageraient et leur permet de remplir leurs fonctions tout au long de la vie. Cependant, cette hypothèse ne semble pas toujours vérifiée. En revanche, il est clairement établi qu'une balance finement régulée entre quiescence et progression dans le cycle cellulaire assure le maintien du pool de cellules souches et une production adéquate des lignages différenciés. Une rupture de cet équilibre peut favoriser l'occurrence de maladies dégénératives et de processus tumoraux, tels qu'on les observe au cours du vieillissement. Ainsi, l'élucidation des mécanismes contrôlant la maintenance des cellules souches constitue t-elle une question fascinante qui ne peut que

favoriser l'exploitation de leur potentiel thérapeutique.

Les multiples fonctions des FoxO dans les cellules souches

Remarquablement conservée au cours de l'évolution, la famille FoxO (Forkhead box O protein) qui comprend FoxOl, FoxO3, FoxO4, ubiquitaires, et FoxO6, spécifique des tissus neuronaux, a émergé ces vingt dernières années comme un acteur clé de la régulation de processus biologiques fondamentaux et variés. Les protéines FoxO ont été particulièrement étudiées pour leur rôle pivot dans la signalisation de l'insuline et des facteurs de croissance. Cibles majeures de la voie de signalisation PI3-kinase/AKT impliquée dans la régulation de la longévité (→) [21], elles traduisent la réponse aux

stimulus environnementaux, stress oxydatif ou facteurs de croissance

(→) Voir l'article de A. Brunet, page ??? de ce numéro

par exemple, en programmes d'expres-

sion de gènes spécifiques. Elles contrôlent ainsi la durée de vie d'un organisme et exercent un rôle suppresseur de tumeurs. Plus récemment, les FoxO ont été identifiées comme des régulateurs clés de la destinée des cellules souches embryonnaires et adultes. Cette fonction majeure semble liée à leur capacité de contrôler des processus cellulaires divers et opposés : prolifération, différenciation, réparation des dommages de l'ADN, résistance au stress oxydatif, métabolisme énergétique et apoptose [3, 4].

Fox01, nouvel acteur clé de la pluripotence des cellules souches embryonnaires

Le maintien de la pluripotence des CSE est assurée par une boucle régulatrice formée par OCT4, NANOG et SOX2, trois facteurs de transcription qui non seulement contrôlent leur

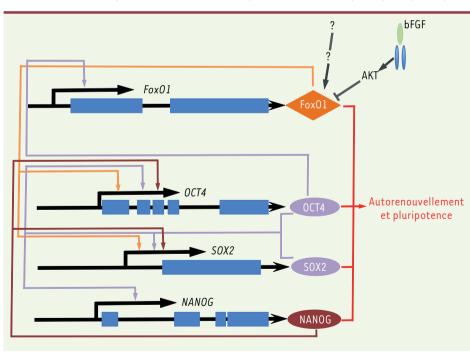


Figure 1. Fox01 et la régulation de la pluripotence. Le trio de facteurs de transcription OCT4, NANOG et SOX2 constitue la base du réseau transcriptionnel qui maintient la pluripotence et l'autorenouvellement des CSE. Ces facteurs forment une boucle régulatrice contrôlant leur propre expression. Fox01 a été identifié comme un nouveau membre de ce réseau : il contrôle directement l'expression des gènes pluripotents OCT4 et SOX2, occupant et activant leurs promoteurs respectifs. Le mécanisme de régulation de Fox01 dans les CSE n'est pas clairement défini mais ne semble pas dépendre uniquement de la voie PI3K/AKT.

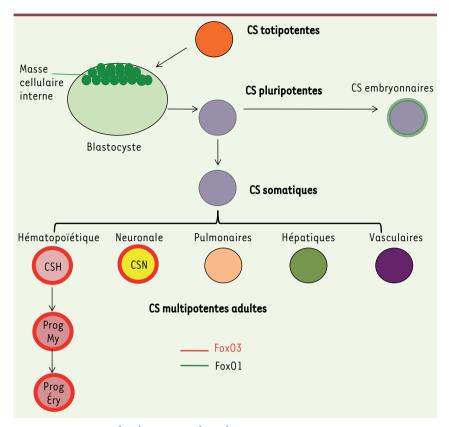


Figure 2. Rôle de Fox01 (vert) et de Fox03 (rouge) dans la conservation des propriétés des cellules souches embryonnaires et adultes respectivement. CSH: cellules souches hématopoïétiques; CSN: cellules souches neurales.

propre expression, mais aussi activent des gènes gouvernant la pluripotence et répriment des gènes requis pour la différenciation cellulaire [5]. Dans ce contexte, nous avons identifié récemment un nouveau composant du réseau transcriptionnel des CSE : FoxO1 [6] (Figure 1). Nous montrons que Fox01 est fortement exprimée dans les CSEh et dans les cellules ES murines (CSEm) indifférenciées et que son expression diminue au cours de la différenciation (Figure 2). Afin de déterminer le rôle de FoxO1 dans la pluripotence des CSEh, nous avons invalidé ce facteur dans une lignée de CSEh via des shARN inductibles par la doxycycline. La diminution d'expression de FoxOl dans les CSEh induit une perte de la morphologie et des marqueurs caractéristiques de cellules pluripotentes et une augmentation de l'expression des marqueurs spécifiques de l'endoderme et du mésoderme. Le phénotype initial pluripotent est restauré par la surexpression immédiate d'une forme de Fox01 (non reconnue par les shARN) dans les CSEh préalablement traitées par la doxycycline, démontrant la spécificité des shARN anti-Fox01 et le rôle majeur de FoxOl dans la régulation de la pluripotence des CSEh. Compte tenu de la multiplicité fonctionnelle des protéines FoxO, nous avions envisagé qu'une altération des fonctions cellulaires des CSEh (prolifération, cycle cellulaire, apoptose ou statut redox) pouvait être responsable de la différenciation de ces cellules, induite en l'absence de Fox01. Toutefois, aucun de ces processus biologiques n'est modifié dans les CSEh exposées à la doxycycline. En revanche, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine, de gels retard et de tests luciférase ont montré que Fox01 contrôle directement l'expression des gènes pluripotents OCT4 et SOX2, en occupant et activant leurs promoteurs respectifs (Figure 1). Notre étude met également en évidence quelques différences phénotypiques entre CSEh et CSEm pouvant refléter la différence temporelle entre les stades de développement embryonnaires chez la souris et chez l'homme [7]. Dans les CSEm. FoxO1 et 3 sont toutes deux capables de réguler l'expression de gènes pluripotents tandis que dans les CSEh, la surexpression de Fox03 n'induit pas l'expression des facteurs de pluripotence. De plus, les gènes du développement, qui sont activés par la diminution d'expression de FoxOl ou 3, diffèrent entre CSE humaines et murines. Ces observations excluent une redondance des fonctions des FoxO et révèlent le rôle spécifique de FoxOl dans la régulation de la pluripotence des CSEh. Étant donné que l'expression de Fox01 semble être régulée par OCT4 [5], ces résultats suggèrent que FoxOl est un membre à part entière du réseau de pluripotence des cellules ES. De façon intéressante, des données non publiées de notre laboratoire suggèrent que Fox03 intervient dans la différenciation des CSE (Zhang and Ghaffari, données personnelles). Notre hypothèse de travail stipule qu'une interaction fonctionnelle entre FoxOl et 3 pourrait assurer l'équilibre entre pluripotence versus différenciation dans les CSEh.

Cette nouvelle fonction des FoxO ne semble pas limitée à un seul membre de la famille Forkhead. En effet, le rôle de FOXP1 dans l'activation de plusieurs gènes pluripotents dont OCT4 et NANOG, a été caractérisé récemment dans les CSE [8], confortant le rôle fonctionnel essentiel des Forkhead dans la maintenance des CSE.

Les CSE sont capables de proliférer in vitro de manière illimitée tout en conservant leur pluripotence, un processus encore mal compris. Fox01 pourrait coordonner la pluripotence et la régulation du cycle cellulaire des CSE. Nous pouvons également supposer que son rôle dans le métabolisme, la longévité

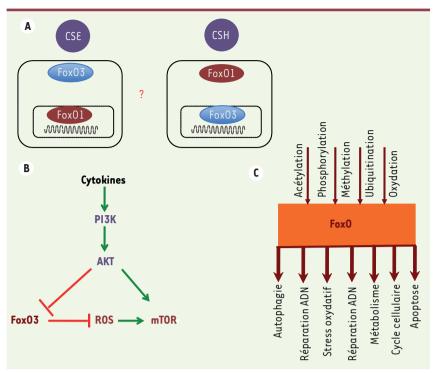


Figure 3. La diversité des rôles des FoxO. A. Dans les cellules souches embryonnaires (CSE) humaines, l'expression de Fox01 est nucléaire tandis que celle de Fox03 est cytoplasmique. Dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH), Fox03 est localisée dans le noyau tandis que Fox01 est majoritairement cytoplasmique. Ces données suggèrent des mécanismes de régulation distincts au sein des FoxO. B. L'activité transcriptionnelle et la stabilité des FoxO sont régulées négativement par la kinase AKT qui, activée, phosphoryle ces facteurs de transcription. Dans les progéniteurs hématopoïétiques, nous montrons que Fox03 régule le niveau de stress oxydant en inhibant la voie de signalisation AKT/mTOR. C. Schéma des modifications qui contrôlent l'activité de FoxO (en amont) et les fonctions de FoxO (en aval). De façon générale, des mécanismes impliquant des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitination ou des modifications d'oxydoréduction ont été identifiés.

ou la réponse aux dommages de l'ADN, influence la pluripotence des CSE. Ainsi, la fonction de FoxOl dans la régulation de la pluripotence peut être exploitée pour faciliter ou améliorer la reprogrammation des cellules somatiques en cellules souches embryonnaires.

Fox03, régulateur essentiel de la auiescence des cellules souches adultes

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) représentent une petite population cellulaire localisée dans la moelle osseuse et responsable de la production de toutes les lignées sanguines. Nos travaux ainsi que ceux d'autres groupes ont démontré un rôle spécifique de Fox03

dans la régulation du pool des CSH. L'invalidation simple de FoxO3 (FoxO3KO) chez la souris mime quasiment le phénotype observé dans les souris invalidées pour les trois protéines FoxO1, FoxO3 et Fox04 [9-12]. Chez les souris Fox03KO, le compartiment des CSH est diminué et la guiescence des CSH abolie. Fox03 préserve le pool des CSH en contrôlant le cycle cellulaire et le niveau du stress oxydant. De façon intéressante, nous démontrons que Fox03 régule aussi la voie de réponse au stress oxydant dans les progéniteurs myéloïdes, en empêchant leur expansion via l'inhibition de la voie de signalisation AKT/mTOR (target of rapamycine) [12] (Figure 3). Un rôle de FoxO3 dans la maintenance

des progéniteurs érythroïdes a aussi été identifié (Figure 2). Au-delà du système hématopoïétique, FoxO3 intervient dans d'autres populations de cellules souches: l'invalidation de Fox03 induit un défaut du pool des cellules souches neurales adultes, diminue leur autorenouvellement et leur capacité à se différencier en lignages neuronaux spécifiques [14, 15] (Figure 2).

Régulation des FoxO dans les cellules souches

L'action des FoxO est gouvernée à plusieurs niveaux. En réponse à l'insuline ou aux facteurs de croissance, la kinase AKT, activée, phosphoryle les FoxO nucléaires et relaie leur translocation dans le cytoplasme où elle les séquestre, bloquant leur activité nucléaire. À l'inverse, en conditions de stress, AKT est inactive et les protéines FoxO migrent dans le noyau où elles exercent leur activité transcriptionnelle. L'activité transcriptionnelle et la stabilité des FoxO sont également finement régulées par d'autres modifications post-traductionnelles telles que acétylation, méthylation, ubiquitination, ou oxydoréductions [3, 4, 16] (Figure 3). En étudiant le contrôle de l'activité des FoxO dans les CSEh, nous montrons que l'expression de Fox03 est principalement cytoplasmique et celle de Fox01 nucléaire (Figure 3). Or, dans les CSEh, la voie PI3K/AKT est activée en réponse à une stimulation par le bFGF (basic fibroblast growth factor), ce qui entraîne la phosphorylation de FoxO1 par AKT. Cependant, Fox01 n'est pas exportée du noyau dans ces conditions, suggérant que dans ces cellules, l'action inhibitrice habituelle de AKT sur FoxOl est bloquée par d'autres voies de régulation ou des modifications post-traductionnelles (Figures 1 et 3). Dans les cellules souches adultes (CSH et cellules souches neurales), c'est Fox03 qui est exprimée majoritairement dans le noyau alors que AKT est phosphorylée [10, 17] (Rimmelé and Ghaffari, données personnelles). Il est donc probable que plusieurs niveaux de régulation des FoxO existent et que des mécanismes de

régulation distincts pour Fox01, 3 et 4 existent dans une même cellule [4].

Ainsi, les protéines FoxO ont été identifiées comme des régulateurs clés de la destinée des cellules souches embryonnaires et adultes. Cette dualité de fonction suggère que l'autorenouvellement des CSE et des cellules souches adultes est régulé par certains mécanismes communs, comme cela a été mis en évidence en caractérisant la fonction de ZFX (zinc finger protein, X-linked) [18]. Outre leur capacité à contrôler la maintenance des cellules souches normales, les FoxO (FoxO3) influenceraient aussi celle des cellules souches leucémiques. La complexité fonctionnelle des FoxO est finement orchestrée via la régulation de l'activité des différents membres de la famille. Les enjeux actuels sont de comprendre les mécanismes de régulation des FoxO afin d'approfondir notre compréhension du comportement des cellules souches et d'envisager de nouvelles thérapies basées sur la modulation de l'activité des FoxO dans des modèles pathologiques [19].

