

**OCTOBRE 2020** 

Hors série n° 1 p 1 > 66 volume 36

> www.medecinesciences.org

## Les jeunes contre le cancer : la Ligue en soutien



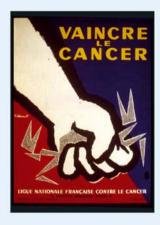
## 1920-1950

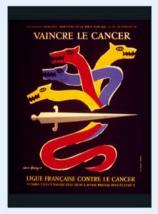
LA LIGUE, UN ENGAGEMENT AU FIL DES DÉCENNIES















## 1950-2000

























#### DIRECTEUR DE LA PUBLICATION

Gilles Bloch Président-Directeur général de l'Inserm

#### RÉDACTION

### **RÉDACTEUR EN CHEF**

Jean-Luc Teillaud (Paris)

### **RÉDACTEUR EN CHEF ADIOINT**

Thierry Jouault (Paris-Lille)

### SECRÉTAIRE GÉNÉRAL DE LA RÉDACTION

François Flori (Paris)

### ADIOINT À LA RÉDACTION

Jean-Pierre Hardelin (Paris)

### CONSEILLER SCIENTIFIQUE

Hervé Chneiweiss (Paris)

### DIRECTRICE ÉDITORIALE

Martine Krief-Fainzylberg

### CONSEILLERS ET REPRÉSENTANTS DE L'INSERM

Suzy Mouchet Michel Pohl

### **EDP Sciences**

17, avenue du Hoggar 91944 Les Ulis Cedex, France

Tél.: 06 09 34 98 84

Fax: 01 49 85 03 45

francois.flori@edpsciences.org

### Indexée dans

PubMed/Medline **Current Contents,** série Life Sciences EMBASE/Excerpta Medica PASCAL

CABS BIOSIS

Le Fonds de recherche du Québec - santé (FSRQ), l'un des membres fondateurs de médecine/sciences, soutient la revue pour sa diffusion aux chercheurs et médecins québécois

## Les jeunes contre le cancer : la Ligue en soutien

### SOMMAIRE

### ÉDITORIAUX

- 7 Quel adversaire, que le cancer! Les jeunes à la rescousse
- 9 Jeune et chercheur, qu'espérer de mieux ? François Guillemin

### **REVUES**

- 11 Facteurs de risque professionnels et environnementaux des cancers du poumon aux Antilles françaises Léïla Cabréra, Aviane Auguste, Léah Michineau, Jacqueline Deloumeaux, Clarisse Joachim, Danièle Luce
- 16 Agriculture et hémopathies malignes chez l'adulte : quel rôle des expositions professionnelles aux pesticides? Amandine Busson, Anne-Claire Gac, Bérengère Gruson, Matthieu Meryet-Figuière, Isabelle Baldi, Séverine Tual, Pierre Lebailly
- 23 Impact des bioinsecticides à base de Bacillus thuringiensis sur le développement de cancers de l'intestin Aurélia Joly, Julie Soltys, Armel Gallet, Raphaël Rousset
- 28 Obésité et cancer du sein : deux maladies du vieillissement limitées par l'activité physique Delphine Le Guennec, Stéphanie Rougé, Florence Caldefie-Chézet, Marie-Paule Vasson, Adrien Rossary
- 33 Neuropathie périphérique induite par l'oxaliplatine : comment faire barrière? Sonia Taïb, Juliette Durand, Isabelle Brunet
- **38** Profilage in silico des inhibiteurs de protéine kinases Victor Reys, Gilles Labesse
- 42 Rôle en cancérologie et ciblage du récepteur à activité tyrosine kinase PTK7 Laetitia Ganier, Xavier Morelli, Jean-Paul Borg
- 47 CD147: rôle et ciblage thérapeutique dans les cancers Alexandra Landras, Samia Mourah



### COMITÉ ÉDITORIAL

Antoine Bril (Paris) Paul Czernichow (Paris) Laurent Dollé (Bruxelles) Carine Franc (Villejuif) Marie Gaille (Paris) Hélène Gilgenkrantz (Paris) Bruno Giros (Montréal) Marcel Goldberg (Paris) Bruno Goud (Paris) Jacques Haiech (Strasbourg) Frédéric Jaisser (Paris) Xavier Jeunemaitre (Paris) Bertrand Jordan (Marseille) Anne-Marie Moulin (Paris) Anna Salvetti (Lyon) Sophie Sibéril (Paris) Alain Tedgui (Paris)

### COMITÉ SCIENTIFIQUE

Joël Bockaert (Montpellier) Denis Duboule (Genève) Gérard Friedlander (Paris) Thierry Galli (Paris) Simone Gilgenkrantz (Nancy) Michel Goldman (Bruxelles) Jean-Pierre Grünfeld (Paris) Axel Kahn (Paris) Jean-Claude Kaplan (Paris) Jean-François Lacronique (Paris) Arnold Munnich (Paris) Jean-Paul Ortonne (Nice) Marc Peschanski (Évry) Jacques Piette (Liège) Jacques Pouysségur (Nice) Bernard Rossier (Lausanne) Guy Rousseau (Bruxelles) Philippe Sansonetti (Paris) Germain Trugnan (Paris) Gilbert Vassart (Bruxelles) Éric Vivier (Marseille)

## Revue internationale de biologie et de médecine

- 50 Une piste en immunothérapie du cancer : cibler la signalisation des cellules NK Pierre-Louis Bernard, Vladimir Laletin, Sonia Pastor, Jacques A. Nunès, Geoffrey Guittard
- 56 Stratégies de ciblage spécifique de la tumeur fondées sur les caractéristiques des antigènes tumoraux et du microenvironnement tumoral Tristan Mangeat, Matthieu Gracia, Pierre Martineau, Bruno Robert
- 61 Les facteurs Ovol : des régulateurs clés de la plasticité épithélium-mésenchyme et des cellules souches Alexandra Mancheno-Ferris, Cédric Polesello, François Payre

PHOTO DE COUVERTURE: @ Viviane Haering - Poisson Volant - www.poissonvolant. fr



médecine/sciences a été le fruit d'une coopération entre le gouvernement de la République française et le gouvernement du Québec, à la suite d'une recommandation de la Commission permanente de coopération franco-québécoise.

médecine/sciences est membre du Committee on Publication Ethics (COPE) www.publicationethics.org

### International journal of biology and medicine

# Youth against cancer: the "League" in support

## CONTENTS

### **EDITORIALS**

- 7 What an adversary, cancer! Young people to the rescue Axel Kahn
- 9 Young and researcher, what could be better? François Guillemin

### **REVIEWS**

- 11 Occupational and environmental risk factors for lung cancer in the French West Indies Léïla Cabréra, Aviane Auguste, Léah Michineau, Jacqueline Deloumeaux, Clarisse Joachim, Danièle Luce
- Agriculture and haematological malignancies in adults: what role for occupational pesticide exposure? Amandine Busson, Anne-Claire Gac, Bérengère Gruson, Matthieu Meryet-Figuière, Isabelle Baldi, Séverine Tual, Pierre Lebailly
- 23 Impact of *Bacillus thuringiensis*-based bioinsecticides on the development of intestinal cancers
  Aurélia Joly, Julie Soltys, Armel Gallet, Raphaël Rousset
- 28 Obesity and breast cancer: two diseases of aging limited by physical activity Delphine Le Guennec, Stéphanie Rougé, Florence Caldefie-Chézet, Marie-Paule Vasson, Adrien Rossary
- 33 Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: how to create a barrier? Sonia Taïb, Juliette Durand, Isabelle Brunet
- 38 In silico profiling of protein kinases inhibitors Victor Reys, Gilles Labesse
- 42 Role in oncology and targeting of the PTK7 tyrosine kinase receptor
  Laetitia Ganier, Xavier Morelli, Jean-Paul Borg
- 47 CD147: role and therapeutic targeting of a promising molecule in the treatment of cancers

  Alexandra Landras, Samia Mourah

m/s hors série n° 1, vol. 36, octobre 2020



## International journal of biology and medicine

- 50 Unleashing NK cell signaling to improve cancer immunotherapy Pierre-Louis Bernard, Vladimir Laletin, Sonia Pastor, Jacques A. Nunès, Geoffrey Guittard
- 56 Strategies of tumor-specific targeting based on the antigenic tumor specificities and the tumor microenvironment characteristics
  - Tristan Mangeat, Matthieu Gracia, Pierre Martineau, Bruno Robert
- 61 OvoL factors: a family of key regulators of epithelium mesenchyme plasticity and stem cells
  Alexandra Mancheno-Ferris, Cédric Polesello, François Payre

### REVUE PRODUITE ET HÉBERGÉE PAR

EDP Sciences 17, avenue du Hoggar 91944 Les Ulis Cedex, France Tél.: 06 09 34 98 84 Fax: 01 49 85 03 45

francois.flori@edpsciences.org

### IMPRIMEUR

Corlet, Imprimeur, S.A. ZI route de Vire, 14110 Condé-sur-Noireau, France N° 83406

### INFOGRAPHIE, MISE EN PAGE

Desk 25, boulevard de la Vannerie 53940 St-Berthevin, France

### SERVICE ABONNEMENTS

EDP Sciences 17, avenue du Hoggar PA de Courtabœuf 91944 Les Ulis Cedex A, France Tél.: 01 69 18 75 75

Fax: 01 69 86 06 78 subscribers@edpsciences.org

Copyright© « Médecine/Sciences-Inserm ». Publication périodique mensuelle. Tous droits de reprographie à des fins de vente, de location, de publicité ou de promotion réservés à l'éditeur. Commission paritaire n° 1122 T 81597 Dépôt légal : à parution ISSN n° 07670974 ISSN électronique n° 1958-5381

**Index des annonceurs :**  $2^e$ ,  $3^e$ ,  $4^e$  couv, Ligue nationale contre le cancer



> Les chiffres sont connus de tous mais impressionnent encore chaque fois qu'on les énonce. Rien qu'en France où un peu moins de 750000 enfants naissent chaque année, 400000 nouveaux cas de cancers sont aujourd'hui détectés et 157000 personnes en décèdent. La mortalité globale liée aux cancers a cessé de progresser mais non leur fréquence d'ensemble. Expression du phénomène darwinien de sélection naturelle dans l'organisme, des cellules qui ont acquis un avantage de prolifération, survie et invasion, les cancers sont profondément liés à la vie ellemême, les éradiquer apparaît sur un plan théorique impossible. En revanche, les guérir de plus en plus souvent est un objectif plus réaliste. La Ligue s'est même laissée aller à fixer des buts à ce progrès, d'un peu plus d'une guérison sur deux au début des années 2020 à deux sur trois au tournant des années 2030. Plus ensuite. La guérison n'est d'ailleurs pas la seule forme du succès, la transformation d'un pourcentage croissant de cancers en maladies chroniques compatibles avec une vie prolongée de qualité en est aussi un des plus valables. Un autre combat essentiel est d'éviter autant qu'il se peut les 40 % de cancers « évitables », associées le plus souvent à des pratiques cancérigènes. La mortalité par cancers liée au tabac est de l'ordre de 40 000 personnes tous les ans; 15000 à 16000 en rapport avec l'alcool, 5000 à 6000 avec l'obésité et l'alimentation, 1600 le soleil, environ autant les virus... Ce sont là déjà près de 64 000 morts en principe évitables, la presque totalité des 40 % annoncés.

Nous en prenons conscience, poursuivre les deux objectifs prioritaires — prévenir, guérir, en tout cas éviter de mourir — rappelés ci-dessus — est d'une complexité considérable, la mobilisation pour y parvenir doit être générale. La Ligue, la recherche contre les cancers en France et dans le monde a besoin des jeunes, de leur contribution éminente aujourd'hui et des chercheurs séniors de talents que beaucoup seront dans l'avenir. Cette mobilisation est non seulement indispensable, elle est aussi justifiée en ce que les jeunes seront dans la durée les plus concernés par la société moderne dans laquelle le fardeau des cancers est si lourd, ils seront les plus menacés par la dépendance à des pratiques cancérigènes. C'est pourquoi d'ailleurs La Ligue prépare sur tout le territoire durant les années 2021 et 2022 les États généraux de la jeunesse face aux cancers dont la réunion « Jeunes & Chercheurs » d'octobre 2020 constitue une manière de coup d'envoi.

Ce numéro spécial de *médecine/sciences* — revue chère à mon cœur, j'en suis un co-fondateur et en ai été rédacteur en chef

durant quinze ans — offre un éventail de recherches qui s'intègrent aux différents objectifs rappelés plus haut. Le tabac occupe encore la première place des facteurs initiateurs de cancers, au premier chef des cancers du poumon qui en dépendent dans la proportion de 80 à 90 %. Pas partout, cependant, notamment aux Antilles où jusqu'à 40 % des cas sont observés sans lien avec la consommation de cigarettes. Des équipes de Guadeloupe, Martinique et Rennes en profitent pour tenter d'identifier d'autres facteurs étiologiques, en particulier liés aux pra-

tiques agricoles dans la culture et la transformation de la

canne à sucre.