Fox0 proteins in the control of stem cells

CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

REMERCIEMENTS

Nous remercions les National Institutes of Health RO1 DK077174, American Cancer Society Research Scholarship (RSG LIB-110480), Career Enhancement Award (K18 HL76510-01), Black Family Stem Cell Institute Exploratory Research Award, New York State Stem Cell Science (NYSTEM) award (CO24408), Irma Hirschl/Weill-Caulier Trust Research Award, Roche Foundation for Anemia Research (RoFAR) Award, et NIH P20 GM75019 (Gordon Keller PI, SG COPI), pour leur soutien financier à notre travail.

RÉFÉRENCES

- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 2007; 131: 861-72.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006: 126: 663-76.
- van den Berg MC, Burgering BM. Integrating opposing signals towards Forkhead box O. Antioxid Redox Signal 2011: 14: 1093-106.
- Zhang X, Rielland M, Yalcin S, Ghaffari S. Regulation and function of FoxO transcription factors in normal and cancer stem cells: what have we learned? Curr Drug Targets 2011; 12: 1267-83.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell 2005: 122: 947-56.
- Zhang X, Yalcin S, Lee DF, et al. FOXO1 is an essential regulator of pluripotency in human embryonic stem cells. Nat Cell Biol 2011; 13: 1092-9.
- 7. Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 2009; 4:487-92.
- Gabut M, Samavarchi-Tehrani P, Wang X, et al. An alternative splicing switch regulates embryonic stem cell pluripotency and reprogramming. Cell 2011; 147: 132-46

- Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. Cell 2007; 128: 325-39.
- Yalcin S, Zhang X, Luciano JP, et al. Foxo3 is essential for the regulation of ataxia telangiectasia mutated and oxidative stress-mediated homeostasis of hematopoietic stem cells. J Biol Chem 2008; 283: 25692-705.
- Miyamoto K, Araki KY, Naka K, et al. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. Cell Stem Cell 2007; 1:101-12.
- Yalcin S, Marinkovic D, Mungamuri SK, et al. ROSmediated amplification of AKT/mTOR signalling pathway leads to myeloproliferative syndrome in Foxo3(-/-) mice. EMBO J 2010; 29: 4118-31.
- Marinkovic D, Zhang X, Yalcin S, et al. Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis. J Clin Invest 2007; 117: 2133-44.
- Paik JH, Ding Z, Narurkar R, et al. FoxOs cooperatively regulate diverse pathways governing neural stem cell homeostasis. Cell Stem Cell 2009; 5:540-53.
- Renault VM, Rafalski VA, Morgan AA, et al. Fox03 regulates neural stem cell homeostasis. Cell Stem Cell 2009; 5:527-39.
- **16.** Burgering BMT. A brief introduction to FOXOlogy. *Oncogene* 2008; 27: 2258-62.
- Lee JY, Nakada D, Yilmaz OH, et al. mTOR
 activation induces tumor suppressors that inhibit
 leukemogenesis and deplete hematopoietic stem cells
 after Pten deletion. Cell Stem Cell 2010; 7: 593-605.
- Galan-Caridad JM, Harel S, Arenzana TL, et al.
 Zfx controls the self-renewal of embryonic and
 hematopoietic stem cells. Cell 2007; 129: 345-57.
- 19. Gonzales KA, Ng HH. Fox0: a new addition to the ESC cartel. Cell Stem Cell 2011; 9:181-3.
- Lataillade JJ, Brunet de la Grange P, Uzan G, Le Bousse-Kerdilès MC. Les cellules souches ont-elles l'âge de leur niche? À la recherche d'un sérum de jouvence. Med Sci (Paris) 2010; 26:582-5.
- Brunet A. Bien vieillir: la voie de signalisation insuline-FOXO et la longévité. Med Sci (Paris) 2012; 28:???-???.

Le récepteur d'aryl d'hydrocarbone, lien moléculaire entre alimentation et immunité

Cédric Vonarbourg

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Uniklinik Freiburg, Hermann-Herder-Strasse 11, D-79102 Freiburg, Allemagne. cedric.vonarbourg@uniklinik-freiburg.de

> Depuis quelques années, la recherche sur le système immunitaire des muqueuses intestinales connait un vif regain d'intérêt. Longtemps, les immunologistes ont cherché à résoudre le mécanisme de la reconnaissance par le système immunitaire du « soi », par définition inoffensif, et du « non-soi », pathogène. Depuis peu, ils s'attachent à comprendre comment cette reconnaissance est contrôlée dans l'intestin. Chaque jour en effet, les cellules immunitaires intestinales entrent en contact avec, et reconnaissent, une myriade de molécules issues de l'alimentation et de la flore microbienne, sans qu'aucune inflammation ne soit détectée. Ceci implique la coévolution, au cours des millénaires, de la flore bactérienne indigène et des cellules de l'hôte, en particulier des cellules immunitaires, vers un mutualisme commun au sein de l'intestin. Ce processus est d'autant plus important que tout déséquilibre dans ce mutualisme est associé à la survenue d'infections, de maladies chroniques inflammatoires et de cancers [1].

Figure 1. L'absence de AhR induit un changement profond de l'homéostasie intestinale. Dans l'intestin, les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) ainsi que les RORyt*ILC jouent un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie. Lorsque le facteur de transcription AhR est génétiquement invalidé, le nombre de RORyt*ILC et IEL chute entraînant l'absence de formation de tissus lymphoïdes tels que les cryptopatches (CP) et les follicules lymphoïdes isolés (FLI). L'IL-22 est une cytokine secrétée par les cellules RORyt*ILC et IEL. Cette cytokine est importante pour la modulation des réponses des tissus à l'état stationnaire ou lors d'épisodes inflammatoires. Dans les tissus intestinaux, l'IL-22 induit dans les cellules cibles la sécrétion de peptides antimicrobiens (PA) et de protéines impliquées dans la formation de mucus. Elle protège également ces cellules contre l'apoptose et stimule leur prolifération protégeant ainsi les tissus. Lors d'un défaut en AhR, le microbiome serait également modifié, avec une augmentation de la population bactérienne et une sensibilité accrue aux infections pathogènes.

Immunité intestinale :

le rôle des cellules inductrices de tissus lymphoïdes et des cellules NKR*ROR7t*
Le système immunitaire intestinal est constitué de cellules immunitaires dont une partie est regroupée dans des tissus lymphoïdes et l'autre dispersée dans l'intestin lui-même (Figure 1).

Les ganglions lymphatiques mésentériques - qui drainent l'intestin - et les plaques de Peyer sont des tissus lymphoïdes dont la spécification intervient durant l'embryogenèse. Leur formation est induite par les cellules inductrices de tissus lymphoïdes ou LTi (lymphoid tissue inducer cells) (Figures 1 et 2). Ces cellules ne possèdent aucun des marqueurs cellulaires habituellement associés à une lignée cellulaire donnée (par exemple, lymphocytes T ou B, cellules myéloïdes), mais elles expriment le facteur de transcription RORyt [2]. Après la naissance, les LTi se regroupent dans la lamina propria en follicules appelés cryptopatches (CP) puis avec le temps, évoluent en follicules lymphoïdes isolés (FLI) dans lesquels des lymphocytes B sont recrutés, conséquence de la colonisation de l'intestin par la flore bactérienne (Figures 1 et 2) [2]. Nous

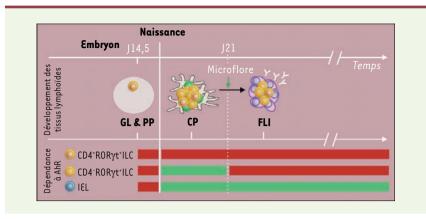


Figure 2. Dépendance des LTi et IEL aux agonistes de AhR au cours du temps. Au cours de l'embryogenèse, les cellules inductrices de tissus lymphoïdes (LTi) induisent le développement des ganglions lymphatiques (GL) et des plaques de Peyer (PP). Cette étape est indépendante de la fonction du facteur de transcription AhR. Après la naissance, les LTi interviennent dans le développement des follicules lymphoïdes intestinaux. C'est au cours de cette période, avant que l'intestin ne soit colonisé par la microflore bactérienne, que les agonistes de AhR ont un rôle majeur sur la survie et la prolifération des LTi, et par conséquence sur la formation normale des follicules lymphoïdes intestinaux. De manière intéressante, les IEL semblent être sensibles à la présence des agonistes à AhR sur la durée, indépendamment de la présence de la flore microbienne.

avons montré récemment que ces cellules peuvent également se différencier en cellules NKR⁺RORyt⁺ en exprimant des récepteurs normalement associés aux cellules natural killer (NK) [3]. Les cellules LTi et NKR⁺RORγt⁺ sont regroupées sous le terme de cellules lymphoïdes innées exprimant RORγt (RORγt*ILC: RORγt-expressing innate lymphoid cells) (Figure 1). Une des fonctions clefs des RORγt⁺ILC tient à leur capacité de sécréter de l'interleukine-22 (IL-22) qui est un régulateur majeur de l'homéostasie intestinale et protège contre les infections intestinales [4]. L'IL-22 induit dans les cellules épithéliales la production de peptides antimicrobiens et l'expression de molécules impliquées dans la réparation des tissus (Figure 1). En particulier, les RORyt*ILC ont démontré leur importance dans la résistance à l'infection par la bactérie Citrobacter rodentium, qui est un modèle murin des infections à Escherichia coli survenant chez l'homme. L'IL-22 est également impliquée dans la protection contre plusieurs formes de colites [4].

Au sein de l'épithélium intestinal, plusieurs types de lymphocytes ont été décrits, majoritairement des lymphocytes T, de TCR $\gamma\delta$; ces lymphocytes intraépithéliaux (IEL) jouent un rôle important dans la protection de l'épithélium contre les pathogènes et la maintenance des cellules épithéliales.

AhR et modulation du système immunitaire intestinal

Le récepteur d'aryl d'hydrocarbone (AhR: aryl hydrocarbon receptor) est un facteur de transcription hautement conservé. Au contraire de son rôle dans la réponse aux toxines environnementales, largement décrit, son rôle sur le système immunitaire des muqueuses n'est pas clairement défini.

AhR est exprimé dans de nombreux tissus. Toutefois, son niveau d'expression est relativement bas dans la majorité des lymphocytes, et seuls les lymphocytes T Th17 pro-inflammatoires ont été décrits comme exprimant des taux élevés de AhR, ce qui favorise leur différenciation et la sécrétion d'IL-22 [5, 6]. Depuis quelques années, notre laboratoire s'attache à caractériser les cellules RORyt*ILC intestinales. Nous avons remarqué qu'elles expriment également

un niveau élevé de AhR. Afin d'en comprendre l'importance, nous avons analysé des souris génétiquement invalidées pour le gène AhR. Chez ces souris, le nombre de RORyt*ILC est nettement réduit et il n'y a pas de formation de cryptopatches et de follicules lymphoïdes isolés [7]. La déplétion spécifique de AhR dans les cellules exprimant RORyt nous a permis de montrer que ce facteur avait un effet intrinsèque sur la prolifération post-natale des cellules RORyt*ILC, mais n'influençait pas leur développement [7].

En parallèle à nos travaux, une équipe anglaise s'est aussi intéressée au rôle de AhR dans les IEL. Le nombre d'IEL est drastiquement diminué dans les souris déficientes pour AhR [8], et, comme nous l'avons décrit pour les cellules RORyt*ILC, AhR agit sur les IEL bien qu'il n'ait aucun rôle dans leur développement. Dans ces deux études, AhR semble donc contrôler la survie des RORyt*ILC et des IEL [7, 8].

L'analyse des altérations associées à l'absence de AhR a révélé que les RORyt*ILC, comme les lymphocytes Th17 et les T $\gamma\delta$, ne peuvent plus produire d'IL-22 en quantité normale [6-8]. Il en résulte une baisse de la production de peptides antimicrobiens par l'épithélium intestinal et, en conséquence, une augmentation de la quantité de bactéries dans l'intestin grêle (en particulier des bactéries du genre des bacteroïdes) (Figure 1) [8], ainsi qu'une sensibilité accrue à l'infection par C. rodentium et au développement d'une colite induite par l'administration dans l'eau de boisson de sel de dextran sodium sulfate (DSS) (un modèle murin de colite) [7, 8].

Reconnaissance de composants alimentaires par AhR

Compte tenu de l'importance de AhR pour la survie des RORyt*ILC, il était important de comprendre de quelle manière AhR était régulé et en quoi ce facteur de transcription pouvait intervenir dans la survie de ces cellules. Les molécules agonistes de AhR appartiennent à une famille diversifiée de ligands qui inclut des toxines environnementales telles que la dioxine, mais aussi des molécules endogènes et alimentaires (par exemple, les flavonoïdes, les glucosinolates). Dans un environnement stérile. les souris sans flore bactérienne présentent un nombre normal de cryptopatches. arguant contre le rôle des agonistes de AhR d'origine bactérienne dans cette formation. En revanche, la nourriture des souris est une source d'agonistes : composée essentiellement de graines, elle contient des concentrations élevées de molécules phytochimiques telles que les polyphénols et les glucosinolates contenus également dans les légumes de la famille des Brassicacées (par exemple, le brocoli, les choux de Bruxelles) [7]. Or, nous avons observé que lorsque des souris sont soumises à un régime pauvre en molécules phytochimiques dès leur naissance, leur phénotype est le même que celui des souris ayant un défaut de AhR. La formation des follicules lymphoïdes y est retardée par un faible nombre de cellules RORγt⁺ILC. Ce régime n'a toutefois aucun effet sur les follicules lymphoïdes si ils sont déjà formés. En effet, le rôle de AhR sur les RORγt*ILC ne semble s'exercer que dans une fenêtre temporelle restreinte, allant de la naissance jusqu'à la colonisation de l'intestin par les bactéries (deux à trois semaines après la naissance), au moment où le régime alimentaire est déterminant car il n'y a pas encore d'apport d'agonistes d'origine bactérienne. Par la suite, ces agonistes d'origine bactérienne compensent certainement le manque d'agonistes de AhR d'origine alimentaire (Figure 2). De fait, lorsque le régime est supplémenté avec un agoniste de AhR avant la colonisation bactérienne, le nombre de RORyt*ILC et la formation des follicules intestinaux sont restaurés [7].