Cette question des risques professionnels associées à l'agriculture est abordée par un consortium de laboratoires de Caen, Bordeaux et Amiens. Les grandes études de cohortes françaises et internationales ne retrouvent pas une fréquence globale accrue de cancers chez les agriculteurs comparés aux autres professions. En revanche, certaines hémopathies malignes y sont sur-représentées, spécialement des lymphomes non hodgkiniens et des myélomes multiples. Prouver la responsabilité de tel ou tel facteur est difficile mais l'attention est clairement attirée sur des insecticides de différentes familles et sur des herbicides tels le glyphosate.

Il semble intuitif de se méfier le plus des pesticides de synthèse dans la surreprésentation de certains cancers. Cependant, une équipe INRAe-CNRS de Sophia Antipolis se demande si certains biopesticides pourraient être eux aussi suspectés, en particulier les spores de Bacillus thuringiensis. De fait, une alimentation « bio » ne diminue pas la fréquence des cancers colorectaux. La Ligue est par ailleurs concernée par le caractère potentiellement néfaste sur la survenue de ces cancers des viandes de porc conservées par traitement aux nitrates et nitrites, technique tolérée en alimentation « bio ».

Le mécanisme majeur des effets cancérigènes de l'alimentation est l'obésité, question étudiée par une équipe de l'université d'Auvergne et de l'INRAe. Les chercheurs auvergnats établissent une relation entre les phénomènes inflammatoires du tissu adipeux, leurs conséquences immunologiques (sécrétions de cytokines pro-inflammatoires promotrices de tumeurs...) et le processus tumoral.

Ils analysent ensuite les mécanismes de l'effet protecteur d'une activité physique sur la carcinogenèse mammaire.

Quoiqu'on fasse, tous les cancers ne seront pas évités, il faudra les traiter en minimisant autant qu'il est possible les effets néfastes de la thérapeutique. Cela vaut bien entendu pour la chimiothérapie conventionnelle, par exemple par l'oxaliplatine. Ce produit très utilisé dans les cancers digestifs entraîne de fréquentes neuropathies chimioinduites, parfois graves et toujours douloureuses. Une équipe du Collège de France fait l'hypothèse que l'un des mécanismes pourrait en être une perméabilité anormale de la barrière sang-nerf qui permettrait à l'oxaliplatine de léser les axones.

L'arrivée en clinique en 2001 de l'imatinib mésylate, le Gleevec®, inaugure la révolution de la thérapie ciblée des cancers. Ce médicament a transformé le pronostic des jadis redoutables leucémies myéloïdes chroniques. L'étude du génome a permis de retrouver la présence de 535 protéines kinases du type de Bcr-Abl, cible du Gleevec®, elles forment le « kinome ». Le criblage de ligands potentiels de ces protéines kinases est essentiel mais représente une tâche immense. Une équipe mixte (Université, CNRS, Inserm) de Montpellier se propose de disposer de suffisamment de données structurales de kinases et de ligands potentiels pour réaliser un pré-criblage in silico du « kinome » humain.

Les récepteurs dotés d'activité de protéine kinase peuvent transduire un signal associé à des partenaires non enzymatiques, dont PKT7 est un exemple. Un groupe de l'université d'Aix-Marseille et de l'Institut Paoli-Calmette s'y intéresse en tant que cible potentielle d'intérêt dans la cancérogenèse colorectale. Les protéine kinases et molécules associées ne sont pas les seules cibles dont l'intérêt mérite d'être approfondi, une équipe de l'hôpital Saint-Louis (Université de Paris, Inserm) l'illustre avec une glycoprotéine CD147.

Les immunothérapies, elles aussi des thérapies ciblées, constituent collectivement le dernier grand progrès réalisé dans le traitement des cancers. Elles reposent sur des outils cellulaires ou sur des anticorps monoclonaux plus ou moins modifiés. Les CAR-T-cells (chimeric antigen receptor-T cells) sont des lymphocytes T des patients qui ont été génétiquement modifiés de sorte que l'activation d'un motif anticorps au contact d'un antigène tumoral active les propriétés cytolytiques du lymphocyte. Une équipe de l'Institut Paoli-Calmette et de l'Université d'Aix-Marseille fait le bilan des possibilités existantes et de l'intérêt d'un remplacement du lymphocyte T autologue par des cellules NK allogéniques.

Les perspectives offertes par le développement d'anticorps monoclonaux à activités antitumorales sont immenses. Cependant, la présence à faibles concentrations des antigènes tumoraux cibles à la membrane de cellules normales entraîne parfois de redoutables effets secondaires lors de l'administration de ces médicaments. Une équipe de l'Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier explore différentes stratégies fondées sur la nature du microenvironnement tumoral et censées accroître la spécificité de l'anticorps pour ses cibles tumorales.

Enfin, une dernière contribution de ce numéro provient de l'Institut de Biologie du Développement de l'université de Toulouse III Paul Sabatier et du CNRS. Elle aborde le vaste champ des relations entre différenciation et cancérisation. Plus spécifiquement le rôle du facteur de transcription *Ovo-like* dans la transition entre les phénotypes épithélial et mésenchymateux dans la cancérisation, l'invasion et l'établissement métastatique.

La Ligue est très fière de contribuer à couvrir les salaires doctoraux de plusieurs centaines de jeunes chercheurs, de financer nombre des équipes labellisées dans lesquelles ils mènent leurs recherches. Elle a le sentiment d'être ainsi fidèle à la volonté des 830000 donateurs qui lui permettent d'agir, dont la générosité est sans faille mais exigeante. Fidèle à la mission qu'elle poursuit depuis ses origines plus que centenaires. Fidèle enfin à ce qu'elle considère comme un devoir impérieux, ne rien céder aux cancers, les combattre pas à pas, obstinément. Avec les jeunes, comment cela se pourrait-il? Sinon, avec et pour eux. •

What an adversary, cancer! Young people to the rescue

### LIENS D'INTÉRÊT

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

Axel Kahn

Président national de La Ligue contre le cancer 14 rue Corvisart, 75013 Paris, France axel.kahn@ligue-cancer.net

TIRÉS À PART

A. Kahn



Tarifs d'abonnement m/s - 2020

Abonnez-vous

à médecine/sciences

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

Abonnez-vous sur www.medecinesciences.org





> Ce numéro spécial de médecine/sciences constitue le prolongement éditorial de la journée « Jeunes & Chercheurs » organisée par la Ligue nationale contre le cancer le mardi 20 octobre au Centre International de Conférences, Sorbonne Université<sup>1</sup>. Vous trouverez une sélection de onze articles restituant le propos de communications données lors de cet événement par des doctorants financés par la Ligue. Les sujets de ces articles sont volontairement éclectiques. Ils ont été choisis par les trois présidents des Commissions d'expertise nationales de la Ligue, parmi près de 90 propositions, et illustrent, au moins partiellement, la très riche diversité des thématiques sur lesquelles travaillent ces jeunes chercheurs : biologie des cellules tumorales et de leur environnement, épidémiologie, prévention, iatrogénie d'une chimiothérapie, apport de l'intelligence artificielle au ciblage thérapeutique figurent au sommaire. La journée « Jeunes & Chercheurs » et ce numéro de *médecine/* sciences ont été pensés par le service « Recherche » de la Ligue avec l'adhésion enthousiaste du Conseil scientifique national et l'aide extrêmement précieuse de ses Commissions d'expertise nationales, qu'elles soient ici vivement remerciées.

Malgré sa longue histoire, la Ligue est certainement restée trop discrète vis-à-vis de ce qu'elle peut revendiquer : « premier financeur associatif indépendant de la recherche en cancérologie en France ». Elle est depuis son origine un partenaire pour les chercheurs, tout au long de leur carrière. La formation des scientifiques les plus jeunes au métier de la recherche constitue pour la Ligue un domaine d'investissement stratégique et prioritaire. Sur les dix dernières années, la Ligue a financé près de 1 800 allocations doctorales pour un montant total de plus de 51 millions d'euros. De 2015 à 2019, environ 200 doctorants ont été soutenus annuellement tout au long de leurs parcours, 1re, 2°, 3° et 4° année de thèse, pour un budget annuel moyen de six millions d'euros. Ce montant représente à lui seul 16 % du total du soutien à la recherche financé par la Ligue sur cette période (Encadré 1). Et, dans un environ-

### 1 La Ligue et le soutien à la recherche sur le cancer

Le budget total du soutien à la recherche de la Ligue contre le cancer s'est élevé à un total d'environ 186 M€ entre 2015 et 2019, soit un peu plus de 37 M€ d'euros par an. Le soutien à la recherche est la première mission de la Ligue, conformément à la stratégie définie par son Conseil d'administration et aux souhaits de ses donateurs. Ce soutien s'appuie sur un ensemble d'actions complémentaires : des actions nationales, des actions régionales et des actions partenariales. Les actions nationales sont principalement dédiées à soutenir des équipes reconnues dont les travaux nécessitent des moyens importants pour poursuivre et approfondir des programmes de recherche sur le long terme. Elles reposent sur six appels à projets couvrant tout le *continuum* de la recherche sur le cancer — recherche fondamentale et translationnelle :

- · Allocations de thèse.
- Programme « Équipes Labellisées » qui permet à une centaine d'équipes françaises strictement sélectionnées sur la base d'un projet de bénéficier d'un soutien financier pérenne sur de longues périodes.
- Cartes d'Identité des Tumeurs®, programme pionnier ayant contribué dès l'année 2000 au développement de la génomique des cancers en France.
- Recherche clinique, plateformes thématiques de recherche clinique et mobilité des cliniciens.
- · Recherche en prévention.
- Recherche sur le cancer des enfants, des adolescents et des jeunes adultes.

De façon complémentaire, les actions régionales visent à offrir à d'autres équipes la possibilité de développer leur expertise et d'envisager la conception de projets ambitieux. Cette coordination des actions nationales et régionales permet à la Ligue de mutualiser ses ressources afin de s'engager efficacement auprès des chercheurs partout en France, depuis une idée originale jusqu'à sa valorisation clinique. La Ligue est engagée dans le co-financement de Programmes d'actions intégrées de recherche (PAIR) et de centres labellisées spécialisés

La Ligue est engagée dans le co-financement de Programmes d'actions intégrées de recherche (PAIR) et de centres labellisées spécialisés dans les essais de phase précoce (CLIP²) avec l'INCa ainsi que dans plusieurs essais cliniques promus par R&D UNICANCER et l'Organisation Européenne pour la Recherche et le Traitement du Cancer (EORTC).

Pour en savoir plus : www.ligue-cancer.net ; section L'engagement de la Ligue dans le soutien à la recherche.

 $<sup>^1\,</sup>$  La journée J&C s'est finalement tenue le 20 octobre au siège de la Ligue avec une diffusion en ligne en raison des contraintes sanitaires liées à l'épidémie de COVID-19.

nement où la crise sanitaire et ses répercussions économiques contraignent fortement les ressources de la Ligue, le caractère prioritaire de l'investissement dans la formation des jeunes chercheurs en cancérologie a été réaffirmé par le Conseil d'administration en juin dernier. C'est là que se joue l'avenir de la recherche qui cristallise tous espoirs de la Ligue, des patients et de ceux, donateurs et testateurs, qui lui octroient les moyens pour agir.

Avec l'organisation de la journée « Jeunes & Chercheurs » la Ligue a souhaité ostensiblement montrer la confiance accordée aux jeunes chercheurs qu'elle a choisi de financer (Encadré 2) mais également leur rappeler ce qui est attendu d'eux.

Jeune et chercheur... que pourrait-on espérer de mieux pour soi en tout début d'apprentissage professionnel? Le métier de chercheur permet de s'intégrer à une communauté dont la diversité est une vraie richesse et réalise un remarquable continuum. Le chercheur a la possibilité de participer à l'une des plus belles réalisations de l'humanité: la découverte, la construction, la transmission et l'essaimage des connaissances et des savoirs.

Viser l'excellence et faire progresser son domaine de recherche sont les exigences attendues pour tout jeune chercheur bénéficiant du soutien de la Ligue. Ces jeunes chercheurs dans lesquels la Ligue croît et investit ne représentent qu'une fraction des effectifs de leur classe d'âge : une fraction sélectionnée pour sa réussite à l'issue d'un parcours qui nécessite intelligence et labeur. Nos espérances et celles de tous nos concitoyens touchés par le cancer — malades, parents et proches — sont immenses. La médiocrité n'a pas de place dans la recherche.