Les gènes cibles de AhR ne sont pas complètement connus. Cependant, nous avons montré que Kit - le récepteur du SCF (stem cell factor) - qui est exprimé sur les RORyt⁺ ILC, est une cible directe de AhR et est probablement impliqué dans le maintien du réservoir de cellules RORyt⁺ILC. En effet, la voie de signalisation Kit intervient dans la prolifération et la croissance cellulaires [7]. Toutefois, le (ou les) gêne(s) régulé(s) par ARR et impliqué(s) dans la survie des lymphocytes intraépithéliaux reste à définir.

Récemment un nouvel article a confirmé nos résultats sur le rôle de AhR dans les RORγt[†]ILC [9]. L'étude porte en particulier sur les cellules NKR⁺RORγt⁺, dont le nombre est très réduit chez les souris déficientes pour AhR. Cependant, contre toute attente, aucun lien n'a été identifié dans cette étude entre le récepteur AhR dans ces cellules et des composants alimentaires [9]. Nous proposons deux explications à ce résultat : premièrement, la nourriture utilisée dans cette étude contient de l'huile de soja, qui contient des agonistes de l'AhR. Deuxièmement, le régime utilisé dans cette étude l'a été chez des souris d'âge adulte. Or, si les follicules lymphoïdes sont formés, un régime pauvre en agonistes de AhR n'a aucune conséquence.

Régulation de l'immunité intestinale par la composante alimentaire

Pour la première fois, notre travail et celui d'une autre équipe mettent en lumière l'importance de l'alimentation pour le développement de tissus lymphoïdes et le maintien de l'homéostasie intestinale [7, 8]. Notre étude montre que les produits d'hydrolyse des glucosinolates conduisent à l'expansion postnatale des cellules RORyt+ILC, requises pour la formation des follicules lymphoïdes intestinaux et acteurs importants de l'homéostasie intestinale. Fait intéressant, les glucosinolates joueraient aussi un rôle important dans l'immunité des plantes, suggérant une fonction évolutive conservée dans les voies de défense immunitaire [7], comme le suggèrent Anne-Ruxandra

Carvunis et Matija Dreze dans ce numéro (→) [11]. Ainsi, les cellules RORyt*ILC et IEL jouent un rôle majeur et complé-

mentaire dans l'homéostasie intestinale et chacune de ces populations est capable de répondre à la présence d'agonistes de AhR dans l'alimentation. Il reste cependant plusieurs questions en suspens.

- · La plupart des résultats obtenus ont été générés dans les souris déficientes pour AhR, dans lesquelles les fonctions de RORyt*ILC et IEL sont toutes les deux absentes. Il faudra donc déterminer la part relative de ces populations dans l'homéostasie intestinale. Les expériences de déplétion spécifique de AhR dans les cellules exprimant RORyt ou RAG1 (recombination activating gene) ciblent malheureusement à la fois les lymphocytes T et les RORγt*ILC [7, 10]. Dans le modèle d'infection par C. rodentium, nous avons toutefois pu directement montrer le rôle essentiel de AhR des RORyt*ILC car l'immunité induite contre cette infection ne fait pas intervenir les lymphocytes T qu'après plusieurs semaines d'infection [7].
- Les gènes régulés par AhR pourraient également être différents suivant la population cellulaire étudiée.
- De manière intéressante, les régimes pauvres en agonistes de AhR agissent différemment sur les RORyt*ILC et les IEL [7, 8]. La provenance, et donc la nature, des aliments donnés aux souris pourraient expliquer ces différences.
- La recherche d'autres agonistes dans l'alimentation est également importante. Leur nature modifie-t-elle l'activité de AhR? Les gènes transcrits sont-ils alors différemment régulés ? Le futur des traitements des maladies inflammatoires intestinales se dessinera certainement en fonction de notre meilleure connaissance des agonistes de AhR et de notre compréhension de leur fonction sur l'immunité intestinale. •

The Aryl hydrocarbon receptor, molecular link between diet and immunity



CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

RÉFÉRENCES

- Saleh M, Trinchieri G. Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer. Nat Rev Immunol 2011: 11: 9-20.
- Mortha A, Diefenbach A. Natural killer cell receptorexpressing innate lymphocytes: more than just NK cells. Cell Mol Life Sci 2011; 68: 3541-55.
- Vonarbourg C, Mortha A, Bui VL, et al. Regulated expression of nuclear receptor rorgammat confers distinct functional fates to NK cell receptorexpressing rorgammat+ innate lymphocytes. *Immunity* 2010; 33: 736-51.

- Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. Nat Immunol 2011: 12: 383-90.
- Martin B, Hirota K, Cua DJ, et al. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* 2009; 31: 321-30.
- Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. Nature 2008; 453: 106-9.
- Kiss EA, Vonarbourg C, Kopfmann S, et al. Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles. Science 2011; 334: 1561-5.

- Li Y, Innocentin S, Withers DR, et al. Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. Cell 2011; 147: 629-40
- Lee JS, Cella M, McDonald KG, et al. AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch. Nat Immunol 2011; 13: 144-51.
- Yang Q, Saenz SA, Zlotoff DA, et al. Cutting edge: Natural helper cells derive from lymphoid progenitors. J Immunol 2011; 187: 5505-9.
- 11. Carvunis AR, Dreze M. Les facteurs de virulence ciblent des protéines clés de l'interactome de l'hôte. Med Sci (Paris) 2012 · 28 · 222-222

NOUVELLE

MITF: une clé génétique du mélanome et du carcinome rénal?

Corine Bertolotto^{1,2}, Fabienne Lesueur^{3,5}, Brigitte Bressac de Paillerets^{3,4}

> La transformation tumorale est la conséquence d'altérations génétiques et/ou épigénétiques de gènes clés (gènes drivers) contrôlant des processus tels que la prolifération cellulaire, l'apoptose, la sénescence et la réponse aux dommages de l'ADN. Ces altérations vont conduire à la synthèse de protéines activées et modifiées (pour les oncogènes) ou ayant une activité réduite, voire nulle (pour les gènes suppresseurs de tumeurs ou les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN). Les modifications de la stoechiométrie et du comportement biologique normal de ces protéines au sein des cellules constituent une étape d'accélération de la progression tumorale. À l'étape de l'initiation tumorale, l'altération génétique peut être constitutionnelle. Quant on sait que le pronostic vital d'un patient est étroitement lié à la précocité de sa prise en charge, l'identification des gènes de prédisposition aux cancers apparaît d'une importance capitale pour identifier et suivre les patients à risque.

Identification d'une mutation dans le gène MITF prédisposant au mélanome et au cancer du rein Facteurs de risque

de développer un mélanome

L'incidence du mélanome augmente régulièrement en France. En 2011, ce cancer était classé au 9e rang par sa fréquence¹. Paradoxalement, la mortalité reste stable, probablement en raison de l'efficacité des mesures de prévention et de dépistage précoce. Ces mesures sont d'autant plus importantes qu'en cas de diagnostic tardif, lorsque le cancer est au stade métastatique, il n'existe pas ou peu de traitements efficaces.

Les principaux facteurs de risque du mélanome incluent : un nombre élevé de nævi, l'exposition solaire et la réaction de la peau selon le phototype (couleur de la peau) et des mutations constitutionnelles ou germinales des gènes CDKN2A (cyclin-dependent

¹ Inserm, U895 (équipe 1), équipe labélisée Ligue contre le cancer, C3M, 06204 Nice, France;

² université Sophia-Antipolis de Nice,
UFR médecine, 06204 Nice, France;

³ service de génétique, Institut
de cancérologie Gustave Roussy,
94805 Villejuif, France;

⁴ Inserm, U946, genetic variation and human
diseases Unit, 75010 Paris, France.

⁵ addresse actuelle: genetic cancer
susceptibility group, international agency
for research on cancer, 69372 Lyon, France.
corine.bertolotto@unice.fr

kinase inhibitor 2A) et CDK4 (cyclin dependent kinase4). Dans le contexte de familles dont plusieurs sujets sont atteints de mélanome cutané et dans lesquelles une mutation germinale de CDKN2A a été identifiée, les porteurs de la mutation familiale ont un risque d'environ 60 % de développer un mélanome au cours de leur vie [1]. Outre les mutations rares dans les gènes de prédisposition CDKN2A et CDK4 (dits gènes à effet fort ou gènes à haut risque), des polymorphismes nucléotidiques ou SNP (single-nucleotide polymorphisms) fréquents (notamment dans les gènes MCIR [melanocortin receptor 1], ASIP [agouti signaling protein], MTAP [methylthioadenosine phosphorylase], MATP [membrane-associated transporter protein] et CASP8 [caspase 8]) ont également été associés à un risque modéré à faible de développer la tumeur. De plus, certains variants alléliques de MC1R modifient la pénétrance des gènes à haut risque [2].

Données : Francim/hospices civils de Lyon/INCa/Inserm/ Invs, 2011. http://www.e-cancer.fr/

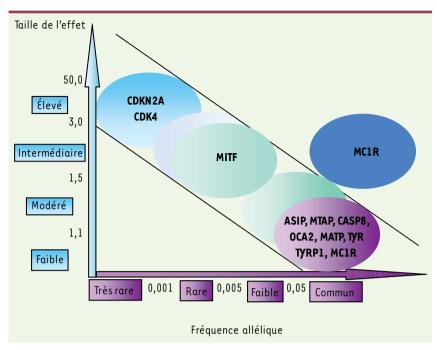


Figure 1. Les variants génétiques dans le mélanome. Fréquence allélique et importance de l'effet génétique (adapté de Manolio et al. [14]).

Identification d'une mutation germinale faux sens dans le gène MITF

Récemment, nous avons identifié par séquençage une mutation germinale fauxsens dans le gène MITF (microphthalmiaassociated transcription factor) qui est associée à un risque accru de mélanome chez les porteurs [3, 4]. MITF code pour un facteur de transcription de la superfamille MYC, de type hélice-boucle-hélice, qui comporte des répétitions de leucines. Il joue un rôle clé dans l'homéostasie mélanocytaire et a été impliqué récemment dans la pathogénie du mélanome. MITF régule la transcription de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, de la prolifération et de la migration cellulaires. En fonction de son niveau et de ses modifications post-traductionnelles, MITF agirait comme un rhéostat induisant différentes fonctions biologiques [5]. Une amplification génique et des mutations somatiques de MITF ont été rapportées dans des échantillons tumoraux de mélanome [6, 7]. Pour la première fois, nous démontrons la responsabilité de MITF dans la susceptibilité au développement d'un mélanome. En effet, nous

avons identifié une mutation germinale p. E318K qui, en changeant l'acide glutamique en position 318 en lysine, altère un domaine très conservé de la protéine. Dans les populations étudiées (France, Australie, Angleterre), la mutation est retrouvée chez moins d'une personne sur 165. Cependant, elle est deux (Australie et Angleterre) à cinq (France) fois plus fréquente chez les sujets atteints de mélanome (en particulier les sujets avec une histoire familiale de mélanome ou ayant eu des mélanomes primaires multiples) que chez les témoins. Cette mutation augmente au moins d'un facteur deux (étude australienne sur 3 920 sujets) à cinq (étude française sur 2 262 sujets) le risque de développer un mélanome. De plus, cette mutation ségrège dans certaines familles dans lesquelles surviennent des cas multiples de mélanome, mais pas dans toutes [3, 4]. Ces observations indiquent que ce variant de MITF est rarement retrouvé dans la population générale et qu'il appartient à la classe des variants génétiques conférant un risque intermédiaire de développer la maladie (Figure 1).

MITF: le premier facteur génétique identifié commun au mélanome et au cancer du rein

Des études épidémiologiques ont montré que les patients atteints de mélanome ont un risque accru de développer d'autres types de tumeurs tel qu'un carcinome à cellules rénales (CCR). Inversement, les individus atteints d'un carcinome à cellules rénales ont un risque significativement plus élevé de développer un mélanome. Les facteurs de risque connus de ce carcinome sont le tabagisme, l'obésité et l'hypertension artérielle. Aucun des facteurs de risque ou des facteurs génétiques connus pour ces deux cancers ne permettait d'expliquer le développement d'un mélanome et d'un cancer du rein chez le même patient [8]. Bien que le rôle de MITF dans la physiopathologie rénale reste à déterminer, il a été montré qu'il stimulait la transcription, entre autres, du facteur HIF1A (hypoxia inducible factor) [16], une cible plus ou moins directe de tous les gènes de prédisposition au cancer du rein, comme les gènes suppresseurs de tumeur VHL (von Hippel Lindau), FLCN (folliculin gene), FH (fumarate hydratase), SDHB (succinate dehydrogenase complex subunits B), TSC1 (tuberous sclerosis complex) et TSC2 et l'oncogène MET (codant pour l'hepatocyte growth factor receptor). MITF contrôle également directement la transcription de MET [9]. Il est donc très intéressant de souligner que la mutation germinale p.E318K de MITF a également été détectée chez une série de patients ayant développé un carcinome à cellules rénales et un mélanome malin cutané, ainsi que dans une série clinique de patients à haut risque de développer un carcinome à cellules rénales mais qui ne présentaient aucune des mutations germinales des gènes connus de prédisposition à ce cancer [3]. Une fois encore, la fréquence de la mutation était significativement plus élevée dans ces deux séries de patients que dans la population générale. Notre étude propose donc MITF comme étant le premier facteur génétique commun au mélanome et au cancer du rein.

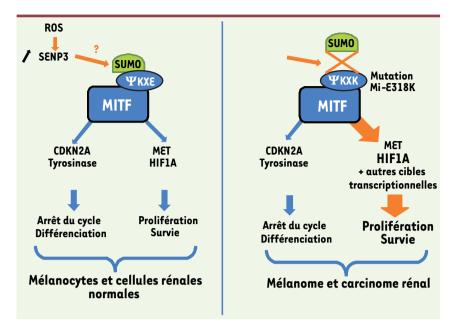


Figure 2. La mutation E318K de MITF altèrerait la réponse au stress oxydant. Les rayonnements ultraviolets et l'hypoxie, qui sont impliqués dans le développement du mélanome et du cancer du rein respectivement, conduisent à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les ROS stabilisent la désumoylase SENP3 (SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 3) [15] et induisent la transactivation de HIF1A. Dans le système mélanocytaire où MITF régule HIF1A, la mutation E318K de MITF, entraînant son hyposumoylation, mimerait une stabilisation de SENP3 induisant de façon soutenue la transcription de HIF1A. Ainsi, MITF hyposumoylée pourrait empêcher l'adaptation de cellules au stress et induire la transformation cellulaire.

Régulation de la sumoylation et cancer

La mutation faux-sens p.E318K de MITF transforme la séquence IKQE en IKQK. Cette séquence correspond à un site consensus de sumoylation (Ψ KXE où Ψ représente un acide aminé hydrophobe). La sumoylation est une modification post-traductionnelle aboutissant à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO sur une lysine acceptrice. Le processus de sumoylation est très proche biochimiquement de l'ubiquitinylation et contrôle la localisation cellulaire des protéines, leur stabilité et leur activité transcriptionnelle. Les protéines SUMO sont essentielles à la fonction des cellules eucaryotes [10]. Une relation entre la dérégulation de la voie de sumoylation et l'apparition de maladies chez l'homme, telles que les maladies neurodégénératives et les maladies cardiaques a été proposée. Ainsi, les protéines impliquées dans les maladies neurologiques telles que les maladies de Huntington (huntingtin), d'Alzheimer (tau, amyloid precursor protein) et de Parkinson (tau, α -synucléine, DJ-1), ainsi que dans les maladies cardiaques (NKX2-5), présentent une altération de leur sumoylation. Des mutations constitutionnelles de la lamine A, dans des cas de cardiomyopathies dilatées, altèrent un site consensus de sumoylation, ce qui entraîne une diminution significative de la liaison de protéines SUMO. Cette réduction de sumoylation s'accompagne d'une modification de la localisation cellulaire de la lamine A, un changement de morphologie nucléaire aboutissant à une mort cellulaire [11]. La sumoylation joue également un rôle dans la cancérogenèse. Le niveau d'expression des enzymes SUMO, UBC9 (une £2 ubiquitin-conjugating enzyme) et PIAS3 (protein inhibitor of activated STAT, une E3 SUMO-protein ligase) est augmenté dans certains cancers et a été associé

à de mauvais pronostics cliniques. Une surexpression des protéases SUMO (SENP) est également observée dans les cancers. De plus, plusieurs facteurs tels que p53, pRb, BRCA1 (*breast cancer*), dont les activités sont dérégulées au cours de la progression tumorale, sont des cibles de la sumoylation [12].

Nos résultats récents apportent un nouvel éclairage sur le rôle essentiel de la sumoylation dans le cancer [3, 4]. En effet, la mutation E318K de MITF abolit un site de conjugaison aux protéines SUMO et altère drastiquement la sumoylation de la protéine. L'analyse de l'occupation du génome par la forme sauvage et mutante de MITF a révélé une régulation d'un ensemble de gènes distincts avec notamment un groupe de régions fortement liées par le mutant. Nos résultats renforcent donc la notion que la sumoylation est impliquée dans la répression génique. Enfin, l'analyse du transcriptome a révélé que la forme hyposumoylée de MITF, qui favorise la migration et l'invasion cellulaires, est associée à des réponses cellulaires de type prolifération, hypoxie et inflammation. Les mécanismes moléculaires par lesquels MITF agit dans la phase d'initiation de la transformation restent à déterminer, mais une des hypothèses serait que la mutation E318K altère la réponse des mélanocytes et des cellules rénales au stress oxydant (Figure 2).

Conclusion

MITF appartient à la famille des facteurs de transcription de type Microphthalmia (MiT) comprenant également TFE3 et TFEB (transcription factor EB), déjà impliqués dans des cancers, en particulier celui du rein [13]. Notre étude révèle donc l'implication d'un troisième membre de la famille MiT dans la tumorigenèse rénale (Tableau I).

Les données génétiques et fonctionnelles démontrent que la substitution faux sens E318K de MITF, présente à l'état constitutionnel chez des patients ayant développé un CCR et/ou un mélanome, confère un pouvoir oncogénique

Cancers Protéines	Mélanomes	Carcinome à cellules rénales	Sarcomes
MITF	Mutation germinale 8318K Mutations somatiques 887R, 4T∆2B, L135V , L142F, A/T (-3), G244R, D380N Amplification génomique 3p14	Mutation germinale E318K	Mutations somatiques (fusion de gènes) EWS-ATF1 t(12;22)(q13;q12)
TFE3		Mutations somatiques (fusion de gènes) PRCC-TFE3: t(X;1)(p11.2;q21) ASPSCR1-TFE3: t(X;17)(p11.2;q25) CLTC-TFE3: t(X;17)(p11.2;q23) NONO-TFE3: inv(X)(p11;q12) PSF-TFE3: t(X;1)(p11.2;p34)	Mutations somatiques (fusion de gènes) ASPL-TFE3: t(X;17)(p11.2;q25)
TFEB		Mutations somatiques (échange de promoteur) Alpha:t(6;11)(p21.1;q12)	

Tableau I. Altérations des facteurs de transcription de la famille MiT (MITF, TFE3, TFEB) dans les cancers chez l'homme. L'activité de MITF est dérégulée par mutations, amplification et fusion de gènes. Des mutations somatiques dans différents domaines de MITF (7 % des mélanomes primaires et 16 % des mélanomes métastatiques) ont été détectées. Certaines de ces mutations modifient l'activité transcriptionnelle du facteur MITF. Des mutations germinales ont été identifiées dans environ 3 % des cas de mélanomes et/ou de carcinomes à cellules rénales (CCR) et 8 % des cas de mélanomes plus CCR. Une amplification génomique de MITF a été identifiée dans 10 à 20 % des cas de mélanome. La fusion entre EWS (Ewing sarcoma breakpoint region 1) et ATF1 (activating transcription factor 1) conduit à une stimulation de l'expression de MITF. L'activité de TFE3 est dérégulée par fusion de gènes et celle de TFEB par échange de promoteur.

au facteur de transcription. Une telle co-occurence pourrait représenter un nouveau syndrome tumoral. La mutation E318K de MITF pourrait être un évènement initiateur de la transformation du mélanocyte et de la cellule rénale.

L'identification de la mutation de MITF chez les sujets à risque pourrait permettre aux individus de bénéficier d'une surveillance accrue, ciblée sur la détection précoce de lésions potentiellement dangereuses. Cette découverte ouvre aussi des perspectives de chimioprévention, notamment par l'utilisation d'anti-oxydants. •

MITF: a genetic key to melanoma and renal cell carcinoma?

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Jacob Seeler (Inserm U579, Institut Pasteur, Paris) pour la relecture critique de ce manuscrit.

CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

RÉFÉRENCES

- Bressac de Paillerets B, Avril MF, Chompret A, Demenais F. Genetic and environmental factors in cutaneous malignant melanoma. *Biochimie* 2002; 84: 67-74.
- Demenais F, Mohamdi H, Chaudru V, et al. Association of MC1R variants and host phenotypes with melanoma risk in CDKN2A mutation carriers: a GenoMEL study. I Natl Cancer Inst 2010: 102: 1568-83.
- Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, et al. A SUMOylationdefective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. Nature 2011; 480: 94-8.
- Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, et al. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. Nature 2011; 480: 99-103.
- Carreira S, Goodall J, Denat L, et al. Mitf regulation of Dial controls melanoma proliferation and invasiveness. Genes Dev 2006; 20: 3426-39.
- Cronin JC, Wunderlich J, Loftus SK, et al. Frequent mutations in the MITF pathway in melanoma. Pigment Cell Melanoma Res 2009; 22: 435-44.
- Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. Nature 2005; 436: 117-22.

- Maubec E, Chaudru V, Mohamdi H, et al.
 Characteristics of the coexistence of melanoma and renal cell carcinoma. Cancer 2010; 116: 5716-24.
- Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R, Bertolotto C.
 Fifteen-year quest for microphthalmia-associated
 transcription factor target genes. Pigment Cell
 Melanoma Res 2010; 23: 27-40.
- Sarge KD, Park-Sarge OK. SUMO and its role in human diseases. Int Rev Cell Mol Biol 2011; 288: 167-83.
- Zhang YQ, Sarge KD. Sumoylation regulates lamin A function and is lost in lamin A mutants associated with familial cardiomyopathies. J Cell Biol 2008; 182: 35-9.
- 12. Bettermann K, Benesch M, Weis S, Haybaeck J. SUMOylation in carcinogenesis. *Cancer Lett* 2012; 316:113-25.
- Haq R, Fisher DE. Biology and clinical relevance of the micropthalmia family of transcription factors in human cancer. J Clin Oncol 2011; 29: 3474-82.
- Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. Nature 2009; 461: 747-53.
- 15. Huang C, Han Y, Wang Y, et al. SENP3 is responsible for HIF-1 transactivation under mild oxidative stress via p300 de-SUMOylation. EMBO J 2009; 28: 2748-62.
- 16. Buscà R, Berra E, Pouysségur J, Ballotti R. HIF1α est une nouvelle cible du facteur de transcription MITF: implication de la cascade AMPc-MITF-HIF1α dans le développement des mélanomes. Med Sci (Paris) 2006; 22: 10-3.



Découverte du premier facteur létal de Burkholderia pseudomallei, BLF1

Une avancée majeure pour contrer la mélioïdose

Guillaume Hautbergue

Department of molecular biology and biotechnology, the university of Sheffield, Firth Court, Western Bank, S10 2TN Sheffield, Grande-Bretagne.
g.hautbergue@sheffield.ac.uk

> La mélioïdose est une infection bactérienne chronique souvent mortelle qui sévit de manière endémique en Asie du sud et au nord de l'Australie, et de façon sporadique dans certains pays tropicaux. Plusieurs millions de personnes sont infectées à travers le monde. La maladie est causée par la bactérie Burkholderia pseudomallei [1], aussi appelée bacille de Whitmore du nom de son découvreur en 1911. Cette bactérie aérobie capsulée à Gram négatif vit dans le sol et les eaux de surface des régions d'endémie, et sous une forme intracellulaire invasive dans le cytoplasme des cellules hôtes infectées. Elle est majoritairement transmise via des plaies au contact de l'environnement contaminé, mais aussi par ingestion et inhalation d'eau ou de matières souillées. Comme c'est le cas pour l'anthrax et la peste, la forme inhalée est la plus virulente, expliquant la prédominance des décès lors des saisons de moussons où les tempêtes cycloniques favorisent la formation d'aérosols. Nombre d'enfants travaillant le plus souvent nu-pieds dans les rizières sont infectés, et environ un tiers de la population des zones d'endémie est séropositive pour le pathogène.

Caractéristiques pathogènes

La mélioïdose est extrêmement difficile à diagnostiquer car les différents symptômes miment ceux de la tuberculose, de la fièvre typhoïde et de la malaria : pneumonie et septicémie sévères, abcès cutanés purulents, abcès intra-abdominaux et lésions neurologiques. La bactérie présente jusqu'à sept morphotypes,

chacun ayant un pouvoir pathogène spécifique, ce qui complique son identification¹. La maladie est d'ailleurs surnommée « la grande imitatrice ». Une multi-antibiothérapie prolongée au moins cinq mois est disponible, mais de nombreuses rechutes infectieuses surviennent chez les survivants. Il n'v a pas de vaccin [2]. Le bacille peut causer une forme aiguë de la maladie au cours des premières semaines d'incubation, tuant jusqu'à 40 % de ses victimes malgré le traitement médical. À l'inverse, il peut persister dormant dans l'organisme humain pendant plusieurs décennies. Entre 1965 et 1972, plus de 200 000 soldats américains engagés dans le conflit vietnamien ont contracté la forme latente du bacille, et de nombreux vétérans restent aujourd'hui infectés sans toutefois que la maladie se soit manifestée cliniquement. La mélioïdose a donc aussi été surnommée « la bombe à retardement du Viêtnam ». Il en avait été de même pour des millions de soldats d'autres nationalités exposés à la bactérie au cours des guerres sinojaponaises (1894-1945) et d'Indochine (1946-1979).

Une arme de destruction massive

Le bacille responsable de la mélioïdose est un agent de guerre biologique potentiel qui pourrait être utilisé par des terroristes puisqu'il prolifère facilement [3] et résiste très bien au froid hors des régions tropicales. Il survit au moins une décennie dans l'eau bidistillée, et pourrait être responsable d'une contamination biologique à long terme d'une population et d'un environnement ciblés. Presque tous les animaux domestiques ou sauvages, ainsi que certaines plantes, sont sensibles au pathogène. Burkholderia mallei, le bacille apparenté responsable de la morve des équidés (une maladie contagieuse très proche de la mélioïdose) fut le premier agent de guerre biologique utilisé par les allemands contre les alliés lors de la Première Guerre mondiale (1914-1918) afin d'infecter le bétail et l'homme [4]. L'unité 731 de l'armée impériale japonaise (1932-1945), dont les expérimentations humaines létales sont notoires, a infecté des prisonniers de guerre chinois en contaminant leurs réserves d'eau potable. Plus tard, les soviétiques ont testé un programme d'épandages en champs qui tua involontairement plusieurs de leurs chercheurs. À la fin des années 1970, ils auraient utilisé ce bacille contre les moudjahidines au cours de la guerre d'Afghanistan [5].

Caractérisation de la toxine BLF1

L'analyse du génome de Burkholderia pseudomallei révéla l'acquisition par la bactérie d'un grand nombre de gènes codant pour divers facteurs de survie et diverses exotoxines impliquées dans la nécrose des tissus [6], ce qui faisait

^{1 «} Le diagnostic repose sur la mise en évidence de l'agent pathogène identifié après culture [La culture nécessite un laboratoire P3]. Les recherches par hémagglutination, immunofluorescence directe, ELISA, fixation du complément ou par PCR, peuvent être utiles au diagnostic mais aussi aider à préciser la prévalence de l'infection dans une population donnée. » François Trémolières, portail Orphanet.