Partenaire privilégié des chercheurs, La Ligue a contribué à de très belles réussites scientifiques et professionnelles. Parmi les responsables des « équipes labellisées » par la ligue (Encadré 1), figurent des chefs d'équipes qui ont bénéficié de notre soutien dès le début de leur carrière de jeunes chercheurs. Certains d'entre eux ont apporté des contributions majeures à la compréhension du cancer et s'impliquent dans la valorisation de leurs travaux avec, à la clé, des innovations thérapeutiques aujourd'hui en phase d'évaluation clinique. Nous attendons des doctorants qui ont participé à la journée « Jeunes & Chercheurs » qu'ils développent toutes les qualités nécessaires pour aller au moins aussi loin : l'intelligence, le discernement, la

### 2 le soutien aux Jeunes chercheur, le processus de sélection

Le dispositif de soutien aux jeunes chercheurs de la Ligue se concrétise principalement par un appel à candidatures national permettant à l'issue d'un Master de postuler à une allocation de recherche pour les trois années de la préparation de la Thèse et éventuellement à une 4° année. La sélection des dossiers soumis dans le cadre de ces deux appels à candidatures s'appuie sur un processus multi-étape : (1) évaluation par une des Commissions d'expertise nationales de la Ligue (2) classement des candidats par ordre de mérite (3) choix définitif par le Conseil scientifique national des candidats prioritaires pour l'obtention d'une allocation. Les reconductions d'allocations pour une 2° et une 3° année de thèse sont accordées après remise d'un rapport d'étape et l'évaluation positive au Conseil scientifique national.

Au cours des cinq dernières années, le service recherche de la Ligue a reçu une moyenne de 450 dossiers de candidatures pour une allocation pour les trois premières années ou pour la 4° année de thèse. Le taux de sélection sur cette période s'élève à un peu moins de 23 %.

Pour en savoir plus : www.ligue-cancer.net ; section Le soutien aux jeunes chercheurs.

rigueur, la ténacité, l'humilité et la culture du doute. Malgré des échecs, les scientifiques dont les résultats contribuent peu à peu à la victoire sur le cancer ne doivent pas douter de l'indéfectible soutien de la Ligue. ◊

Young and researcher, the best one can hope for?

### LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article

François Guillemin Président du Conseil scientifique national de la Ligue contre le cancer 14 rue Corvisart, 75013 Paris, France francois.guillemin@ligue-cancer.net

### TIRÉS À PART

F. Guillemin



Tarifs d'abonnement m/s - 2020

Abonnez-vous à médecine/sciences

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

Abonnez-vous sur www.medecinesciences.org





### Contexte

Le cancer du poumon est le premier cancer dans le monde en termes d'incidence et de mortalité. On estime en 2018 à près de 2,1 millions le nombre de nouveaux cas de cancer du poumon et à 1,8 million le nombre de décès [1].

Le principal facteur de risque des cancers du poumon est le tabac, qui est responsable d'au moins 8 cancers du poumon sur 10 dans les pays occidentaux. Les fumeurs ont un risque de cancer du poumon environ 10 fois plus élevé que les non-fumeurs, risque qui augmente avec la durée du tabagisme et la quantité de cigarettes fumées, la durée étant le déterminant le plus important. D'autres formes de tabagisme, comme le cigare et la pipe, ont également été associées à un risque accru de cancer du poumon bien que ce risque apparaisse cependant plus faible qu'avec la cigarette. Le tabagisme augmente le risque de tous les types histologiques de cancer du poumon. Enfin, le tabagisme passif est également associé à une augmentation du risque de cancer du poumon de 20 à 30 % [2].

Si le tabagisme est le facteur de risque majeur, de nombreux autres facteurs de risque de cancer du poumon ont été identifiés. Une grande partie d'entre eux sont des substances ou situations d'exposition présentes principalement en milieu professionnel, le cancer du poumon étant d'ailleurs le plus fréquent des cancers professionnels. L'amiante en est la cause la plus connue et la plus fréquente, mais plusieurs autres expositions professionnelles sont des facteurs de risque avérés, notamment la silice cristalline, les gaz d'échappement diesel, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), divers métaux (arsenic, cadmium, béryllium, certains composés du chrome et du nickel), les fumées de soudage et les rayonnements ionisants. Des incertitudes subsistent pour plusieurs cancérogènes pulmonaires professionnels probables, comme par exemple les bitumes ou les insecticides non arsenicaux [3]. La pollution atmosphérique et les particules fines de l'air extérieur sont également des causes reconnues de cancer du poumon [4].

## Facteurs de risque professionnels et environnementaux des cancers du poumon aux Antilles françaises

Léïla Cabréra<sup>1</sup>, Aviane Auguste<sup>1</sup>, Léah Michineau<sup>1</sup>, Jacqueline Deloumeaux<sup>2</sup>, Clarisse Joachim<sup>3</sup>, Danièle Luce<sup>1</sup>



De nombreuses études suggèrent que les facteurs alimentaires contribuent également au risque de cancer du poumon. Une alimentation riche en fruits et légumes a été associée de façon répétée à une diminution de l'incidence du cancer du poumon [5]. En revanche, une consommation importante de viande rouge, de graisses saturées, ainsi que les produits à base de viande salée et fumée, augmenteraient le risque de cancer du poumon. Contrairement à

<sup>1</sup>Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR\_S 1085, F-97100, Pointeà-Pitre, France. <sup>2</sup>Registre général des cancers de Guadeloupe, Centre Hospitalier Universitaire de Pointe-à-Pitre, Pointe-à-Pitre, France. <sup>3</sup>CHU Martinique, UF1441 Registre des cancers de la Martinique, Pôle de Cancérologie Hématologie Urologie Pathologie, Fort-de-France, France leila.cabrera@inserm.fr aviane.auguste@inserm.fr leah.michineau@inserm.fr jacqueline.deloumeaux@chuguadeloupe.fr Clarisse.Joachim@chumartinique.fr

daniele.luce@inserm.fr

ce qui est observé pour la plupart des cancers, l'obésité est associée à une diminution du risque de cancer du poumon, mais un effet de confusion résiduel lié à un moindre tabagisme ne peut être exclu. Les apparentés au premier degré de personnes atteintes de cancer du poumon ont un risque plus élevé de développer la maladie, ce qui indique une possible susceptibilité génétique. Des études pangénomiques ont mis en évidence plusieurs variants génétiques, associés cependant à de faibles augmentations de risque et qui n'expliquent qu'une partie du risque familial. Le rôle de plusieurs autres facteurs de risque a été évoqué. Les antécédents de certaines maladies pulmonaires, comme la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), l'asthme ou la tuberculose pourraient contribuer à la survenue du cancer du poumon. Des associations entre consommation d'alcool et de cannabis ont été rapportées. Le rôle potentiel de certains virus, notamment le papillomavirus humain (HPV) est discuté [6].

En Guadeloupe et en Martinique, les cancers du poumon sont moins fréquents qu'en France hexagonale. Les taux d'incidence standardisés sur l'âge (monde) pour 100 000 sur la période 2007-2016 sont, chez les hommes, respectivement de 12,1 en Guadeloupe, 10,3 en Martinique contre 51,8 en France hexagonale; chez les femmes, ces taux sont respectivement de 4,4, 6,3 et 17,9 [7].

Cette incidence plus faible s'explique principalement par une consommation de tabac plus faible [8]. En effet, la proportion de fumeurs est de 23 % chez les hommes et 13 % chez les femmes aux Antilles contre respectivement 32,3 % et 24,3 % en France hexagonale. Cette population à faible prévalence du tabagisme est donc particulièrement intéressante pour étudier d'autres facteurs de risque des cancers du poumon, au premier rang desquels figurent les expositions professionnelles et environnementales. L'implication d'autres facteurs de risque que le tabac est également suggérée par une étude descriptive portant sur les cancers du poumon en Guadeloupe [9], qui a mis en évidence une proportion élevée de cas non-fumeurs.

La population antillaise présente des particularités en matière de risques professionnels, avec des activités spécifiques comme la culture de la banane ou l'industrie de la canne à sucre. Des excès de cancer du poumon ont été rapportés au Costa Rica chez les travailleurs de plantations de banane [10]. Des risques élevés de cancer du poumon ont également été mis en évidence dans la culture de la canne à sucre en Inde [11], pouvant être dus à la présence de fibres de silice amorphe biogéniques dans les feuilles. Ces fibres ont des caractéristiques proches de celles de l'amiante, et peuvent également se transformer en silice cristalline à haute température, pendant la fabrication du sucre ou lors du brûlage des cannes avant ou après la coupe. Le brûlage des cannes peut entraîner par ailleurs des émissions de HAP, pouvant toucher aussi les habitations environnantes [12]. Le nombre d'études est cependant limité et ces résultats demandent à être répliqués dans d'autres populations.

Les Antilles sont également caractérisées par une utilisation importante de pesticides. Des associations entre le risque de cancer du poumon et plusieurs familles de pesticides ou substances actives utilisées aux Antilles ont été suggérées, notamment avec les carbamates, des organophosphorés comme le diazinon, et des organochlorés comme la dieldrine et le lindane [13, 14]. Des épandages aériens de fongicides ont également été effectués sur les bananeraies depuis la fin des années 1950 pour lutter contre la cercosporiose<sup>1</sup>.

En dehors de ces expositions spécifiques, les particularités du tissu économique aux Antilles permettent d'être dans une situation favorable pour étudier le rôle d'expositions professionnelles. La plupart des activités sont représentées, mais la forte proportion de très petites entreprises (plus de 90 %) et la fréquence élevée de l'emploi informel sont associées à des conditions de travail plus péjoratives qu'en France hexagonale.

Le rôle des expositions professionnelles et environnementales dans l'étiologie des cancers du poumon reste donc largement méconnu aux Antilles. Aussi, l'objectif principal est d'examiner le rôle de ces facteurs, et, plus généralement, de clarifier le rôle et l'impact de différents facteurs de risque sur le risque de cancer du poumon. Plus spécifiquement, il s'agit pour nous (1) d'étudier les associations entre expositions professionnelles et risque de cancer du poumon, (2) d'étudier le rôle éventuel d'expositions résidentielles, (3) d'étudier dans cette population d'autres facteurs de risque connus ou suspectés et les interactions entre ces facteurs et les expositions professionnelles et environnementales, et enfin (4) d'évaluer la proportion de cas de cancer du poumon attribuables aux différents facteurs de risque dans ces régions.

### Méthodes

Ce travail est fondé sur les données d'une étude castémoins en population générale, menée en Guadeloupe et en Martinique entre 2013 et 2016. Cette étude est une extension aux Antilles de l'étude lcare, une large étude cas-témoins sur les cancers respiratoires conduite en France hexagonale [15], et a utilisé le même protocole et questionnaire, avec quelques adaptations au contexte local.

Les cas ont été identifiés en collaboration avec les registres des cancers des deux régions. Les cas éligibles sont tous les patients atteints d'une tumeur primitive de la trachée, des bronches et du poumon (classification internationale des maladies, 10e révision, codes C33-C34) nouvellement diagnostiquée entre le 1er avril 2013 et le 31 décembre 2016, résidant en Guadeloupe ou en Martinique et âgés d'au plus 75 ans au moment du diagnostic. Tous les types histologiques ont été inclus. Le groupe témoin est un échantillon aléatoire de la population générale de la zone d'étude. Le recrutement a été réalisé par une procédure d'appels téléphoniques aléatoires, incluant les téléphones cellulaires. Le recrutement a été stratifié de façon à obtenir une répartition des témoins par âge, sexe et département comparable à celle des cas de cancers. Une stratification supplémentaire a été utilisée pour obtenir une répartition par catégorie socio-professionnelle comparable à celle de la population (obtenue à partir des données du recensement), afin de contrôler les biais de sélection potentiels résultant de taux de participation différentiels selon la catégorie socio-professionnelle.

Les cas et les témoins ont été interrogés par des enquêteurs spécialement formés, avec un questionnaire standardisé portant notamment sur les caractéristiques

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> La cercosporiose est un ensemble de maladies fongiques foliaires dues aux champignons du genre des Cercospora. Celle du bananier a été reclassée dans le genre Mycosphaerella car due en fait au champignon Mycosphaerella musicola.

13

	Cas (n	= 147)		noins 405)
	n	%	n	%
Sexe				
Homme	90	61,2 %	306	75,6 %
Femme	57	38,8 %	99	24,4 %
Âge (années)				
< 45	4	2,7%	62	15,3%
45-54	25	17,0%	107	26,4%
55-64	54	36,7%	129	31,9%
> 65	64	43,5%	107	26,4%
Ταbαc				
Non-fumeurs <sup>a</sup>	60	40,8 %	266	65,7 %
Fumeurs actuels	54	36,7 %	53	13,1 %
Ex-fumeurs <sup>b</sup>	33	22,5 %	86	21,2 %
Type histologique <sup>c</sup>				
Carcinomes épidermoïdes	28	19,0 %		
Adénocarcinomes	91	62,0 %		
Autres types histologiques	28	19,0 %		

**Tableau I.** Principales caractéristiques des cas et des témoins. aNon-fumeurs : personnes ayant consommé moins de 100 cigarettes au cours de leur vie. Exfumeurs : personnes ayant arrêté de fumer depuis au moins deux ans. Les codes morphologie de la CIM-0-3 ont été regroupés de la façon suivante : épidermoïdes : 8050-8078, 8083, 8084 ; adénocarcinomes : 8140, 8211, 8230, 8231, 8250-8260, 8323, 8480-8490, 8550, 8551, 8570-8574, 8576.

socio-démographiques, les consommations de tabac, l'histoire résidentielle complète, l'histoire professionnelle détaillée, avec une description de chaque emploi occupé, ainsi que des questionnaires spécifiques pour certaines tâches ou professions. Les autres informations recueillies concernent les caractéristiques anthropométriques, les facteurs hormonaux chez les femmes, les antécédents de cancers et de maladies diverses, le cancer chez les apparentés au premier degré, les consommations d'alcool, de cannabis et l'alimentation.