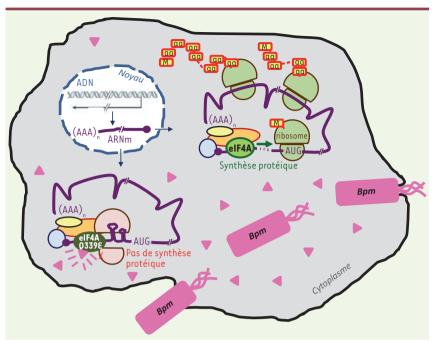


Figure 1. Schéma d'une cellule humaine infectée par la forme invasive de la bactérie Burkholderia pseudomallei (Bpm). Bpm sécrète de nombreux facteurs de virulence, dont la toxine BLF1 représentée par des triangles roses. Dans le noyau de la cellule hôte, la transcription de l'ADN des gènes conduit à l'export nucléaire d'ARN messagers matures (ARNm) qui sont ensuite traduits en protéines dans le cytoplasme. L'ARNm circularisé par un complexe riboprotéique d'initiation comporte de nombreuses structures secondaires. Leur détection par l'activité hélicase du facteur elF4A permet l'assemblage de l'ARNm avec des ribosomes actifs pour la synthèse des protéines (polymérisation d'acides aminés [aa] au niveau de la méthionine initiatrice [M]). La désamination de la glutamine 339 du facteur elF4A par la toxine BLF1 (mutation Q339E de la séquence protéique) entraîne la perte de l'activité hélicase et la séquestration des ARNm et des sous-unités ribosomiques dans des complexes d'initiation figés. Une molécule de toxine peut inactiver 700 molécules elF4A par minute. La mort de la cellule est provoquée par l'arrêt de synthèse protéique lorsque les ribosomes ont été inactivés.

conclure aux auteurs que cette bactérie est une adepte de l'adaptation. En 2007, l'analyse comparée des protéomes de Burkholderia pseudomallei et de l'espèce non pathogène, Burkholderia thailandensis, a mis en évidence 14 protéines de fonction inconnue [7]. Nos travaux ont débuté avec l'étude des protéines dont les séguences d'acides aminés ne présentaient pas d'homologie avec d'autres facteurs connus. Parmi ces protéines, nous avons identifié pour la première fois une toxine mortelle de Burkholderia - de nom systématique BPSL1549 -, et défini son mécanisme d'action dans les cellules humaines [8]. Elle fut nommée Burkholderia lethal factor 1 (BLF1). Sa toxicité est très grande puisqu'une injection intrapéritonéale de cent millionièmes de gramme suffit à tuer une souris. Des concentrations nanomolaires de cette toxine tuent également des macrophages en culture, ceux-ci l'absorbant non spécifiquement par pinocytose. La structure tridimensionnelle de BLF1 est quasi identique au domaine glutaminase du facteur cytotoxique nécrosant de certaines bactéries Escherichia coli pathogènes, suggérant que BLF1 est une enzyme impliquée dans la désamination de résidus glutamine dans les protéines cibles.

Mécanisme d'action de BLF1

Dans des cultures de cellules humaines infectées par BLF1, l'expression

protéique de gènes rapporteurs est réduite, de même que l'incorporation d'un acide aminé radioactif au sein de protéines néosynthétisées. La protéine cible de BLF1 a été copurifiée de facon stæchiométrique avec la toxine : il s'agit du facteur d'initiation de la traduction eucarvote (eIF4A) essentiel à la biosynthèse des protéines [8]. L'activité de elF4A requiert l'assemblage de ribosomes pour permettre la polymérisation des acides aminés en protéines selon l'ordre défini par les codons de l'ARN messager. Ce dernier est souvent parcouru simultanément par plusieurs autres ribosomes en phase d'élongation, formant des structures appelées polysomes. La sédimentation analytique d'extraits de cultures cellulaires infectées a révélé une accumulation de ribosomes associée à une forte diminution de polysomes, montrant que l'inhibition de la traduction résulte d'un blocage de l'étape d'initiation. Plus précisément, la toxine modifie la glutamine 339 du facteur elF4A et lui substitue un acide aspartique (mutation 0339E), inactivant l'activité ARN hélicase qui est requise pour la dénaturation des structures secondaires de l'ARN messager au cours de l'initiation de la traduction (Figure 1).

Espoirs thérapeutiques nés de cette découverte

La caractérisation de la base moléculaire de l'action de la toxine de la mélioïdose devrait permettre le développement de molécules inhibant l'interaction de la toxine avec eIF4A pour le traitement de la maladie. Le criblage de plusieurs milliers de composés chimiques altérant potentiellement cette interaction ainsi que la détermination de la structure de l'interface elF4A:BLF1 sont actuellement privilégiés. Un autre axe important de recherche consiste à inactiver cette nouvelle toxine pour permettre l'élaboration d'un vaccin qui n'a pas encore été formulé malgré de très nombreux essais [2]. Une autre application pourrait être suggérée : on sait que

plusieurs inhibiteurs de la traduction sont également de bons agents anticancéreux [9]. Or, le facteur mutant elF4A 0339E résultant de l'action de la toxine exerce une fonction de dominant négatif extrêmement toxique pour la synthèse protéigue, ce qui entraîne la mort de tous les types cellulaires immortalisés testés. Il représente donc potentiellement, avec la toxine BLF1, un nouvel outil pour le traitement chimiothérapeutique ciblé de tumeurs. Beaucoup d'efforts seront nécessaires avant que ne soit mis au point un système fiable de délivrance médicamenteux utilisant la micro-injection de particules, la thérapie génique sous contrôle d'un promoteur oncogène activé dans les cellules tumorales ou l'injection d'anticorps couplés reconnaissant les cellules cancéreuses. D'autre part, l'activité de BLF1 est conservée dans les macrophages, et ceux-ci pourraient servir ponctuellement à convoyer la protéine toxique vers les tumeurs [10]. Un brevet a été déposé pour les utilisations thérapeutiques de mutants elF4A et de la toxine BLF1. Characterisation of Burkholderia Lethal Factor 1 (BLF1). A breakthrough against melioidosis

CONFLIT D'INTÉRÊTS

L'auteur déclare n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Wiersinga WJ, van der Poll T, White NJ, et al. Melioidosis: in sights into the pathogenicity of Burkholderia pseudomallei. Nat Rev Microbiol 2006; 4: 272-82.
- Patel N, Conejero L, De Reynal M, et al. Development of vaccines against burkholderia pseudomallei. Front Microbiol 2011; 198: Epub Sep 27.

- 3. Stone R. Infectious disease. Racing to defuse a bacterial time bomb. *Science* 2007; 317: 1022-4.
- **4.** Wheelis M. First shots fired in biological warfare. *Nature* 1998; 395: 213.
- Estes DM, Dow SW, Scheizer HP, Torres AG. Present and future therapeutic strategies for melioidosis and glanders. In: Fong IW, Alibek K eds. Bioterrorism and infectious agents. A new dilemma for the 21st Century. New York: Springer, 2005: 99-145.
- Holden MT, Titball RW, Peacock SJ, et al. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, Burkholderia pseudomallei. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 14240-5.
- Wongtrakoongate P, Mongkoldhumrongkul N, Chaijan S, et al. Comparative proteomic profiles and the potential markers between Burkholderia pseudomallei and Burkholderia thailandensis. Mol Cell Probes 2007; 21:81-91.
- Cruz-Migoni A, Hautbergue GM, Artymiuk PJ, et al.
 A Burkholderia pseudomallei toxin inhibits helicase activity of translation factor eIF4A. Science 2011;
 334 821-4
- 9. Malina A, Cencic R, Pelletier J. Targeting translation dependence in cancer. *Oncotarget* 2011; 2:76-88.
- Batrakova EV, Gendelman HE, Kabanov AV. Cellmediated drug delivery. Expert Opin Drug Deliv 2011; 8: 415-33.

NOUVELLE

À l'origine du muscle, une histoire de baiser volé dans le dermomyotome

Anne Rios, Christophe Marcelle

> Chez les vertébrés, les somites (structures mésodermiques transitoires) sont à l'origine de tous les muscles squelettiques du corps et des membres. La structure originelle des somites se présente sous la forme d'une sphère épithéliale au centre de laquelle se situe une cavité appelée somitocæle. Quelques heures après sa formation, le somite primitif se compartimentalise selon un axe dorsoventral : les cellules de la partie ventrale du somite subissent alors une transition épithéliomésenchymateuse (TEM). Le mésenchyme qui en résulte est appelé sclérotome. Il se différencie par la suite en cartilage axial et en os (vertèbres et côtes). Les cellules de la partie dorsale du somite, restées épithéliales, forment le dermomyotome. C'est un compartiment transitoire à l'origine des muscles squelettiques et du derme [1].

Le muscle primitif (ou myotome) se forme à partir du dermomyotome en deux étapes.

Dans une première étape, les quatres bordures du dermomyotome épithélial génèrent le muscle primitif (appelé myotome primaire), qui est constitué de fibres musculaires mononucléées et postmitotiques appelées myocytes. Cette formation du myotome primaire met en jeu les cellules de la lèvre dorsomédiale du dermomyotome (DML), les plus proches du tube neural, qui migrent sous le dermomyotome où elles débutent un programme de différenciation myogénique et s'allongent selon l'axe antéro-postérieur jusqu'aux bordures de chaque somite [2, 3]. Puis les cellules des bordures caudale, rostrale et latérale accomplissent un processus de délamination similaire et forment Australian regenerative medicine institute, building 75, Monash university, Clayton campus, VIC 3800 Clayton, Australie. anne.rios@monash.edu.au

à leur tour des myocytes, complétant ainsi la formation du myotome primaire. La génération de myocytes à partir des bordures du dermomyotome est un processus qui se poursuit pendant plusieurs jours, permettant ainsi le développement progressif du myotome.

Dans une deuxième étape, qui se déroule environ 36 heures après la formation du somite, la partie centrale du dermomyotome subit une TEM rapide, au cours de laquelle les cellules du dermomyotome sont « parachutées » dans le myotome primaire où elles prolifèrent, ou bien se différencient en myocytes. Nous avons démontré que les cellules du dermomyotome constituent une population de progéniteurs musculaires permettant la croissance massive des muscles de l'embryon. Les cellules souches musculaires de l'adulte, appelées cellules satellites,

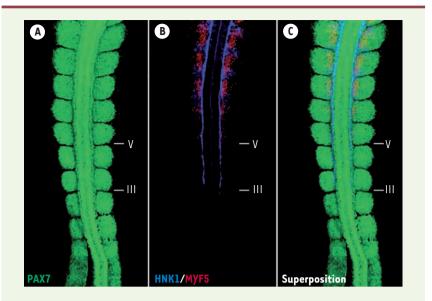


Figure 1. Immunomarquage de la partie postérieure d'un embryon de poulet à 2,5 jours de développement. Immunomarquage du marqueur du dermomyotome Pax7 (en vert, A et C), du marqueur HNK1 des crêtes neurales (en bleu, B et C) and du marqueur de myogenèse précoce MYF5 (en rouge, B et C). Le marquage HNK1 débute au troisième somite formé (somite III), alors que le marquage de MYF5 débute deux somites au-delà, au somite V. Nous pouvons observer en B et C la proximité des crêtes neurales et des somites, ainsi que la formation symétrique des myotomes de part et d'autre du tube neural (marquage MYF5).

sont également issues de cette même population de progéniteurs musculaires [4-6].

Nous nous sommes intéressés à la première étape de formation des muscles, qui démarre au niveau de la bordure médiale du dermomyotome (DML). Dans cette région, les cellules de la DML peuvent s'orienter vers deux destins cellulaires distincts : soit elles prolifèrent pour maintenir la structure épithéliale de la DML, soit elles sont transportées dans le myotome pour y suivre un destin myogénique. Nous avons voulu comprendre quels signaux régulent cette balance entre prolifération et différenciation, et identifier les facteurs biologiques permettant ainsi de réguler la formation progressive du myotome primaire.

Une activation transitoire de la voie de signalisation Notch est nécessaire à l'initiation de la myogenèse

L'implication de la voie Notch dans les choix cellulaires associés à de nombreux paradigmes développementaux faisait

de cette voie un excellent candidat à étudier. Au cours de notre travail, nous avons démontré que les progéniteurs de la DML activent la voie Notch de manière mosaïque (11 % des cellules activent la voie Notch) et que les cellules qui activent cette voie adoptent un destin myogénique. L'inhibition spécifique de la voie Notch arrête la myogenèse. Ceci constitue la première surprise de cette étude car au regard de la littérature importante, l'activation de la voie Notch est généralement associée à une inhibition de la myogenèse [7-9]. Un autre résultat surprenant est que, pour activer la myogenèse, les cellules de la DML doivent certes activer la voie Notch, mais de manière transitoire. En effet, si l'activation de cette voie se prolonge, la myogenèse est bien induite dans un premier temps, mais ensuite les cellules reviennent « en arrière » à un état indifférencié. Si on sait depuis longtemps que les cellules des tissus reconnaissent l'état activé ou non d'une voie de signalisation, notre résultat démontre pour la première fois qu'en outre, elles peuvent interpréter l'aspect cinétique et en particulier transitoire de l'activation d'une voie de signalisation. Il serait évidemment intéressant d'évaluer si l'activation transitoire d'autres voies de signalisation s'accompagne d'effets nouveaux ou inattendus sur la différenciation cellulaire dans des contextes cellulaires divers.

Les crêtes neurales régulent la myogenèse dans les somites via la voie de signalisation Notch

Afin de remonter à la source de ce signal transitoire, nous nous sommes intéressés aux crêtes neurales. Cette population provient de la partie dorsale du tube neural et, après avoir subi une transition épithéliomésenchymateuse, migre de part et d'autre du tube neural en passant à proximité de la DML (Figure 1). La différenciation des crêtes neurales est le résultat d'une combinatoire de caractéristiques acquises avant leur émigration du tube neural (telle l'identité de position conférée par le code Hox) et des interactions avec leur environnement [10]. Pour la première fois, nous avons identifié les signaux tissulaires requis pour la mise en place des muscles dans le somite. Nous avons montré que la déplétion des crêtes neurales diminuait de manière drastique la myogenèse. Via un mécanisme tout à fait remarquable, les crêtes neurales exprimant la molécule Deltal (un ligand des récepteurs Notch) interagissent pendant leur migration avec les cellules de la DML (qui expriment le récepteur Notch). Cette interaction entraîne l'activation temporaire de la voie Notch dans les cellules de la DML (Figure 2). Nous avons appelé ce nouveau mécanisme de signalisation dynamique le kiss and run (baiser volé).

Conclusion

Une des conclusions importantes de notre travail est que les crêtes neurales ne se limitent pas à l'intégration de signaux importants pour leur développement. Elles participent également

265

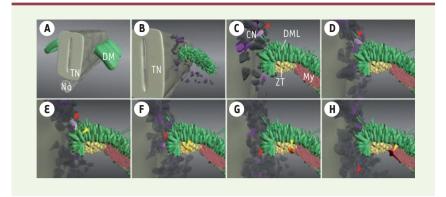


Figure 2. Modèle représentant le mécanisme de kiss and run entre des cellules de crêtes neurales et de la DML. Les cellules des crêtes neurales (en violet) exercent une signalisation Deltal. On observe en C, D et & une cellule des crêtes neurales (flèche rouge) en contact physique avec une cellule épithéliale de la lèvre dorsomédiale du dermomyotome (DML, en vert). Après cette interaction directe, la voie Notch est activée dans la cellule de la DML (de couleur différente et indiquée par la tête de flèche jaune en E, F, G et H) qui déclenche

le programme de myogenèse puis change de compartiment cellulaire pour accéder à une zone de transition (ZT) où l'activation de la voie Notch s'arrête et où la cellule s'engage dans la différenciation terminale dans le myotome pour devenir un myocyte (My).

activement au développement des tissus environnants en leur fournissant des signaux essentiels pour leur différenciation. Une conséquence de l'interaction dynamique entre les crêtes neurales et les somites est le lien entre la migration des crêtes neurales et la formation du myotome. Jusqu'à maintenant l'observation que le début du développement des crêtes neurales coïncidait avec celui de la formation du myotome n'était qu'une curiosité (Figure 1). Notre étude prouve désormais qu'il y a un lien mécanistique entre ces deux évènements. De plus, puisque le flot des crêtes neurales est symétriquement distribué des deux côtés du tube neural, il est fort probable que la remarquable synchronie de formation et de maturation des myotomes des deux côtés de l'embryon soit une conséguence directe de l'interaction entre les crêtes neurales et les somites. Enfin, la nature de l'interaction entre le récepteur Notch et le ligand Deltal implique un contact physique entre les cellules donneuses (les crêtes neurales)

et les cellules receveuses (les cellules de la DML). Ce mode de communication implique que le comportement migratoire des crêtes neurales portant le signal génère de façon dynamique une signalisation Notch dans le somite. Ce mécanisme est un exemple nouveau de communication dans lequel un signal porté et présenté par des cellules en migration induit un changement dans le destin cellulaire des cellules du tissu receveur. Ce mécanisme de kiss and run souligne l'importance des mouvements morphogénétiques et de la signalisation dynamique au cours de l'embryogenèse. La capacité de certains tissus et cellules à migrer est peut être un principe essentiel pour générer des flux d'activation permettant la différenciation spécifique de progéniteurs au sein de populations données. •

A tale of stolen kiss in muscle

CONFLIT D'INTÉRÊTS

L'auteur déclare n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Brent AE, Tabin CJ. Developmental régulation of somite dérivatives: muscle, cartilage and tendon. Curr Opin Genet Dev 2002; 12:548-57.
- Gros J, Scaal M, Marcelle C, et al. A two step mechanism for myotome formation in chick. Dev Cell 2004; 6:875-82.
- Gros J, Manceau M, Thomé V, Marcelle C. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature* 2005: 435: 954-8.
- Gros J, Serralbo O, Marcelle C. WNT11 acts as a directional cue to organize the elongation of early muscle fibres. Nature 2009; 457: 589-93.
- Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 2005; 435: 948-53.
- Kassar-Duchossoy L, Giacone ε, Gayraud-Morel B, et al. Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. Genes Dev 2005; 19:1426-31.
- **6.** Vasyutina E, Lenhard DC, Birchmeier C. Notch function in myogenesis. *Cell Cycle* 2007; 6:1450-3.
- Hirsinger E, Malapert P, Dubrulle J, et al. Notch signalling acts in postmitotic avian myogenic cells to control MyoD activation. Development 2001; 128: 107-16.
- Schuster-Gossler K, Cordes R, Gossier A, et al.
 Premature myogenic differentiation and depletion of progenitor cells cause severe muscle hypotrophy in Delta1 mutants. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 537-42.
- Le Douarin NM, Kalcheim C. The neural crest, 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999: 472 p.

Le trafic membranaire, un nouvel acteur du guidage axonal

Kathleen Zylbersztejn^{1,2}, Thierry Galli^{1,2}

¹ Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, institut Jacques Monod, CNRS UMR7592, programme développement et neurobiologie, Paris, 75013 France; ² Inserm ERL U950, trafic membranaire dans la morphogenèse neuronale et épithéliale, Paris, 75013 France. thierry.galli@inserm.fr

> Les molécules de guidage contrôlent la migration des neurones et la trajectoire des axones en croissance par attraction et répulsion. La signalisation se fait au niveau du cône de croissance où la molécule de guidage se lie à son récepteur. Le rôle du trafic membranaire dans ce mécanisme est encore largement inconnu. Les SNARE, protéines essentielles à la fusion membranaire, ont été récemment impliquées dans le guidage axonal au travers de leurs rôles dans le trafic de molécules régulant l'homéostasie du cône de croissance et dans le trafic des récepteurs de guidage. Nous faisons ici la synthèses des données les plus récentes, notamment sur le rôle des SNARE vésiculaires de type synaptobrévine-2 et TI-VAMP (tetanus neurotoxin insensitive vesicle-associated membrane protein) dans la répulsion et l'attraction axonales.

Régulation du guidage axonal

Lors du développement embryonnaire du système nerveux, la migration des neurones et la trajectoire des axones et dendrites en croissance sont contrôlées par les molécules de guidage. Ces protéines peuvent être attractives (nétrines et sémaphorines) ou répulsives (nétrines, sémaphorines, éphrines et slit) [1].

La signalisation des molécules de guidage se fait au niveau du cône de croissance situé à l'extrémité apicale de l'axone. Les molécules de guidage se lient à leur récepteur spécifique, activant ainsi une cascade de signalisation impliquant les petites GTPases de la famille des Rho et/ou le calcium intracellulaire. Par la suite, les seconds messagers agissent sur le cytosquelette

d'actine et de microtubules du cône de croissance, induisant un changement de sa morphologie en direction ou à l'opposé de la source de molécules. Le rôle du trafic membranaire dans ce processus reste encore mal établi [2].

Le trafic membranaire se divise en trois étapes majeures : (1) la formation et la fission d'une vésicule à partir d'un compartiment donneur, (2) le transport de cette vésicule sur le cytosquelette et, enfin, (3) l'ancrage de cette vésicule à un compartiment cible et sa fusion avec la membrane acceptrice [12]. La dernière étape implique une famille de protéines essentielles : les soluble NSF attachment protein receptors (SNARE). Il existe deux types de SNARE : les v-SNARE (v pour vesicular) localisées sur les vésicules, et les t-SNARE (t pour target) localisées à la membrane cible. Deux v-SNARE ont été impliquées dans le guidage axonal : Syb2 qui cible des neurotoxines botuliques et tétanique, et TI-VAMP qui est insensible aux neurotoxines. Deux rôles potentiels des SNARE dans le guidage axonal ont été proposés : (1) un rôle indirect dans le trafic de protéines régulant la réponse du cône de croissance au signal de guidage; (2) un rôle direct dans le trafic de membrane et des récepteurs de guidage. Ces deux hypothèses ne sont pas exclusives et peuvent être deux facettes d'un système plus complexe qui impliquerait d'autres éléments régulateurs dans l'espace et le

Rôles indirects des SNARE dans le guidage axonal

Synaptosomal-associated protein of 25kD (SNAP-25), la syntaxine-1 et

Syb2 sont impliquées dans le trafic de canaux ioniques qui, eux mêmes, influencent la signalisation dépendante des sémaphorines (Séma) [2]. Ainsi, SNAP-25 interagit directement avec le canal calcique Ca(v)2.1, et potentiellement avec Ca(v)2.3. Or, ces canaux sont nécessaires à la signalisation de Séma3A et Séma2A, ainsi qu'à la mise en place du réseau neuronal. Syb2 interagit aussi avec TRPC3 qui est un canal non sélectif perméable aux cations.

Syb2 et TI-VAMP interviennent par ailleurs dans le trafic de molécules d'adhésion qui affectent la réponse du cône de croissance aux signaux de guidage. Syb2 est ainsi impliquée dans le trafic de l'intégrine β1, qui est nécessaire à la répulsion induite par la molécule MAG (myelin associated glycoprotein). TI-VAMP, quant à elle, est impliquée dans le trafic de L1-CAM (L1-cell adhesion molecule), cette dernière régulant la réponse attractive ou répulsive induite par la Séma3A [3, 4].

Rôle direct de TI-VAMP dans le guidage attractif

Deux équipes ont montré que la formation de groupes de récepteurs DCC (deleted in colorectal cancer) induite par la nétrine-1 à la surface membranaire des axones, est dépendante d'une exocytose insensible à la toxine tétanique [5, 6]. Activé par la nétrine-1, DCC entraîne l'interaction de TI-VAMP avec la syntaxine-1 (Stx1), une t-SNARE partenaire de TI-VAMP. Les vésicules contenant TI-VAMP et DCC fusionnent alors avec

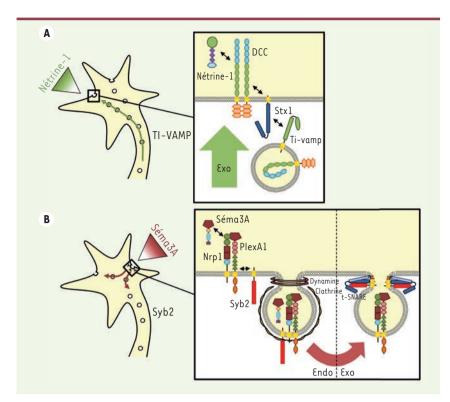


Figure 1. Rôles de TI-VAMP et Syb2 dans le trafic des récepteurs lors du guidage axonal dépendant de la nétrine-1 et de la sémaphorine-3A. A. L'attraction dépendante de la nétrine-1 induit un virage du cône de croissance par exocytose de membrane et de récepteurs. La nétrine-1 active son récepteur DCC qui se lie à la syntaxine-1. Les vésicules contenant TI-VAMP et riches en DCC subissent une endocytose en réponse à l'interaction entre la syntaxine-1 et TI-VAMP. B. La répulsion dépendante de la sémaphorine-3A induit un virage du cône de croissance par une endocytose de membrane et de récepteurs. La sémaphorine-3A se lie à son récepteur neuropiline-1/plexine-A1 qui interagit avec Syb2. Le complexe subit ensuite une endocytose par la voie dépendante de la clathrine. Le récepteur est ensuite recyclé à la membrane au sein d'un domaine membranaire exempte de Séma3A. Syb2 est nécessaire pour l'endocytose et le recyclage du récepteur. Séma3A: sémaphorine-3A; Nrp1: neuropiline-1; PlexA1: plexine-A1; Stx1: syntaxine-1; Syb2: synaptobrévine-2; DCC: deleted in colorectal cancer.

les domaines membranaires enrichis en syntaxine-1 et DCC, augmentant ainsi la quantité de récepteurs et de membrane en direction de la source de nétrine-1 [7] (Figure 1A).

Rôle direct de Syb2 dans le guidage répulsif

Nous venons de montrer que Syb2 est nécessaire au guidage répulsif induit par Séma3A, mais n'est pas impliquée dans le guidage attractif induit par Séma3C [8]. De plus, dans les embryons génétiquement invalidés (knock-out) pour Syb2, les axones frontaux du corps calleux sont désorganisés et défasciculés

comme dans le modèle d'invalidation de Séma3A, ces effets n'étant pas retrouvés après l'invalidation de Séma3C. Nos travaux ont aussi montré que Syb2 interagissait directement avec le récepteur de Séma3A, le complexe neuropiline-1/plexine-Al (Nrp1/PlexAl), via leur domaine juxtatransmembranaire. Cette interaction entre Syb2 et le récepteur de Séma3A a été confirmée à la fois dans le cerveau embryonnaire et dans les cellules épithéliales HEK, un système hétérologue complémentaire. Par ailleurs, sous l'action de Séma3A, le récepteur et une grande quantité de membranes subissent une endocytose

provoquant une réduction de la longueur axonale, une diminution de la quantité de plexine-Al au niveau du cône de croissance et son accumulation dans le corps cellulaire. Lorsque des axones sont dépourvus de Syb2, ces phénomènes sont abolis révélant un lien étroit entre l'expression de Svb2 et le trafic du récepteur de Séma3A. Séma3A inhibe aussi l'exocytose dépendante de Syb2 dans un système hétérologue constitué de cellules Cos7 exprimant Syb2 et le récepteur à Séma3A (Nrp1/PlexA1). Pris dans leur ensemble, ces résultats permettent de conclure que Syb2 est nécessaire au trafic du complexe Nrp1/PlexA1 au cours de la répulsion axonale induite par Séma3A, et ce en régulant l'équilibre exocytose/endocytose du récepteur [8] (Figure 1B).