Pour chaque sujet, tous les emplois exercés pendant la vie active (profession et branche d'activité) ont été codés, en utilisant, pour la profession, la classification internationale type des professions (CITP) du bureau international du travail (BIT) de 1968, et pour la branche d'activité la nomenclature d'activités française (NAF) de l'Insee (institut national de la statistique et des études économiques) de 2000. Les expositions professionnelles seront évaluées à partir des réponses au questionnaire et/ou de matrices emplois-expositions,

m/s hors série n° 1, vol. 36, octobre 2020

avec la collaboration d'experts locaux en santé au travail (ingénieur de prévention, médecins du travail). Les différentes adresses au cours de la vie sont en cours de géocodage.

Les données sont analysées par les méthodes classiquement utilisées pour les études cas-témoins. Des modèles de régression logistique non conditionnelle sont utilisés pour estimer les *odds-ratios* (OR)<sup>2</sup> ajustés et leurs intervalles de confiance à 95 % (IC 95 %), et pour évaluer les interactions.

### Résultats préliminaires

Au cours de la période d'étude, 237 cas potentiellement éligibles ont été identifiés. Parmi ceux-ci, 13 sont décédés avant d'avoir pu être contactés. Parmi les 224 cas contactés, 55 ont refusé de participer, 169 (75 %) ont été interrogés. Après vérification avec les données des registres, 22 cas ont été exclus a posteriori car ils ne remplissaient pas les critères d'inclusion (notamment, récidives ou date de premier diagnostic hors période). Au total, 147 cas ont été inclus dans l'étude. Sur les 497 témoins éligibles recrutés par l'institut de sondage, 16 n'ont pas pu être contactés, 76 ont refusé de participer et 405 (81 %) ont été interrogés.

Les principales caractéristiques des cas et des témoins sont présentées dans le *Tableau I*.

La proportion de fumeurs est, comme attendu, plus élevée chez les cas de cancers que chez les témoins. La proportion de cas n'ayant jamais fumé est cependant particulièrement élevée, plus de 40 %. Cette proportion élevée de cas non-fumeurs suggère le rôle d'autres facteurs de risque.

L'examen de la répartition des cas en fonction du type histologique met en évidence une forte proportion d'adénocarcinomes, plus élevée qu'en France hexagonale. Cette prédominance des adénocarcinomes est retrouvée dans d'autres régions caribéennes.

Les premières analyses, qui doivent être approfondies, ont déjà permis de mettre en évidence des risques élevés de cancer du poumon dans certaines professions (Figure 1) ou secteurs d'activité (Figure 2). Les résultats suggèrent un rôle d'expositions liées au travail de la canne à sucre, avec des augmentations significatives de risque chez les ouvriers agricoles de la canne à sucre, dans le secteur des cultures industrielles, et, dans une moindre mesure, dans la production de rhum. Des risques élevés de cancer du poumon ont également été observés chez les autres ouvriers agricoles, les

 $<sup>^2</sup>$  L'odds ratio est une mesure statistique exprimant le degré de dépendance entre des variables aléatoires qualitatives.



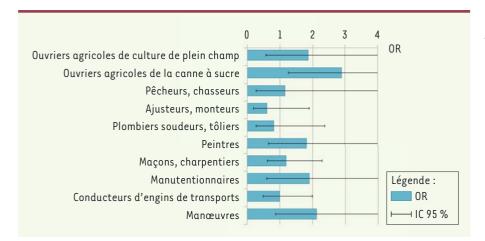


Figure 1. Association entre cancer du poumon et professions. Estimation des odds-ratio (OR) et de leur intervalle de confiance à 95 % (IC 95 %) par régression logistique; ajustés sur âge, sexe, région et consommation de tabac.

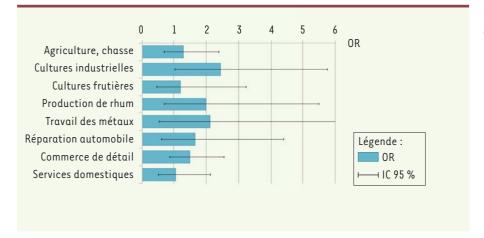


Figure 2. Association entre cancer du poumon et secteurs d'activité. Estimation des odds-ratio (OR) et de leur intervalle de confiance à 95 % (IC 95 %) par régression logistique; ajustés sur âge, sexe, région et consommation de tabac.

manutentionnaires, les manœuvres, les peintres, ainsi que chez les personnes travaillant les métaux et dans la réparation automobile.

### Perspectives et retombées attendues

Il s'agit de la première étude épidémiologique sur les cancers du poumon dans les Caraïbes. L'étude permettra d'évaluer le rôle d'expositions professionnelles qui ne peuvent être étudiées que dans quelques populations, comme les expositions dans la culture de la banane, ainsi que dans la culture et l'industrie de la canne à sucre. L'utilisation importante de pesticides dans ces régions permet également d'être dans une situation favorable pour étudier leur rôle dans la survenue de cancers du poumon, évoqué dans plusieurs études. L'étude des facteurs de risque professionnels va se poursuivre par une analyse en fonction des tâches et des substances, à partir des informations détaillées recueillies dans les questionnaires. Le recueil complet de l'histoire résidentielle permettra d'évaluer l'association entre risque de cancer du poumon et habitat à proximité d'activités potentiellement polluantes, notamment le brûlage de champs de canne à sucre et l'épandage aérien de bananeraies ; la proximité d'autres activités, centrales thermiques au charbon ou décharges par exemple, pourra également

être étudiée. Les autres facteurs de risque connus ou suspectés (tabac, cannabis, alcool, alimentation, antécédents familiaux, antécédents de maladies respiratoires...) seront également étudiés et pris en compte dans l'analyse des facteurs professionnels et environnementaux, et les éventuelles interactions entre ces facteurs seront évaluées.

L'étude permettra d'évaluer au niveau régional l'impact des différents facteurs de risque sur le risque de cancer du poumon, et ainsi de mieux orienter les actions de prévention. En particulier, une estimation du nombre de cas de cancer du poumon attribuables aux expositions professionnelles dans ces régions peut avoir des implications importantes à la fois pour la prévention et la prise en charge médico-administrative de ces cancers au titre des maladies professionnelles. •

Occupational and environmental risk factors for lung cancer in the French West Indies

### LIENS D'INTÉRÊT

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

### RÉFÉRENCES

- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. Int J Cancer 2019; 144: 1941-53.
- 2. IARC. Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2004; 83: 1-1438
- Delva F, Andujar P, Lacourt A, et al. Occupational risk factors for lung cancer. Rev Mal Respir 2016; 33:444-59.
- 4. Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, et al. The carcinogenicity of outdoor air pollution. Lancet Oncol 2013; 14: 1262-3.
- Vieira AR, Abar L, Vingeliene S, et al. Fruits, vegetables and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. Ann Oncol 2016; 27: 81-96.
- 6. Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, et al. Risk factors for lung cancer worldwide. Eur Respir J 2016;
- 7. Santé Publique France. Estimations régionales et départementales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France, 2007-2016. https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/cancers/articles/estimations-regionales-et-departementales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-france-2007-2016
- Auguste A, Dugas J, Menvielle G, et al. Social distribution of tobacco smoking, alcohol drinking and obesity in the French West Indies. BMC Public Health 2019; 19: 1424.
- Cadelis G, Kaddah S, Bhakkan B, et al. Epidemiology and incidence of primary lung cancer in a region with low tobacco consumption: Guadeloupe (French West Indies). Data from the cancer registry 2008-2009. Rev Mal Respir 2013; 30: 537-48.

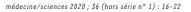
- Hofmann J, Guardado J, Keifer M, et al. Mortality among a cohort of banana plantation workers in Costa Rica. Int J Occup Environ Health 2006; 12: 321-8.
- Amre DK, Infante-Rivard C, Dufresne A, et al. Case-control study of lung cancer among sugar cane farmers in India. Occup Environ Med 1999; 56: 548-52.
- Cristale J, Silva FS, Zocolo GJ, et al. Influence of sugarcane burning on indoor/ outdoor PAH air pollution in Brazil. Environ Pollut 2012; 169: 210-16.
- Bonner MR, Freeman LEB, Hoppin JA, et al. Occupational exposure to pesticides and the incidence of lung cancer in the agricultural health study. Environ Health Perspect 2017; 125: 544-51.
- Alavanja MCR, Dosemeci M, Samanic C, et al. Pesticides and lung cancer risk in the agricultural health study cohort. Am J Epidemiol 2004; 160: 876-85.
- Luce D, Stücker I, ICARE Study Group. Investigation of occupational and environmental causes of respiratory cancers (ICARE): a multicenter, population-based case-control study in France. BMC Public Health 2011; 11:928

### TIRÉS À PART

L. Cabréra



m/s hors série n° 1, vol. 36, octobre 2020





Les hémopathies malignes (HM) se développent à partir des cellules d'origine hématopoïétique et sont classées (1) en hémopathies lymphoïdes (a) aiguës [leucémies aiguës lymphoïdes (LAL)] ou (b) chroniques [lymphomes hodgkiniens (LH) et lymphomes non-hodgkiniens (LNH), leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) et myélomes multiples (MM)], (2) en hémopathies myéloïdes (a) aiguës [leucémies aiguës myéloïdes (LAM)] ou (b) chroniques [syndromes myélodysplasiques (SMD), syndromes myéloprolifératifs (SMP)].

Ces dernières décennies, le nombre de nouveaux cas d'HM n'a cessé de croître dans la plupart des pays industrialisés. En 2018, l'incidence de ces pathologies était estimée à  $45\,000$  nouveaux cas en France. Cinq entités représentaient environ la moitié des nouveaux cas: (1) les MM ( $\approx 5\,400$  nouveaux cas), les LNH de type lymphomes diffus à grandes cellules B (LDGCB) ( $\approx 5\,000$ ), les LLC ( $\approx 4\,700$ ), les SMD ( $\approx 4\,700$ ), et les LAM ( $\approx 3\,400$ ) [1]. L'évolution démographique et l'amélioration des techniques diagnostiques n'expliquent cependant que partiellement l'augmentation de cette incidence. Cependant, l'étiologie de ces HM reste très mal connue comme le rappelait en 2013 l'expertise collective de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) [2].

Certains facteurs de risques sont avérés tels que (1) des infections virales (virus de l'hépatite C, virus d'Epstein-Barr, virus de l'immunodéficience humaine, etc.) et bactériennes (Helicobacter pylori), des déficits immunitaires, ou certaines maladies autoimmunes pour les hémopathies lymphoïdes; (2) les radiations ionisantes, les chimiothérapies et l'exposition au benzène pour les hémopathies myéloïdes. Cependant, d'autres facteurs environnementaux et professionnels sont également suspectés [3].

Cet article propose une synthèse des principales données disponibles étayant les présomptions d'associations entre risques de HM chez l'adulte et expositions professionnelles agricoles et, plus particulièrement, les expositions aux pesticides. Il discute également les perspectives de recherche dans ce domaine.

## Agriculture et hémopathies malignes chez l'adulte

# Quel rôle des expositions professionnelles aux pesticides ?

Amandine Busson<sup>1</sup>, Anne-Claire Gac<sup>2</sup>, Bérengère Gruson<sup>3</sup>, Matthieu Meryet-Figuière<sup>4</sup>, Isabelle Baldi<sup>5</sup>, Séverine Tual<sup>4</sup>, Pierre Lebailly<sup>4</sup>



<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Unité Mixte de Recherche (UMR) 1086 ANTICIPE; Université de Caen Normandie, Esplanade de la Paix, 14000 Caen, France.

<sup>2</sup>Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Caen, Institut d'hématologie de Basse-Normandie, avenue côte de Nacre, 14000 Caen, France.

<sup>3</sup>Centre Hospitalier Universitaire (CHU) d'Amiens-Picardie, Service d'hématologie clinique

et de thérapie cellulaire, 30 avenue de la Croix Jourdain, 80054 Amiens Cedex 4, France.

<sup>4</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Unité Mixte de Recherche (UMR) 1086 ANTICIPE, Université de Caen Normandie, Centre Régional de Lutte contre le Cancer François Baclesse, 3 avenue du Général Harris, 14076 Caen Cedex 05, France.