Au regard de ces récentes découvertes sur TI-VAMP et Syb2, nous suggérons qu'un des rôles des v-SNARE dans le développement est de réguler la réponse du cône de croissance aux molécules de guidage et ce en contrôlant l'expression des récepteurs à la surface cellulaire via la modulation de la balance exocytose/endocytose.

Perspectives

Afin d'approfondir ces résultats, il serait intéressant de déterminer si TI-VAMP et Syb2 sont respectivement responsables de l'attraction et de la répulsion axonale générale ou s'ils sont impliqués dans des guidages spécifiques, impliquant nétrine-1 et sémaphorine-3A, respectivement. Les applications thérapeutiques potentielles sont d'une grande portée puisque les molécules de guidage sont aussi impliquées dans le développement de maladies neurodégénératives, de lésions nerveuses et de cancers [9, 10]. L'utilisation des neurotoxines clostridiales pourrait être envisagée pour stimuler la régénération neuronale après une lésion nerveuse (en retirant la sensibilité aux molécules répulsives), pour bloquer le développement et la migration de cellules cancéreuses,

comme nous l'avions proposé dans des travaux antérieurs [11]. •

Membrane traffic, a new actor in axon guidance

CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

REMERCIEMENTS

Nous remercions Marie-Christine Simmler pour la relecture de ce manuscrit. Ce travail a été soutenu par des financements provenant de l'Inserm, l'Association française contre les myopathies (AFM), l'Association pour la recherche sur le cancer (ARC), la mairie de Paris (programme recherche médicale et santé), la Fondation pour la recherche médicale (FRM), l'École des neurosciences de Paris (ENP) (pour T. Galli). K. Zylbersztejn

a reçu le soutien d'une bourse de docteur ingénieur du CNRS et d'une bourse de fin d'étude de la FRM.

RÉFÉRENCES

- Huber AB, Kolodkin AL, Ginty DD, Cloutier JF. Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu Rev Neurosci* 2003; 26: 509-63.
- 2. Zylbersztejn K, Galli T. Vesicular traffic in cell navigation. FEBS J 2011; 278: 4497-505.
- Alberts P, Rudge R, Hinners I, et al. Cross talk between tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein-mediated transport and L1-mediated adhesion. Mol Biol Cell 2003; 14: 4207-20
- Castellani V, Chedotal A, Schachner M, et al. Analysis
 of the L1-deficient mouse phenotype reveals crosstalk between Sema3A and L1 signaling pathways in
 axonal guidance. Neuron 2000; 27: 237-49.
- 5. Matsumoto H, Nagashima M. Netrin-1 elevates the level and induces cluster formation of its receptor DCC at the surface of cortical axon shafts in an exocytosis-dependent manner. Neurosci Res 2010; 67:99-107.

- Bouchard JF, Moore SW, Tritsch NX, et al. Protein kinase A activation promotes plasma membrane insertion of DCC from an intracellular pool: A novel mechanism regulating commissural axon extension. J Neurosci 2004; 24: 3040-50.
- Cotrufo T, Perez-Branguli F, Muhaisen A, et al. A signaling mechanism coupling netrin-1/deleted in colorectal cancer chemoattraction to SNAREmediated exocytosis in axonal growth cones. J Neurosci 2011; 31: 14463-80.
- Zylbersztejn K, Petkovic M, Burgo A, et al. A vesicular SNARE required for Semaphorin 3A axonal repulsion. J Cell Biol 2012; 196: 37-46.
- Pasterkamp RJ, Giger RJ. Semaphorin function in neural plasticity and disease. Curr Opin Neurobiol 2009; 19: 263-74.
- Rizzolio S, Tamagnone L. Multifaceted role of neuropilins in cancer. Curr Med Chem 2011; 18: 3563-75.
- Proux-Gillardeaux V, Galli T. Rôle du trafic membranaire dans la migration cellulaire:
 Une nouvelle application pour les neurotoxines clostridiales? Med Sci (Paris) 2005; 21:789-90.
- 12. Tareste D. Énergie libérée par la machinerie de fusion SNAREpin. Med Sci (Paris) 2008 ; 24 : 142-3.

NOUVELLE

Le silence parlant de la sirtuine 1 dans la stéatose et le cancer du foie

Hélène Gilgenkrantz, Christine Perret

> Les sirtuines sont des déacétylases dépendantes du NAD+ dont les substrats sont impliqués dans de nombreux phénomènes biologiques aussi variés que la croissance, l'apoptose, la sénescence, l'autophagie, l'adaptation à la restriction calorique et le métabolisme. Chez les mammifères, la protéine sirtuine 1 (Sirt1) est, parmi les sept membres de la famille des Sirtuines, celle qui se rapproche le plus du produit du gène silencing information regulator 2 ou Sir2 dont la mutation diminue la longévité chez le ver et la mouche. Cependant, si différents travaux ont démontré des effets positifs de Sirt dans les maladies associées à l'âge, aucune preuve directe n'a permis de démontrer que Sirt1 pouvait influer sur la longévité des mammifères. Ne disposant pas d'un domaine de liaison à l'ADN, Sirt1 module l'expression

de nombreux gènes par l'intermédiaire de facteurs de transcription et modifie certaines marques épigénétiques en s'associant à des régions d'hétérochromatine ou en déacétylant certaines histones. C'est sans doute sur le métabolisme que les effets de Sirtl ont été les plus étudiés. Ainsi, Sirtl peut être considérée comme un senseur métabolique faisant le lien entre la réponse au stress oxydant et métabolique de la cellule, sa structure chromatinienne et son expression génique, autant d'éléments modulés au cours du développement tumoral.

Sirt1 et stéatose hépatique

Sirt1 est connue pour son implication dans la gluconéogenèse hépatique, la régulation de la prise alimentaire par l'hypothalamus, la mobilisation des graisses du tissu adipeux blanc, la sécréInstitut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR 8104, université Paris-Descartes, 24 rue du faubourg Saint Jacques, 75005 Paris, France. helene.gilgenkrantz@inserm.fr

tion pancréatique d'insuline et l'activité de l'horloge circadienne dans les tissus métaboliques. Ainsi, l'augmentation de l'expression de Sirtl, qu'elle soit restreinte aux cellules β du pancréas, au tissu adipeux ou qu'elle touche l'ensemble de l'organisme [1], protège les souris contre le diabète et contre la stéatose hépatique - une accumulation anormale et délétère de triglycérides dans les hépatocytes. Les souris transgéniques surexprimant Sirt1 sont plus minces que leurs homologues contrôles, métaboliquement plus actives et ont des taux sériques réduits de cholestérol, d'adipokines, d'insuline et de glucose. De même, l'activation hépatique de Sirt1 induite par le jeûne, diminue la glycémie, l'insulinémie, le stress du réticulum endoplasmique ainsi que la stéatose hépatique de la souris obèse [2]. Par ailleurs, les

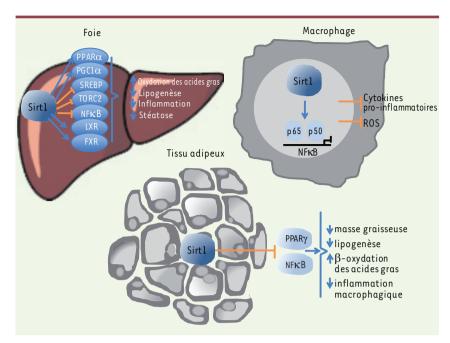


Figure 1. Les différentes voies de signalisation modulées par Sirt1. Sirt1 peut exercer un effet protecteur vis-à-vis de la stéatose hépatique en modulant différentes voies de signalisation. Ainsi, Sirt1 contrôle de nombreuses voies métaboliques au niveau du tissu adipeux et du foie. Par ailleurs, elle inhibe au niveau macrophagique la production de cytokines pro-inflammatoires et la production d'espèces réactives de l'oxygène. En son absence, inflammation et stress oxydant contribuent au développement de la stéato-hépatite. ROS: reactive oxygen species.

différentes invalidations de Sirt1 sélectivement dans le lignage myéloïde ou les neurones pro-opiomélanocortines qui contrôlent la prise alimentaire [3], induisent une susceptibilité accrue à la stéatose et une intolérance au glucose. Néanmoins, la délétion - spécifiquement dans le foie - de l'exon 4 du gène Sirt1 a induit des réponses contradictoires à une diète riche en graisses, accélérant la stéatose hépatique dans un cas [4], l'inhibant dans l'autre [5]. Plus récemment, une délétion des exons 5 et 6 du même gène a permis de conforter la notion d'un rôle protecteur de Sirt1 contre la stéatose hépatique en conditions normales d'alimentation [6]. Quelles sont les pistes moléculaires en jeu dans cette action pléiotrope qui concourt au développement d'une stéatose en cas de déficience ? La délétion de Sirt1 induit un défaut de signalisation de la voie du peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) et diminue la β -oxydation des acides gras [4], en partie via son coactivateur, le prolifera-

tor activated receptor γ coactivator 1α (PGCla), qui est aussi une cible directe de Sirtl [7]. Sirtl, qui est activée dans le foie par le jeûne, régule également le métabolisme du cholestérol via la déacétylation des liver X receptors (LXR) [8], du farnesoid X receptor (FXR) [9] et de la sterol regulatory element-binding protein (SREBP) [10]. Dans le tissu adipeux, l'augmentation de Sirt1 diminue le stockage des graisses et augmente la lipolyse peut-être via la répression de PPARy, un récepteur nucléaire qui joue un rôle essentiel dans le stockage des acides gras (Figure 1). Plus récemment, il a été démontré que Sirt1 contrôlait positivement Rictor, induisant une cascade de phosphorylation de la serine/ threonine protein kinase Akt et de la forkhead box protein 01 (Fox01) [11]. Ainsi, le défaut de Sirtl induit une production accrue de glucose hépatique, une hyperglycémie chronique et une production augmentée d'espèces réactives de l'oxygène. Ce stress oxydant inhibe la voie de signalisation de la mammalian target of rapamycin C2 (mTORC2)/Akt dans les autres organes sensibles à l'insuline, mettant à nouveau le stress oxydant au centre de la maladie métabolique du foie (Figure 2). À l'inverse, l'augmentation de la Sirt1 musculaire induite par la restriction calorique (en inactivant par déacétylation le facteur de transcription signal transducer and activator of transcription 3 [STAT3]) diminue l'expression de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et augmente la sensibilité du muscle à l'insuline [12]. Enfin, Sirt1 contrôle positivement l'expression d'une autre sirtuine, Sirt6, via son interaction avec FoxO1 et le nuclear respiratory factor 1 (NRF1). Or, la délétion de Sirt6 s'accompagne également d'une stéatose hépatique, caractérisée par une augmentation de la synthèse des triglycérides et une diminution de la β -oxydation [13]. L'expression de ces deux sirtuines, Sirt1 et Sirt6, est diminuée dans les échantillons de foie humain stéatosique, corroborant le rôle inhibiteur de ces deux sirtuines dans la formation du foie gras. Mais toutes ces cibles ne se limitent pas au foie et au tissu adipeux. En effet, au cours de la stéatose hépatique, l'inflammation et le stress oxydant jouent un rôle synergique conduisant à une maladie hépatique plus grave, la stéato-hépatite non alcoolique (NASH). Or, Sirt1 lie, déacétyle et inhibe NF-KB notamment au niveau macrophagique, réduisant la production cytokinique de ces cellules et, par conséquent, la réponse inflammatoire (Figure 1).

Sirt1 et carcinome hépatocellulaire

Pour un oncologue, Sirt1 a un visage de Janus. Son rôle dans la restriction calorique ou dans l'inhibition de la signalisation insulinique et de l'insulin-growth factor-1 (IGF-1) la place plutôt parmi les gènes suppresseurs de tumeur. Ainsi, l'incidence des cancers diminue chez les souris surexprimant Sirt1, bien qu'elle soit limitée aux carcinomes et aux sarcomes [14]. À l'inverse, les actions proangiogénique et proliférative de Sirt1, ainsi que sa fonction antiapoptotique, font plutôt de cette protéine un oncogène. Si ce rôle

Figure 2. Rôle de Sirt1 dans la résistance à l'insuline au niveau hépatique et périphérique. Le défaut de Sirt1 induit la néoglucogenèse via la voie Akt. L'hyperglycémie qui en résulte génère des espèces réactives de l'oxygène qui, en inhibant la même voie PI3K/Akt, sont responsables d'une résistance à l'insuline au niveau du muscle. Rictor : protéine associée à mTOR insensible à la rapamycine.

très controversé de Sirt1 dans la carcinogenèse dépend du contexte cellulaire, qu'en est-il au niveau hépatique ? Les souris transgéniques surexprimant Sirt1 sont protégées du carcinome hépatocellulaire induit par l'action combinée d'un régime riche en graisses et d'un carcinogène hépatique [15]. Au moins trois des fonctions de Sirt1 pourraient contribuer à cet effet suppresseur de tumeur [14]. En premier lieu, Sirtl est un gardien de l'intégrité du génome et ce, à plusieurs titres : lors d'un dommage de l'ADN induit par un défaut de p53, Sirt1 se relocalise au niveau des sites lésés, réprimant alors la transcription. On sait par ailleurs que l'absence de Sirtl s'accompagne d'un défaut de réparation des cassures d'ADN double brin. Enfin, tel un horloger du temps qui passe, Sirtl ralentit l'érosion télomérique in vivo. Le second mécanisme passerait par son activité anti-inflammatoire et sa capacité de réduction du stress oxydant puisque l'on sait que l'inflammation forme le trait d'union entre obésité/stéatose et cancer du foie (voir m/s 2010, n° 5, pp 477). L'analyse du foie

des animaux transgéniques surexprimant Sirt1 confirme non seulement leur protection vis-à-vis des lésions de l'ADN, mais aussi une inflammation dépendante de la voie NF-KB moins marquée. Enfin, le troisième et dernier mécanisme, qui jusqu'à présent n'a été démontré que dans l'intestin, pourrait peut être s'appliquer au foie. Sirt1, par déacétylation de la β -caténine, inhibe la tumorigenèse intestinale induite par l'activation de cette voie. Or, la voie Wnt/ β -caténine est activée dans près de 50 % des carcinomes hépatocellulaires. Différentes signatures moléculaires ont déjà permis de rendre compte de l'hétérogénéité de ces carcinomes. Il sera donc intéressant, à l'avenir, d'inclure les sirtuines dans ces classifications complexes. Le rôle des autres sirtuines a en effet été beaucoup moins étudié. Sirt2 semble agir comme un suppresseur de tumeur. Sirt6 est principalement localisée au niveau de la mitochondrie et jouerait un double jeu puisque capable, comme Sirtl, d'induire à la fois l'apoptose en conditions normales ou la survie en conditions de stress. S'il reste

encore beaucoup à apprendre sur les mécanismes d'action des sirtuines dans la carcinogenèse, les différents rôles de Sirt1 que nous venons de décrire dans le foie sont une nouvelle preuve que métabolisme et cancer sont intimement liés! Sirtuin 1, hepatic steatosis and liver cancer

CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

RÉFÉRENCES

- 1. Schug TT, Li X. Sirtuin 1 in lipid metabolism an obesity.