<sup>5</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Unité (U) 1219 EPICENE, ISPED, Bordeaux Population Health Centre de Recherche, Université de Bordeaux Case 11, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France; Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Bordeaux, Service de Médecine du Travail et Pathologies Professionnelles, Place Amélie Raba-Léon, 33000 Bordeaux, France. a.busson@baclesse.unicancer.fr

gac-ac@chu-caen.fr

Gruson.Berengere@chu-amiens.fr
m.meryet-figuiere@baclesse.unicancer.fr
isabelle.baldi@u-bordeaux.fr
tual-s@baclesse.unicancer.fr
p.lebailly@baclesse.unicancer.fr

### Données épidémiologiques

### Travail en milieu professionnel agricole

Depuis plus de 50 ans, l'hypothèse d'un lien entre expositions agricoles et survenue d'HM existe dans la littérature. Dès 1968, il a été montré

que les agriculteurs californiens et les personnes habitant en zone rurale en Norvège présentaient de plus forts taux de mortalité pour certaines HM [4]. En 1992, une première méta-analyse généraliste montrait des élévations de risques de 5 % [IC95 % = 0,98-1,12] de LNH, de 12 % [IC95 % = 1,04-1,21] de MM, de 16 % [IC95 % = 1,03-1,29] de LH, et de 7 % [IC95 % = 1,03-1,11] de leucémies, en s'appuyant sur respectivement 14, 12, 12, et 23 études [5].

L'expertise collective « Pesticides et Santé » menée par l'Inserm [2] a identifié 9 méta-analyses sur les HM (LNH, MM, LH et leucémies) en milieu agricole, publiées entre 1995 et 2008. Celles-ci incluaient chacune de 6 à 50 études et montraient des élévations de risques en population agricole variant de 3 % [IC95 % = 0,96-1,12] à 39 % [IC95 % = 1,18-1,65] pour les LNH et/ou MM, de 9 % [IC95% = 0.96-1.24] à 25% [IC95% = 1.11-1.42] pour les LH, et de 9 % [IC95 % = 1,00-1,19] à 10 % [IC95 % = 1,02-1,18] pour les leucémies, plus spécifiquement de 10 % [IC95 % = 0,97-1,26] pour les leucémies myéloïdes chroniques (LMC) et de 6 % [IC95 % = 0,97-1,16] pour les LAM. Par ailleurs, cette même expertise a rapporté les résultats de différentes grandes études prospectives, dont l'agricultural health study (AHS) (Tableau I), qui indiquaient que la population agricole était plus à risque de développer des HM. Parmi elles, le projet NOCCA (Tableau I) a montré une augmentation du risque de LNH chez les agriculteurs ( $SIR_{CII} = 1,09$ [IC95 % = 1,04-1,14];  $SIR_{MM} = 1,07$  [IC95 % = 1,03-1,11]) et chez les agricultrices ( $SIR_{MM} = 1,14 [IC95 \% = 1,05-1,24]$ ) sur près de 15 millions d'individus étudiés résidant en Scandinavie [6].

Plus récemment (*Tableau I*), des efforts internationaux ont permis de créer plusieurs consortiums et grandes études portant sur la survenue des HM (INTERLYMPH, EPILYMPH, IMMC) dans la population générale mais aussi plus spécifiquement chez les agriculteurs (AGRICOH). Après uniformisation des classifications des emplois et des LNH, INTERLYMPH a montré également un excès de risque de LNH associé à l'emploi agricole, en particulier au travail sur cultures (OR = 1,10 [IC95 % = 0,97-1,24]) lorsque la durée de l'emploi dépassait 10 ans (OR = 1,18 [IC95 % = 1,00-1,41]) [7].

Des questions demeurent sur les nuisances pouvant entraîner des risques de HM en milieu agricole (poussières, mycotoxines, gaz d'échappement, virus animaux...) et, même pour les pesticides, la nuisance la plus étudiée à ce jour, de nombreuses interrogations persistent. Leur étude est particulièrement difficile du fait de leur multiplicité, plus de 1 000 substances pesticides ayant pu être utilisées par les agriculteurs au cours de ces dernières décennies et plus de 300 étant encore sur le marché en France. De plus, peu d'études ont identifié les secteurs de production agricole associés à des augmentations de risque et la définition de l'exposition aux pesticides a souvent été limitée à celle de l'application de pesticides sur cultures. Récemment, la cohorte française AGRICAN (Tableau I) a montré une augmentation du risque de MM chez les agriculteurs ayant commencé à utiliser des pesticides sur cultures dans les années 1960, particulièrement les cultures de maïs (HR≥20 ans : 1,73 [IC95 % = 1,08-2,78]) et chez les utilisateurs d'insecticides sur animaux (HR = 1,48 [IC95% = 1,11-1,98])[8].

### Expositions professionnelles agricoles aux pesticides

En analysant la littérature épidémiologique disponible et les hypothèses mécanistiques, l'expertise collective de l'Inserm concluait à une présomption forte d'un lien avec l'exposition aux pesticides pour les MM et LNH et à une présomption moyenne pour les leucémies [2]. Depuis cette expertise, une nouvelle méta-analyse a synthétisé les recherches menées durant les trois dernières décennies sur le rôle des expositions professionnelles aux pesticides (familles chimiques et/ou molécules) sur la survenue de LNH. À partir des résultats de 44 publications, les auteurs n'ont pu documenter des élévations de risques de LNH en lien qu'avec l'utilisation de (1) trois familles d'insecticides sur les cinq considérées : carbamates, organophosphorés, organochlorés et (2) quatre familles d'herbicides sur les huit considérées : les phénoxy-herbicides, les carbamates/thiocarbamates, les herbicides à base de glyphosate et les triazines [14]. La cohorte AHS est aujourd'hui une des rares études permettant l'analyse des effets des expositions professionnelles à des pesticides spécifiques. Elle étudie plus particulièrement le rôle de 49 molécules, essentiellement des insecticides (principalement des organophosphorés) et des herbicides. Par exemple, cette étude montre que l'exposition à l'insecticide lindane (un organochloré) était associée à un risque augmenté de LNH et plus particulièrement de lymphome folliculaire, et que l'exposition aux insecticides DDT (un organochloré) ou terbufos (un organophosphoré) augmentait le risque de LNH, notamment le risque de lymphomes à petites cellules, de LLC, et de lymphomes de la zone marginale. Parallèlement, et alors qu'aucune association n'a été détectée entre l'exposition aux insecticides diazinon (un organophosphoré) ou perméthrine (un pyréthrinoïde) et les LNH globalement, le diazinon a été associé à la survenue de lymphomes folliculaires et la perméthrine à la survenue de MM [10]. L'étude NAPP (North American Pooled Project) (Tableau I) a montré des augmentations significatives du risque de MM chez les hommes utilisateurs de l'insecticide carbamate carbaryl (OR = 2,02 [IC95 % = 1,28-3,21]), du fongicide captane (OR = 1,98 [IC95 % = 1,04-3,77]) ou de l'insecticide organochloré DDT (OR = 1,44 [IC95 % = 1,05-1,97])[11].

À partir des différents consortiums évoqués plus haut, quelques résultats entre HM et pesticides spécifiques ont pu être récemment produits. Un risque augmenté de survenue de LLC a ainsi été observé chez les professionnels exposés aux pesticides inorganiques (OR = 1,6 [IC95 % = 1,0-2,5]) et organiques (OR = 1,5 [IC95 % = 1,0-2,1]) dans l'étude européenne EPILYMPH (Tableau I). Le risque de LLC était d'ailleurs le plus élevé

m/s hors série n° 1, vol. 36, octobre 2020 17

Nom (référence)	Année d'in- clusion ou de construction	Design de l'étude	<b>Objectif</b>	Aire géographique	Population (effectifs et descriptif) ou nombre d'études incluses	Site internet
AGRIculture et CANcer (AGRICAN) [8]	2005-2007	Cohorte prospective	Évaluer le risque de cancer lié aux expositions profession- nelles en secteur agricole par types de cancer	11 départements français couverts par des registres de cancer en population au moment de l'inclusion : Côte d'Or, Doubs, Gironde, Isère, Loire-Atlantique, Manche, Bas-Rhin, Haut-Rhin, Somme,	181842 individus adultes, actifs et retraités, affiliés à la Mutualité Sociale Agricole, l'assurance maladie du régime agricole français, pendant au moins 3 ans	www.agrican.fr
AGRIcultural COHort Study (AGRICOH) [13]	2010	Consortium d'études de cohortes	Soutenir et maintenir la colla- boration et le partage/la mise en commun des données pour rechercher l'association entre des expositions agricoles et différentes maladies	12 pays - 5 continents Afrique du Sud, Australie, Canada, Chili, Costa Rica, Danemark, France, Norvège, Nouvelle-Zélande, République de Corée, Royaume-Uni, États-Unis	29 cohortes De quelques centaines à plu- sieurs centaines de milliers d'agriculteurs	https://agricoh. iarc.fr/
Agricultural Health Study (AHS) [10]	1993-1997	Cohorte prospective	Évaluer la santé des agricul- teurs américains et de leurs conjoints	2 États américains : Caroline du Nord et Iowa	52 394 agriculteurs applicateurs de pesticides, 32 345 de leurs conjoints et 4 916 applicateurs de pesticides commerciaux d'Iowa	https://aghealth. nih.gov/
EPIdemiology of LYM- PHoid neoplasms (EPI- LYMPH) [12]	1998-2004	Étude cas-témoin multi- centrique	Tester des hypothèses spéci- fiques sur l'effet des change- ments dans notre environne- ment physique, professionnel et humain sur l'incidence des HM	Allemagne, Espagne, Finlande, France, Irlande, Italie, Répu- blique Tchèque	Entre 1998-2003, 2348 cas de lymphomes incidents et 2462 contrôles ont été recrutés pour l'étude EPILYMPH dans six pays européens	
The International Mul- tiple Myeloma Consor- tium (IMMC) [9]	2007	Consortium d'études cas- témoins	IMMC a été mis en place pour entreprendre des projets de recherche pour mieux comprendre les facteurs de risque du myélome multiple (MM), de gammapathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) et les conditions connexes	Collaboration internationale (Canada, Europe dont Epi- lymph)	11 études cas-témoins	https://www. lymphomacoa- lition.org/121- uncategorised/569- latest-research- from-immc

Nom (référence)	Année d'in- clusion ou de construction	Design de l'étude	<b>Objectif</b>	Aire géographique	Population (effectifs et descriptif) ou nombre d'études incluses	Site internet
International Lymphoma Epidemiology Consortium (INTERLYMPH) [7]	2001	Consortium d'études cas- témoins	Étendre les connaissances sur l'étiologie et la survie des lymphomes	Amérique du Nord (Canada et États-Unis), Europe et Australie	20 études cas-témoins	https://epi.grants. cancer.gov/inter- lymph/
North American Pooled Project (NAPP) [11]	2013	Analyse poolée d'études cas-témoins	Evaluer les associations entre les expositions agricoles et les risques de lymphomes non hodgkiniens, de lymphomes hodgkiniens, de myélomes multiples et de sarcome des tissus mous chez les hommes canadiens et américains.	Continent nord-américain: Canada (Alberta, Colom- bie britannique, Manitoba, Québec, Ontario et Sas- katchewan) et États-Unis (lowa, Kansas, Minnesota, et	4 études cas-témoins	https://www.occu- pationalcancer. ca/2013/north- american-pooled- project/
Nordic Occupational Cancer (NOCCA) [6]	Non applicable	Croisement de données de recensements de population et de mala- dies	Présenter les données d'incidence par catégorie professionnelle pour les populations nordiques.	5 pays scandinaves : Danemark, Suède, Norvège, Finlande et Islande	L'étude couvre les 15 millions de personnes âgées de 30 à 64 ans lors des recensements de 1960, 1970, 1980/1981 et / ou 1990 et les 2,8 millions de cas de cancer incidents diagnostiqués et reportés les registres nationaux de cancers	https://astra.can- cer.fi/NOCCA/

Tableau I. Présentation des grandes études épidémiologiques analysant les associations entre survenue de cancers, notamment ou exclusivement les HM, et expositions agricoles.

m/s hors série n° 1, vol. 36, octobre 2020

chez ceux exposés aux insecticides organophosphorés (OR = 2,7 [IC 95 % = 1,2-6,0]) [12]. Parallèlement, à partir des données du consortium AGRICOH (*Tableau I*), et parmi 14 familles chimiques de pesticides sélectionnées et 33 molécules individuelles, l'insecticide terbufos (un organophosphoré) a été associé au risque de LNH (RR = 1,18 [IC95 % = 1,00-1,39]), l'insecticide deltaméthrine (un pyréthrinoïde) au risque de LLC (RR = 1,48 [IC95 % = 1,06-2,07]) et l'herbicide glyphosate au risque de lymphome diffus à grandes cellules B (LDGCB) (RR = 1,36 [IC95 % = 1,00-1,85]) [13].

## Exposition aux pesticides et hémopathies malignes : approche biologique

Bien que les études épidémiologiques montrent une association entre HM et pesticides, les approches mécanistiques de biologie cellulaire et moléculaire sont à ce jour peu développées. Le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a évalué la cancérogénicité d'environ 70 pesticides, parmi les plus de 1 000 commercialisés ces dernières décennies. Bien que le niveau de preuve reste insuffisamment documenté pour de nombreuses molécules, essentiellement par manque de données épidémiologiques, cinq pesticides aux modes d'actions différents ont été associés à la survenue spécifique de lymphomes et de leucémies: d'une part, le lindane, classé comme cancérogène avéré (groupe 1) et, d'autre part, le DDT, le diazinon, le malathion et le glyphosate, classés comme cancérogènes probables pour l'Homme (groupe 2A) (Figure 1).

Dix grands mécanismes de cancérogenèse ont été proposés [15]. Parmi ces mécanismes, même si tous peuvent être envisagés, deux pourraient être plus particulièrement impliqués dans les mécanismes de cancérogenèse conduisant à des HM liés aux pesticides : il s'agit d'une part de mécanismes génotoxiques et, d'autre part, de mécanismes immunitaires (Figure 2). Les mécanismes génotoxiques ont été étudiés en utilisant différentes approches biologiques chez des agriculteurs. De nombreuses études ont documenté une prévalence plus forte d'anomalies cytogénétiques chez les agriculteurs exposés aux pesticides. Par ailleurs, une analyse des bandes G des chromosomes des lymphocytes a montré une augmentation de la fréquence des réarrangements chez des agriculteurs exposés aux pesticides, au niveau de la bande 14q32 notamment et de la bande 18g21, seulement chez les agriculteurs [16]. Ces deux régions sont à l'origine de la translocation t(14;18), l'anomalie la plus largement observée dans les lymphomes folliculaires. Cette translocation met le gène codant la molécule anti-apoptotique Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) sous le contrôle du promoteur du gène codant la chaine lourde des immunoglobulines, entraînant la surexpression de Bcl-2 et empêchant ainsi la mort programmée des cellules par apoptose. La prévalence de la t(14 ;18) est augmentée chez les agriculteurs exposés aux pesticides comme cela a été montré en étudiant dans cette population l'évolution clonale des cellules porteuses de cette translocation, précurseurs des cellules des lymphomes folliculaires [17]. Par ailleurs, la prévalence des gammapathies monoclonales de signification indéterminée est deux fois supérieure chez des agriculteurs par rapport à celle de la

population générale [18]. Concernant les hémopathies myéloïdes, une augmentation de la fréquence des anomalies cytogénétiques défavorables a été retrouvée dans les blastes de LAM et de syndromes myélodysplasiques (SMD) des patients exposés aux pesticides [19]. Une hypothèse proposée est que les cellules souches hématopoïétiques exposées à certains pesticides pourraient acquérir prématurément des mutations dans les gènes associés à des pathologies myéloïdes, notamment des gènes impliqués dans des mécanismes d'épigénétique tels DNMT3A, TET2, ASXL1, mais également dans des gènes codant des protéines impliquées dans la signalisation de récepteurs de cytokines comme la tyrosine kinase JAK2. Cette hématopoïèse clonale de signification indéterminée, appelée CHIP (clonal hematopoiesis of indeterminate potential), survient avec une fréquence accrue avec l'âge et témoigne d'une instabilité génomique par déséquilibre entre stress génotoxique et capacité à détecter et réparer les cassures d'ADN ou les erreurs de réplication. La dérégulation du système immunitaire est un autre grand mécanisme de cancérogenèse particulièrement important à explorer dans les HM dont on sait qu'elles sont favorisées par les déficits immunitaires. Il a notamment été montré que les pesticides entrainaient une dérégulation du système immunitaire avec, par exemple, une baisse du taux des immunoglobulines G (IgG) chez des agriculteurs présentant des fortes concentrations sanguines de p,p'-DDE [20]. Des analyses quantitatives et fonctionnelles du système immunitaire humoral et cellulaire d'agriculteurs pour lesquels les expositions aux pesticides seraient très bien documentées pourraient aider à mieux appréhender ce mécanisme de cancérogenèse.

### Discussion

Peu d'études épidémiologiques ont analysé les risques associés au travail en milieu agricole pour les différentes HM et plus particulièrement par sous-types de LNH ou leucémies, souvent en raison d'effectifs limités. La littérature documentant les risques inhérents aux divers secteurs agricoles (cultures, élevages) et aux tâches associées incluant l'ensemble des types et circonstances d'exposition directe aux pesticides (application sur cultures, animaux, en traitement de semences...) ou indirecte (contact avec les végétaux traités, matériel de traitement...) reste globalement pauvre tant en approches épidémiologique que biologique. De même, les études épidémiologiques ou biologiques en capacité d'analyser le rôle de

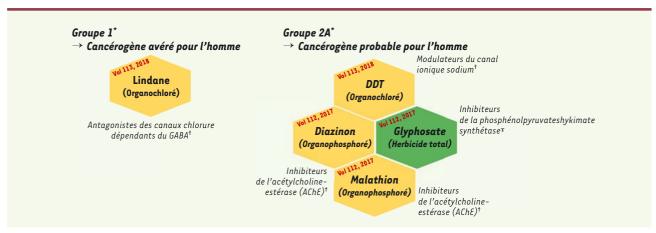
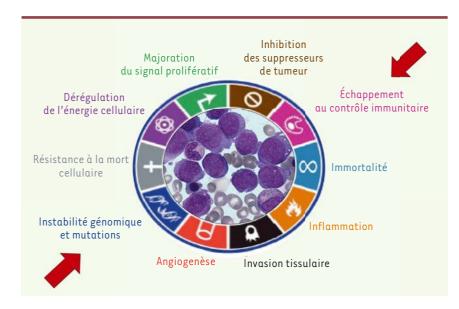


Figure 1. Pesticides associés à la survenue d'hémopathies malignes d'après le centre International de recherche sur le cancer (CIRC). Seuls les volumes des monographies référant aux évaluations les plus récentes des molécules pesticides sont ici mentionnés. DDT: DichloroDiphénylTrichloroéthane. \*Agents classés par les monographies du CIRC, volumes 1-125 - Monographies du CIRC sur l'identification des dangers cancérogènes pour l'homme. Accès 1er juin 2020. https://monographs.iarc.fr/fr/agents-classes-par-les-monographies-du-circ-2/; †Insecticide Resistance Action Committee. New IRAC MoA Classification Booklet and Poster now available, January 6, 2015. https://irac-online.org/updated-irac-moa-classification-booklet-and-poster-now-available/; \*Herbicide Resistance Action Committee. HRAC Mode of Action Classification 2020 Map. Accès 1er juin 2020. https://hracglobal.com/tools/hrac-mode-of-action-classification-2020-map.



pesticides spécifiques sont rares comme le montre la méta-analyse la plus récente [14]. Ce constat est dû en partie au moins aux effectifs faibles de cas exposés dans la plupart des études même si des efforts importants émergent ces dernières années au travers de grandes cohortes comme celles intégrées dans AGRICOH [13] ou du consortium d'études cas-témoins Interlymph (Tableau I). D'autre part, l'exposition professionnelle à des mélanges de pesticides au cours d'une saison de traitements et plus encore au niveau de l'ensemble d'une vie professionnelle renvoie au concept d'exposome et rend particulièrement ardu la capacité à imputer un effet particulier à une molécule spécifique. Enfin, même si les mesures de l'imprégnation biologique apportent parfois des informations utiles, elles

Figure 2. Principaux mécanismes potentiels de cancérogenèse (adaptée de [15]).

ne reflètent le plus souvent que des expositions récentes, non pertinentes pour expliquer la survenue de maladies chroniques dont la survenue présente une latence de plusieurs années ou décennies.

### Conclusion

Émergent ici diverses pistes de recherche qui permettraient d'améliorer nos connaissances des liens entre les expositions agricoles et la survenue d'une HM. D'une part, l'exploration de

plus en plus précise des effets inhérents de l'utilisation de pesticides dans divers secteurs agricoles (où tâches, activités et intensité d'exposition seront prises en compte), permettrait de mieux appréhender les risques de HM en milieu agricole. D'autre part, l'approche biologique des différents mécanismes de génotoxicité, avec notamment la recherche de mutations de gènes préexistantes aux hémopathies mais également l'analyse du système immunitaire en fonction de gradients d'exposition à certaines molécules, permettraient de mieux comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents. Les autres mécanismes

m/s hors série n° 1, vol. 36, octobre 2020 **21** 

de cancérogenèse restant des pistes possibles de compréhension à explorer.

Chacune des avancées de la recherche sur ce sujet doit aider à renforcer notre compréhension de la maladie cancéreuse de manière générale et être utile aux patients, en permettant des progrès dans la prévention primaire du cancer. Depuis 2019, des mesures de prévention tertiaires sont proposées aux personnes malades, au travers de la reconnaissance en maladie professionnelle des patients atteints de lymphomes malins non hodgkiniens ayant été exposés aux pesticides dans leur métier (tableau RA59¹). D'autres actions de prévention pourraient découler d'évaluations post-homologation des pesticides mis sur le marché, dans le cadre de la phyto-pharmacovigilance. Agriculture and haematological malignancies in adults: what role for occupational pesticide exposure?

### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la Ligue contre le Cancer (ligue nationale et comités de la Manche, de Charente-Maritime et du Doubs) pour le financement du doctorat d'A. Busson.

### LIENS D'INTÉRÊT

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

### RÉFÉRENCES

- Le Guyader-Peyrou S, Defossez G, Dantony E, et al. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 2 - Hémopathies malignes. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Saint-Maurice (France) : Santé publique France, 2019.
- 2. Inserm (dir.). Pesticides : effets sur la santé. Expertise collective. Paris : Inserm, 2013.
- Batista JL, Birmann BM, Epstein MM. Epidemiology of hematologic malignancies. In: Loda M, Mucci LA, Mittelstadt ML, et al., eds. Pathology and epidemiology of cancer. Cham: Springer International Publishing, 2017: 543-69.
- 4. Fasal E, Jackson EW, Klauber MR. Leukemia and lymphoma mortality and farm residence. *Am J Epidemiol* 1968; 87: 267–74.
- Blair A, Zahm SH, Pearce NE, et al. Clues to cancer etiology from studies of farmers. Scand J Work Environ Health 1992; 18: 209-15.
- 6. Pukkala E, Martinsen JI, Lynge E, et al. Occupation and cancer follow-up of 15 million people in five Nordic countries. Acta Oncol 2009; 48: 646-790.

- 7. Mannetje A, De Roos AJ, Boffetta P, et al. Occupation and risk of non-Hodgkin lymphoma and its subtypes: a pooled analysis from the InterLymph consortium. Environ Health Perspect 2016; 124: 396-405.
- Tual S, Busson A, Boulanger M, et al. Occupational exposure to pesticides and multiple myeloma in the AGRICAN cohort. Cancer Causes Control CCC 2019; 30: 1243-50.
- Schinasi LH, Brown EE, Camp NJ, et al. Multiple myeloma and family history of lymphohaematopoietic cancers: results from the International Multiple Myeloma consortium. Br J Haematol 2016; 175: 87-101.
- Alavanja MCR, Hofmann JN, Lynch CF, et al. Non-Hodgkin Lymphoma Risk and insecticide, fungicide and fumigant use in the agricultural health study. PLoS One 2014: 9.
- 11. Presutti R, Harris SA, Kachuri L, et al. Pesticide exposures and the risk of multiple myeloma in men: an analysis of the North American Pooled Project: pesticide exposures and the risk of multiple myeloma. Int J Cancer 2016; 139: 1703-14.
- 12. Cocco P, Satta G, Dubois S, et al. Lymphoma risk and occupational exposure to pesticides: results of the Epilymph study. Occup Environ Med 2013; 70: 91-8.
- 13. Leon ME, Schinasi LH, Lebailly P, et al. Pesticide use and risk of non-Hodgkin lymphoid malignancies in agricultural cohorts from France, Norway and the USA: a pooled analysis from the AGRICOH consortium. Int J Epidemiol 2019; 48: 1519-35.
- 14. Schinasi L, Leon ME. Non-Hodgkin lymphoma and occupational exposure to agricultural pesticide chemical groups and active ingredients: a systematic review and meta-analysis. Int J Environ Res Public Health 2014; 11: 4449-527.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011; 144: 646-74.
- Garry VF, Kelly JT, Sprafka JM, et al. Survey of health and use characterization of pesticide appliers in Minnesota. Arch Environ Health Int J 1994; 49: 337-43.
- Agopian J, Navarro JM, Gac AC, et al. Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis. J Exp Med 2009; 206: 1473–83.
- 18. Lecluse Y, Comby ξ, Mariotte D, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) among farmers involved in open field farming and/or cattle breading in France. Leuk Lymphoma 2016; 57: 1727-30.
- Fagioli F, Cuneo A, Piva N, et al. Distinct cytogenetic and clinicopathologic features in acute myeloid leukemia after occupational exposure to pesticides and organic solvents. Cancer 1992; 70: 77-85.
- Cooper Glinda S, Martin Stephen A, Longnecker Matthew P, et al.
   Associations between plasma DDE levels and immunologic measures in African-American farmers in North Carolina. Environ Health Perspect 2004; 112:1080-4.