 Ann Med 2011: 43:198-211.
- Li Y, Xu S, Giles A, et al. Hepatic overexpression of SIRT1 in mice attenuates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. FASEB J 2011; 25: 1664-79.
- Ramadori G, Fujikawa T, Fukuda M, et al. SIRT1 deacetylase in POMC neurons is required for homeostatic defenses against diet-induced obesity. Cell Metab 2008; 12:78-87.
- Purushotham A, Schug TT, Xu Q, et al. Hepatocytespecific deletion of SIRT1 alters fattyacid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. Cell Metab 2009; 9: 327-38.
- Chen D, Bruno J, Easlon E, et al. Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction Genes Dev 2008 · 22 · 1753-7
- 6. Wang RH, Li C, Deng CX. Liver steatosis and increased ChREBP expression in mice carrying a liver specific SIRT1 null mutation under a normal feeding condition. Int J Biol Sci 2010; 6: 682-90.
- Li S, Liu C, Li N, et al. Genome-wide coactivation analysis of PGC-1a identifies BAF60a as a regulator of hepatic lipid metabolism. Cell Metab 2008; 8: 105-17.
- Li X, Zhang S, Blander G, et al. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. Mol Cell 2007: 28: 91-106.
- Kemper JK, Xiao Z, Ponugoti B, et al. FXR acetylation is normally dynamically regulated by p300 and SIRT1 but constitutively elevated in metabolic disease states. Cell Metab 2009; 10: 392-404.
- Walker AK, Yang F, Jiang K, et al. Conserved role of SIRT1 orthologs in fasting-dependent inhibition of the lipid/cholesterol regulator SREBP. Genes Dev 2010; 24:1403-17.
- Wang RH, Kim HS, XiaoC, et al. Hepatic Sirt1
 deficiency in mice impairs mTorc2/Akt signaling and
 results in hyperglycemia, oxidative damage, and
 insulin résistance. J Clin Invest 2011; 121: 4477-90.
- Schenk S, McCurdy CE, Philip A, et al. Sirt1 enhances skeletal muscle insulin sensitivity in mice during caloric restriction. J Clin Invest 2011; 121: 4281-8.
- 13. Kim HS, Xiao C, Wang RH, et al. Hepatic specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis. Cell Metab 2010; 12: 224-36
- Herranz D, Munoz-Martin M, Canamero M, et al. Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. Nat Commun 2010; 1:1-8.
- **15.** Bosch-Presegué, Vaquero A. The dual role of sirtuins in cancer. *Genes Cancer* 2011; 2:648-62.



Le récepteur proapoptotique OX1R dans le cancer colique

Silencieux in situ mais activable en thérapie

Marc Laburthe

Centre de recherche biomédicale Bichat-Beaujon (CRB3), UMRS 773 Inserm, université Paris-Diderot, faculté de médecine Xavier Bichat, 16, rue Henri Huchard, 75018 Paris, France. marc.laburthe@inserm.fr

> Le cancer colorectal est l'un des plus fréquents en Europe et en Amérique du Nord. L'exérèse de la tumeur primaire, voire de certaines métastases, est associée à une chimiothérapie dont la molécule de référence est le 5-fluorouracile (5FU) souvent utilisé en combinaison avec d'autres agents. La chimiothérapie reste cependant peu efficace dans les stades avancés. La génétique moléculaire a permis de décrire des gènes clés (oncogènes, gènes suppresseurs de tumeurs) dont la mutation ou l'expression altérée peut conduire au cancer colorectal. Par ailleurs, on sait que la prolifération des cellules cancéreuses coliques est stimulée par des facteurs de croissance présents dans leur environnement parmi lesquels l'epidermal growth factor (EGF) joue un rôle important à côté de peptides hormonaux tels que la gastrine ou la neurotensine.

L'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses par les orexines La biologie des régulations cellulaires nous enseigne que tout mécanisme de contrôle requiert un équilibre entre des signaux stimulateurs et inhibiteurs, le Yin et le Yang de la vie cellulaire. L'idée préconçue suivant laquelle les signaux d'inhibition de la croissance cellulaire (inhibition de la prolifération et/ou induction de la mort cellulaire) auraient disparu dans la cellule cancéreuse va de pair avec une absence de recherche de tels signaux. Partant de ce constat, nous avions recherché en 2004 de possibles inhibiteurs de la croissance de cellules cancéreuses coliques humaines parmi les peptides neurohormonaux existants [2]. Cette recherche a conduit à une découverte étonnante puisque deux peptides présents dans le cerveau, les orexines A et B, sont de puissants inhibiteurs de la croissance de la lignée cancéreuse colique HT-29. Cette découverte est étonnante parce que ces peptides, produits par des neurones hypothalamiques, contrôlent de nombreuses fonctions centrales et en particulier le sommeil (Encadré 1), et n'ont a priori rien à voir avec les cancers coliques.

chissons ces observations initiales de nouvelles données qui ouvrent des perspectives passionnantes concernant les orexines et le cancer colorectal. Nous montrons que les orexines inhibent la croissance de nombreuses lignées issues de cancers coliques primaires ou de métastases en provoquant la mort cellulaire par apoptose et cela en interagissant avec l'un des deux récepteurs des orexines, le récepteur OX1R. OX1R est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à la protéine Gq (Encadré 2), qui est exprimé de façon aberrante dans les cancers colorectaux

Dans un article récent [1], nous enri-

2 Les récepteurs des orexines

Les récepteurs OX1R et OX2R des orexines sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) appartenant à la famille de la rhodopsine. Couplés à la protéine Gq, ils augmentent le calcium cytosolique [7]. La signalisation du récepteur OX1R qui conduit à la réponse apoptotique vient d'être décrite et ne passe pas par cette voie calcique. En effet, elle implique la phosphorylation de deux tyrosines présentes dans des motifs de type immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) habituellement rencontrés dans les immunorécepteurs et très peu décrits dans les RCPG [8-10]. Cette phosphorylation aboutit à l'activation de la phosphatase Src homology phosphatase 2 (SHP2) qui déclenche la cascade apoptotique [8-10]. Ce mécanisme très original constitue un nouveau paradigme dans le signalisation des RCPG [10].

1 Les orexines

Les orexines A et B [4], aussi nommées hypocrétines 1 et 2 [5], sont codées par le même gène dans un précurseur commun. Ce sont deux peptides présents dans des neurones hypothalamiques qui se projettent dans de nombreuses aires cérébrales et contrôlent des fonctions variées dont le sommeil, la vigilance, la prise alimentaire, la respiration, le système de récompense ou l'addiction aux drogues [6]. Leur impact majeur sur le sommeil et la vigilance est révélé en pathologie puisqu'un déficit en orexine induit la narcolepsie (hypersomnolence et brusques épisodes de sommeil diurnes) associée à une cataplexie [6]. Les orexines ont des effets extracérébraux comme en témoignent l'existence de leurs récepteurs et/ou d'effets biologiques dans plusieurs organes périphériques [7]. La synthèse et la production d'orexines dans les tissus périphériques restent cependant non élucidées chez l'homme.

indépendamment de leur localisation et de leur stade. S'il est exprimé de façon aberrante c'est que les cellules épithéliales colorectales normales (qui donnent naissance aux cellules cancéreuses) n'expriment pas du tout le récepteur OX1R. Cette expression aberrante est conservée dans les cellules cancéreuses avant métastasé dans le foie, organe cible majeur des métastases de ce cancer. Cet article rapporte deux autres résultats majeurs : (1) les orexines sont capables d'induire la mort cellulaire par apoptose suivant la voie mitochondriale [2] dans des cellules cancéreuses coliques humaines sélectionnées pour être devenues insensibles à la chimiothérapie par le 5FU; (2) dans un modèle de xénogreffe de cellules cancéreuses coliques humaines chez la souris nude, les orexines, administrées par voie intrapéritonéale à des doses qui n'entraînent aucun effet secondaire notable, empêchent le développement de tumeurs et, mieux encore, font régresser considérablement des tumeurs déjà établies [1].

OXIR : un gène suppresseur de tumeur silencieux chez l'homme

Puisque les orexines sont des neuropeptides naturels présents dans notre organisme, la question se pose de savoir pourquoi elles ne tuent pas les cellules cancéreuses coliques chez les malades. La réponse est sans doute que ces peptides ne sont pas présents dans le côlon humain normal ni dans les tumeurs colorectales, et cela même à des taux infimes puisque la technique de RT-PCR échoue à détecter des traces d'ARNm du précurseur des orexines [1]. Comme les orexines ne semblent pas être présentes à des taux significatifs dans le sang périphérique, il est légitime de conclure que le récepteur OX1R exprimé de façon aberrante dans les cancers coliques n'est tout simplement pas activé in vivo chez les malades. Paradoxalement, les malades ont dans leur cerveau une molécule naturelle très active contre la progression des tumeurs coliques mais qui ne leur sert à rien puisqu'elle n'accède jamais à la tumeur. Le récepteur OX1R des cellules cancéreuses coliques est donc un récepteur silencieux in situ. C'est un nouveau type de gène dans les cancers, un gène suppresseur de tumeur dont l'expression est induite (par un mécanisme encore inconnu) dans le cancer mais qui reste inactif faute d'activateur endogène sur le site de la tumeur. En revanche, si l'on apporte l'activateur de façon exogène, alors ce gène suppresseur de tumeur devient une cible thérapeutique très efficace. Cette situation est paradoxale puisque les cancers sont généralement associés à une perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeur initialement présents dans la cellule normale qui donne naissance au cancer. Dans le cas présent, la cellule colique normale n'exprime pas ce gène suppresseur de tumeur mais il apparaît, sous une forme certes silencieuse, dans les cancers colorectaux et leurs métastases. Cette expression des récepteurs des orexines est-elle restreinte au cancer colorectal ? Cette question importante a déjà reçu un début de réponse puisque des lignées de neuroblastome [2] ou de cancer du pancréas [3] expriment respectivement des récepteurs OX1R et OX2R et sont sensibles à l'apoptose induite par les orexines. L'extension de ces données à d'autres cancers est en cours.

Un nouveau concept émerge donc, celui du néogène suppresseur de tumeur, silencieux mais activable en thérapie. Ces données ouvrent des perspectives dans le traitement pharmacologique des cancers colorectaux [1]. En cancérologie, comme dans d'autres domaines, il y a souvent loin de la coupe aux lèvres, et de nombreux travaux sont encore nécessaires pour passer, éventuellement, de ce nouveau concept à un traitement des cancers colorectaux chez l'homme. How to turn a silent proapoptotic gene in a potent antitumoral target in colorectal cancer

CONFLIT D'INTÉRÊTS

L'auteur déclare n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Voisin T, El Firar A, Fasseu M, et al. Aberrant expression of OX1 receptors for orexins in colon cancers and liver metastases: an openable gate to apoptosis. Cancer Res 2011: 71: 3341-51.
- Rouet-Benzineb P, Rouyer-Fessard C, Jarry A, et al. Orexins acting at native OX(1) receptor in colon cancer cells and neuroblastoma cells or at recombinant OX(1) receptor suppress cell growth by inducing apoptosis. J Biol Chem 2004; 279: 45875-86.
- Voisin T, El Firar A, Avondo V, Laburthe M. Orexininduced apoptosis: the key role of the seventransmembrane domain orexin type 2 receptor. *Endocrinology* 2006; 147: 4977-84.
- De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, et al. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. Proc Natl Acad Sci USA 1998: 95: 322-7.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishi M, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. Cell 1998; 92: 573-85.
- Mieda M, Sakurai T. Integrative physiology of orexins and orexin receptors. CNS Neurol Disord Drug Targets 2009; 4: 281-95.
- Voisin T, Rouet-Benzineb P, Reuter N, Laburthe M.
 Orexins and their receptors: structural aspects and
 role in peripheral tissues. Cell Mol Life Sci 2003; 60:
 72-87.
- Voisin T, El Firar A, Rouyer-Fessard C, et al. A hallmark of immunoreceptor, the tyrosine-based inhibitory motif ITIM, is present in the G protein-coupled receptor OX1R for orexins and drives apoptosis: a novel mechanism. FASEB J 2008; 22: 1993–2002.
- El Firar A, Voisin T, Rouyer-Fessard C, et al. Discovery
 of a functional immunoreceptor tyrosine-based
 switch motif in a 7-transmembrane spanning
 receptor: role in the orexin receptor OX1R-driven
 apportosis. FASFB I 2009: 23: 4069-80.
- Laburthe M, Voisin T. The orexin receptor OX1R in colon cancer: a promising therapeutic target and a new paradigm in G protein-coupled receptor signalling through ITIMs. Br J Pharmacol 2012; 165: 1678-87