 $^1$  « Tableau des maladies professionnelles RA59 « Hémopathies malignes provoquées par les pesticides » – INRS. » Accès 3 juin 2020. http://www.inrs.fr/publications/bdd/mp/tableau.html?reflNRS=RA%2059

TIRÉS À PART

A. Busson





## L'intestin moyen de drosophile comme modèle d'étude

L'intestin est un organe vital qui, en plus de remplir les fonctions de digestion et d'absorption des nutriments, constitue la principale barrière face aux agresseurs ingérés avec la nourriture. Ceux-ci peuvent être de différente nature, comme par exemple des agents biologiques pathogènes (virus, bactéries, toxines) ou des produits chimiques (médicaments, pesticides, polluants). Il est crucial pour l'organisme que cet organe, malgré son activité quotidienne intense et les attaques qu'il subit, demeure intègre. L'intestin a ainsi développé une capacité phénoménale de renouvellement, qui est de guelques jours chez les mammifères et de deux semaines environ chez les insectes. Il est pourvu pour cela de cellules souches intestinales (intestinal stem cells ou ISC) qui sont par définition indifférenciées et qui résident au sein même du tissu. Ces ISC adaptent leur prolifération et leur différenciation afin de renouveler les cellules endommagées ou mortes de l'intestin, tout en limitant le risque de développer des cancers. De par ses similitudes structurelles et fonctionnelles avec celui des vertébrés, l'intestin de drosophile sert de modèle pour l'étude des processus d'homéostasie (équilibre cellulaire et physiologique en condition normale) et de régénération [1]. Son extrémité antérieure est l'équivalent de l'æsophage des mammifères, l'intestin moyen correspond à l'intestin grêle et la partie postérieure au colon (Figure 1A). L'intestin moyen/grêle fait l'objet de nombreuses études du fait de son rôle crucial dans l'absorption des nutriments et la réponse immune. Il est colonisé par un ensemble de bactéries composant le microbiote intestinal, avec lequel il entretient une relation mutualistique où chacune des deux parties en tire des bénéfices. Malgré des similitudes morphologiques et fonctionnelles, quelques différences subsistent entre l'intestin moyen de la drosophile et l'intestin grêle des mammifères. Alors que l'épithélium de l'intestin grêle s'organise en cryptes et en villosités, l'épithélium intestinal de drosophile est plat (Figure 1A). Ce dernier ne produit pas de mucus,

## Impact des bioinsecticides à base de Bacillus thuringiensis sur le développement de cancers de l'intestin

Aurélia Joly, Julie Soltys, Armel Gallet, Raphaël Rousset



Équipe « Bioinsecticides, Environnement et Santé », Université Côte d'Azur, CNRS, INRAE, ISA, France. aurelia.joly@etu.univ-cotedazur.fr julie.soltys@inrae.fr armel.gallet@univ-cotedazur.fr raphael.rousset@univcotedazur.fr

mais, comme chez tous les insectes, possède à la place une membrane péritrophique. Les ISC se divisent en fonction des besoins de façon symétrique, pour générer deux ISC ou deux précurseurs, ou asymétrique pour donner une ISC et un précurseur. Il existe deux types de lignées de cellules différenciées issues de la division des ISC : la lignée des entérocytes (EC) et celle des cellules sécrétrices (Figure 1B). Alors que les EC sont responsables principalement de la production des enzymes digestives et l'absorption des nutriments, les cellules sécrétrices se distinguent par différentes fonctions chez les mammifères : la sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth, la sécrétion de mucus par les cellules goblet, la sécrétion d'interleukines par les cellules tuft et la sécrétion d'hormones par les cellules entéroendocrines (EEC). Chez la drosophile, les cellules de Paneth, goblet et tuft sont absentes et leurs fonctions sont en grande partie assurées par les EC et EEC. Cependant, certaines fonctions précises sont assurées par d'autres cellules. Ainsi, les cellules du proventricule, situées à l'extrémité antérieure de l'intestin moyen, sécrètent des molécules (mucines) de la membrane péritrophique qui sont similaires à celles du mucus sécrétées par les cellules goblet chez les mammifères.

Plusieurs voies de signalisation conservées (Wnt/Wg, Wingless integration/Wingless; BMP, Bone Morphogenetic Pathway; TNF-α, Tumor Necrosis Factor alpha; JNK, c-Jun N-terminal Kinase; JAK/STAT, Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription; Notch; EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor; Hippo/Yorkie) régulent l'homéostasie et la régénération de l'épithélium intestinal en contrôlant la prolifération, la différenciation, l'inflammation et la mort cellulaire [1]. La dérégulation de ces voies est très souvent impliquée dans le développement de pathologies inflammatoires et tumorales (Figure 2).

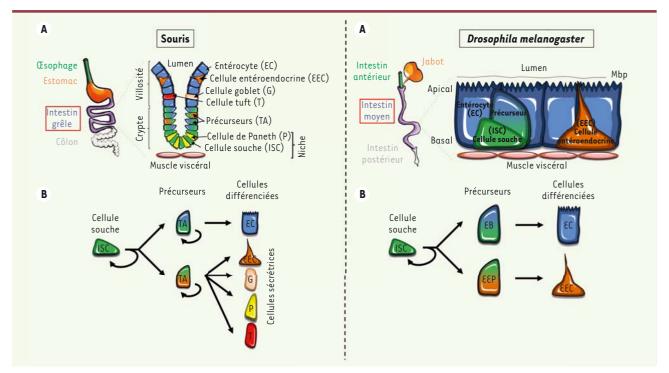


Figure 1. Organisation tissulaire et cellulaire (A) et lignage issu des cellules souches (B) de l'intestin grêle de souris (à gauche) et de l'intestin moyen de drosophile (à droite). A. L'intestin grêle chez la souris est organisé en une succession de cryptes et villosités. Les ISC sont localisées à la base des cryptes, qui fournit tous les signaux nécessaires au bon fonctionnement des cellules souches (niche). Les cellules différenciées issues de la division des ISC migrent au sommet des villosités, à l'exception des cellules de Paneth qui restent dans la crypte. Chez la drosophile, l'intestin moyen est plat. Les ISC restent cependant localisées au niveau basal. B. La division asymétrique des ISC permet un renouvellement de la cellule souche pour maintenir un pool constant (flèche de retour), et la génération d'un précurseur, soit de la lignée entérocyte, soit de la lignée entéroendocrine. Les précurseurs TA de mammifères possèdent également des capacités prolifératives (flèches de retour). Voir le texte principal pour les détails. ISC: Intestinal Stem Cell; TA: Transit-Amplifying cells; EC: entérocyte; EEC: cellule entéroendocrine; G: cellule goblet; P: cellule de Paneth; T: cellule tuft; EB: entéroblaste; EEP: précurseur EEC; mbp: membrane péritrophique.

L'activation de la voie du TNF-lpha est ainsi un facteur important dans l'apparition des maladies inflammatoires de l'intestin (colite ulcéreuse, maladie de Crohn) [2]. Des mutations du gène APC (Adenomatous Polyposis Coli) dans la voie Wnt/Wg, de Ras dans la voie de l'EGFR et de p53 sont les plus fréquentes et mènent au développement de tumeurs de l'intestin, notamment la polypose adénomateuse familiale (qui précède le développement tumoral dans la quasi-totalité des cas) et le cancer colorectal [3]. Il a été montré à la fois chez la souris et la drosophile que les cellules qui sont à l'origine de cette tumorigenèse sont les ISC [4,5]. L'inflammation est un élément clé au développement de cancers, permettant sa progression de la dysplasie à la tumorigenèse (Figure 2). Il s'avère donc important de contrôler les mécanismes inflammatoires afin qu'ils ne deviennent pas chroniques. Lors d'infections, la présence dans l'intestin de bactéries allochtones (provenant de l'extérieur et n'appartenant pas au microbiote intestinal) est rapidement détectée, ce qui conduit à la mise en place d'une réaction immunitaire inflammatoire transitoire qui est bénéfique afin de se débarrasser de l'agresseur (Figure 2). Il est désormais bien établi que cette inflammation augmente le risque de cancers, comme en témoigne la bactérie Helicobacter pylori dans le cadre de cancers gastriques [6]. Une étude a par ailleurs montré que l'infection par la bactérie opportuniste *Pseudomonas* aeruginosa (retrouvée chez l'homme) de drosophiles possédant une forme latente de l'oncogène Ras induisait une dysplasie de l'intestin, révélant une synergie entre infection bactérienne et prédisposition génétique [7]. Chez la drosophile, la dysplasie est un dysfonctionnement provoqué par une augmentation de l'activité de la voie JNK, se caractérisant par une hyper-prolifération des ISC et leur mauvaise différenciation [8]. Le développement de dysplasies de l'intestin devient fréquent avec l'âge. En effet, lors du vieillissement, apparait une perte de diversité du microbiote, notamment de bactéries bénéfigues, ce qui provoque un déséquilibre (dysbiose) en faveur de bactéries pro-inflammatoires. Cette dysbiose entraine une activation chronique de plusieurs voies de signalisation inflammatoires, notamment les voies NF-κB (nuclear factor-kappa B) et JNK [9]. Ainsi, bactéries, inflammation, dysplasie et cancer sont étroitement liés, mettant en lumière l'importance de l'équilibre cellulaire et physiologique des cellules intestinales.

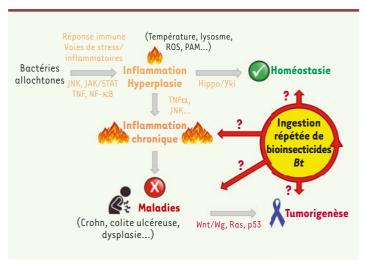


Figure 2. Réponse intestinale à des infections bactériennes. L'intestin met en place une réaction inflammatoire transitoire afin de combattre les bactéries allochtones. Dans certains cas, une inflammation chronique se développe, qui débouche sur des maladies intestinales (maladie de Crohn, colite ulcéreuse, dysplasie, etc.), voire des cancers. Notre projet est d'évaluer si l'ingestion chronique de bioinsecticides à base de la bactérie Bacillus thuringiensis (Bt) pourrait déclencher ou renforcer cette voie pathologique. Voir le texte principal pour les détails. ROS: espèces réactives d'oxygène; PAM: peptides antimicrobiens.

### Les bioinsecticides à base de Bacillus thuringiensis

Face aux incitations à réduire l'utilisation des pesticides chimiques (tel que le plan EcoPhyto II en France<sup>1</sup>), celle des bioinsecticides ne cesse de croître en compensation pour lutter contre les nuisibles. Parmi eux, ceux à base de spores de la bactérie allochtone Bacillus thuringiensis (Bt) représentent le second insecticide le plus vendu (75% des bioinsecticides et 4% du marché global des insecticides en 2018, représentant plus de 32 000 tonnes/an). Ces produits permettent de lutter notamment contre les larves de la famille des lépidoptères (chenilles de papillons) qui attaquent les cultures maraîchères (choux, tomates, maïs etc.). Bt est une bactérie Gram-positive sporulante appartenant au groupe B. cereus, Bt et B. cereus étant très proches génétiquement. À l'instar de B. cereus, Bt possède les mêmes gènes codant les entérotoxines responsables des syndromes diarrhéiques [10]. Bt se distingue de B. cereus par son pouvoir entomopathogène dû à la présence dans la spore, forme résistante qu'adopte la bactérie en condition défavorable, d'un corps d'inclusion cristallin contenant des toxines appelées Cry. La cible des bioinsecticides Bt, composés de la bactérie sous forme de spores et des cristaux Cry, est le tube intestinal des ravageurs. Après ingestion, les cristaux sont solubilisés, libérant les toxines Cry dans l'intestin. Une fois activées par des enzymes protéolytiques digestives, elles se lient à des récepteurs de types cadhérines, amino-peptidases, phosphatases alcalines et transporteurs à « ATP Binding Cassette » (également appelés « transporteurs ABC »). Ces interactions spécifiques entrainent L'accroissement actuel de l'utilisation des bioinsecticides augmente la présence des spores de Bt dans l'environnement et dans l'alimentation. Bien que des études aient montré l'innocuité de Bt pour des organismes non-cibles (insectes non-sensibles et vertébrés) sur une courte période (toxicité aiguë) [11], les effets indésirables potentiels d'une exposition à long terme (toxicité chronique) ne sont pas connus. Le groupe B. cereus est responsable de nombreuses intoxications alimentaires, qui sont largement attribuées à B. cereus lui-même. Cependant, l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses ; Saisine n° 2013-SA-0039) et l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA; EFSA-Q-2015-00254) soulignent le manque d'études sur les effets à long terme de Bt et sur la probable sous-estimation de l'implication de Bt dans des toxi-infections alimentaires. Une étude récente vient de montrer que plusieurs souches Bt provenant de biopesticides commerciaux ont été retrouvées dans des aliments associés à des intoxications humaines [10]. Deux études de cohortes de grande envergure (623 080 femmes au Royaume-Uni, et 68 946 femmes/hommes en France) se sont attachées à estimer l'impact de la nourriture issue de l'agriculture biologique (« bio ») sur la santé humaine [12, 13]. Les deux études ont trouvé une baisse de l'incidence des lymphomes non-hodgkiniens, pour lesquels les pesticides sont un facteur à risque. L'étude d'outre-Manche a montré de plus une augmentation de l'incidence du cancer du sein (post-ménopausé) associée à la consommation « bio ». En revanche, manger de la nourriture « bio », plutôt que des aliments traités en agriculture conventionnelle (avec pesticides), n'induit pas d'amélioration sur le développement du cancer colorectal. Cela soulève donc la question quant à l'effet potentiellement néfaste de l'exposition aux biopesticides sur ce type de cancers. Ces résultats souffrent cependant de la limite des études épidémiologiques impliquant une multiplicité des facteurs et de leurs interactions possibles. Par exemple, le style/ condition de vie et la qualité nutritionnelle ne sont pas les mêmes pour les consommateurs de produits « bio » par rapport à la population générale, rendant difficile les conclusions quant au facteur véritablement déterminant. Une autre étude a utilisé le modèle drosophile

m/s hors série n° 1, vol. 36, octobre 2020 **25** 

la formation de pores dans l'épithélium intestinal. Les bactéries *Bt* végétatives qui ont germé peuvent alors traverser la barrière intestinale pour se multiplier dans le milieu intérieur, ce qui provoque une septicémie. Après son ingestion, *Bt* tue le ravageur, appelé alors sensible ou cible, en deux à trois jours.

<sup>1</sup> https://agriculture.gouv.fr/le-plan-ecophyto-quest-ce-que-cest

pour évaluer l'effet de la nourriture « bio » sur la santé, et a montré un bénéfice pour certains critères de vie tels que la longévité et la fertilité [14]. Cependant, tout comme les deux études épidémiologiques décrites ci-dessus, le traitement d'origine des produits n'est pas contrôlé. De plus, les mouches ont été élevées sur des milieux contenant exclusivement des extraits de fruits/légumes « bio » ou conventionnels, c'est-à-dire sans complément nutritif additionnel, ce qui ne correspond pas à une nourriture optimale de la mouche (notamment au niveau protéique). Ainsi, mêmes les mouches nourries avec des fruits ou légumes conventionnels montrent une durée de vie limitée et une fertilité réduite par rapport à des mouches élevées sur un milieu traditionnel de laboratoire. Toutes ces études présentent donc une certaine limite, et il apparaît nécessaire de développer un modèle d'étude qui permette d'évaluer de manière contrôlée l'impact à long terme des bioinsecticides, notamment ceux à base de Bt qui sont largement majoritaires.

### Notre projet de recherche

Notre projet de recherche est d'étudier les impacts d'une prise alimentaire quotidienne de spores de Bt (bioinsecticides commerciaux) sur le développement de maladies inflammatoires et de cancers de l'intestin grâce à la drosophile (*Drosophila melanogaster*) (Figure 2). Ce modèle « insecte » présente l'avantage de ne pas être sensible à la toxicité aiguë des spores de Bt et de ses toxines, ce qui nous permet d'analyser les effets de l'exposition chronique à long terme. Des travaux antérieurs de l'équipe ont montré que l'ingestion ponctuelle de faibles quantités de bactéries Bt végétatives (forme proliférative) induisait, via les voies de signalisation JNK, JAK/STAT et Hippo/Yorkie, une augmentation transitoire du nombre de cellules (hyperplasie), compromettant la physiologie de l'intestin adulte [15]. Afin de mimer au mieux une exposition naturelle, notre équipe a développé un protocole d'intoxication chronique utilisant une dose de bioinsecticides commerciaux qui correspond à la quantité de spores Bt retrouvée sur les légumes après traitement (dose environnementale d'épandage). Nous utilisons ce protocole pour évaluer l'impact de l'ingestion chronique des bioinsecticides Bt sur la longévité et la physiologie intestinale des mouches, en focalisant notre étude sur des drosophiles adultes matures, mais également sur des drosophiles fragiles, c'est-à-dire nouvellement écloses (mouches immatures), âgées ou encore ayant des prédispositions génétiques à développer des pathologies intestinales, puisque ces facteurs pourraient se révéler aggravant pour l'intoxication par Bt. Nous étudions à partir de ces différentes populations si l'ingestion chronique de Bt avec la nourriture affecte leur durée de vie, ainsi que la morphologie et la physiologie de leur intestin. Grâce à des techniques de biologie cellulaire, nous regardons après dissection des intestins si la structure, la composition cellulaire et l'organisation intercellulaire au sein du tissu sont affectées, et si oui quels peuvent en être les mécanismes.

L'utilisation de la drosophile permettra d'aborder cette problématique d'un point de vue génétique, moléculaire, cellulaire et physiologique. La conservation des mécanismes régissant l'homéostasie, l'inflammation et la réponse immunitaire de l'intestin suggère que, si impact il y a, Bt

pourrait avoir un effet semblable chez les mammifères, dont l'homme. Il sera ainsi intéressant d'analyser les effets des produits Bt chez d'autres modèles animaux tels que la souris. Ces travaux permettront à terme de déterminer si une inflammation induite de façon persistante par l'ingestion répétée de Bt via l'alimentation pourrait favoriser et/ou accélérer le développement de pathologies inflammatoires de l'intestin, voire des cancers (Figure 2). Si tel est le cas, il sera important à l'avenir d'établir un seuil de quantité de Bt par gramme de fruits/légumes au-dessus duquel l'aliment serait impropre à la consommation afin d'optimiser les conditions d'usage des bioinsecticides Bt (dose d'épandage, nombre de traitements) et de consommation des denrées traitées (méthodes de lavage). De plus, il pourrait être préconisé aux personnes fragiles présentant déjà des pathologies inflammatoires intestinales d'être particulièrement attentives à la consommation de ces produits alimentaires « bio ». Enfin, nos travaux permettront également de renforcer les connaissances fondamentales sur la relation entre les bactéries allochtones, l'inflammation et le développement de tumeurs. •

Impact of *Bacillus thuringiensis*-based bioinsecticides on the development of intestinal cancers

### REMERCIEMENTS

Nous remercions tous les membres de notre équipe « Bioinsecticides, Environnement et Santé » pour leur aide et pour les échanges scientifiques fructueux sur notre projet.

### FINANCEMENTS

Ce projet est soutenu par la Ligue Nationale Contre le Cancer (allocation doctorale d'Aurélia Joly, appel à projets 2018), par le PNR-EST ANSES & ECOPHYTO II (2017) et par la Fondation ARC pour la recherche sur le cancer (contrat N°20171206145). Ce travail bénéficie également d'une aide du gouvernement français, gérée par l'Agence Nationale de la Recherche au titre du projet Investissements d'Avenir UCAJEDI portant la référence n° ANR-15-IDEX-01.

### LIENS D'INTÉRÊT

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

### RÉFÉRENCES

- 1. Li H, Jasper H. Gastrointestinal stem cells in health and disease: from flies to humans. *Dis Model Mech* 2016; 9: 487-99.
- Ruder B, Atreya R, Becker C. Tumour necrosis factor alpha in intestinal homeostasis and gut related diseases. Int J Mol Sci 2019; 20.
- Poulin EJ, Haigis KM. No back seat for a progression event K-RAS as a therapeutic target in CRC. Genes Dev 2017; 31: 333-5.
- 4. Barker N, Ridgway RA, Es JH Van, et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. Nature 2009; 457: 608-11.
- Lee WC, Beebe K, Sudmeier L, et al. Adenomatous polyposis coli regulates Drosophila intestinal stem cell proliferation. Development 2009; 17(1):2355-144.
- Martel C de, Franceschi S. Infections and cancer: established associations and new hypotheses. Crit Rev Oncol Hematol 2009; 70: 183-94.

### RÉFÉRENCES

- Apidianakis Y, Pitsouli C, Perrimon N, et al. Synergy between bacterial infection and genetic predisposition in intestinal dysplasia. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106: 20883-8.
- Biteau B, Hochmuth CE, Jasper H. JNK activity in somatic stem cells causes loss of tissue homeostasis in the aging Drosophila gut. Cell Stem Cell 2008; 3: 442-55.
- 9. Jasper H. Intestinal stem cell aging: origins and interventions. Annu Rev Physiol 2020; 82: 203-26.
- Johler S, Kalbhenn EM, Heini N, et al. Enterotoxin production of Bacillus thuringiensis isolates from biopesticides, foods, and outbreaks. Front Microbiol 2018; 9: 1915.
- 11. Rubio-Infante N, Moreno-Fierros L. An overview of the safety and biological effects of Bacillus thuringiensis Cry toxins in mammals. J Appl Toxicol 2016; 36:630-48.

CABS BIOSIS

12. Bradbury KE, Balkwill A, Spencer EA, et al. Organic food consumption and the incidence of cancer in a large prospective study of women in the United Kingdom. Br J Cancer 2014; 110: 2321-6.

- Baudry J, Assmann KE, Touvier M, et al. Association of frequency of organic food consumption with cancer risk: findings from the NutriNet-Santé prospective cohort study. JAMA Intern Med 2018; 178: 1597-606.
- Chhabra R, Kolli S, Bauer JH. Organically grown food provides health benefits to Drosophila melanogaster. PLoS One 2013; 8.
- 15. Loudhaief R, Brun-Barale A, Benguettat O, et al. Apoptosis restores cellular density by eliminating a physiologically or genetically induced excess of enterocytes in the Drosophila midgut. Development 2017; 144: 808-19.

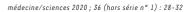
TIRÉS À PART

A. Joly



m/s hors série n° 1, vol. 36, octobre 2020 **27** 

www.medecinesciences.org





Le vieillissement chez la femme induit une immunosénescence et la ménopause. Ces changements favorisent le développement de maladies chroniques telles que l'obésité ou le cancer du sein. Les déterminants majeurs de la qualité du vieillissement sont l'accompagnement nutritionnel et une activité physique (AP) régulière. La littérature suggère que l'AP est bénéfique contre le développement du cancer du sein après la ménopause chez les femmes obèses [1]. Cependant, les mécanismes mis en jeux sont mal compris et peu d'études se sont concentrées sur le système immunitaire au cours de la carcinogenèse mammaire dans un contexte d'obésité associée à l'AP.

### Le vieillissement chez la femme

Le vieillissement entraîne l'apparition de troubles métaboliques et inflammatoires qui peuvent être réduits par des stratégies préventives et non thérapeutiques comme l'accompagnement nutritionnel, la mobilité et l'AP afin de garder une qualité de vie satisfaisante [2]. Le vieillissement induit une détérioration du système immunitaire appelée immunosénescence, caractérisée par une diminution de la réponse immunitaire innée et adaptative, une dysfonctionnement de l'immunité et l'involution du thymus. La fonction et le phénotype des cellules immunitaires sont affectés avec une baisse de l'expression et de l'activité de certains de leurs récepteurs, contribuant à la perte du chimiotactisme et de la destruction cellulaire. Une diminution du potentiel lymphoïde est observée avec un déclin des lymphocytes T et B [1]. Le système immunitaire vieillissant crée une inflammation chronique à bas bruit avec une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 [interleukine-1], TNF- $\alpha$  [tumor necrosis factor- $\alpha$ ], IL-6 [interleukine-6], CRP [protéine C réactive]). Cet environnement favorise les dommages tissulaires et contribue à un vieillissement biologique accru [1]. Les mécanismes de compensation qui se mettent alors en place augmentent l'incidence des maladies auto-immunes et de nombreux cancers.

## Obésité et cancer du sein

## Deux maladies du vieillissement limitées par l'activité physique

Delphine Le Guennec, Stéphanie Rougé, Florence Caldefie-Chézet, Marie-Paule Vasson, Adrien Rossary



Laboratoire de biochimie, biologie moléculaire et nutrition, Équipe ECREIN, Unité de Nutrition Humaine, Université Clermont Auvergne, INRAE, UNH, F-63000 Clermont-Ferrand, France. delphine.le\_guennec@uca.fr stephanie.rouge@uca.fr florence.caldefie-chezet@uca.fr m-paule.vasson@uca.fr adrien.rossary@uca.fr

Chez la femme, avec le vieillissement, un autre processus se met en place: la ménopause. Les œstrogènes ne sont plus sécrétés par les ovaires mais le sont alors au niveau du tissu adipeux par aromatisation [3]. La prise de masse grasse est favorisée avec un accroissement du tissu adipeux viscéral et ses effets défavorables sur le système cardio-métabolique sous-jacent [3]. Le tissu mammaire, principalement composé d'adipocytes, est un microenvironnement favorable au développement de lésions précancéreuses [4]. Par l'intermédiaire de leurs récepteurs, les œstrogènes favorisent la prolifération cellulaire du tissu mammaire ainsi que le risque d'erreurs dans la réplication de l'ADN, facteurs liés de manière causale au cancer du sein. Ces deux facteurs, liés au vieillissement naturel chez la femme, favorisent le développement du cancer du sein [5].

### Le cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer féminin le plus répandu dans le monde et représente 25 % des nouveaux cas de cancer (1,7 million de nouveaux cas diagnostiqués par an) [5]. En France, il représente un tiers de l'ensemble des nouveaux cas de cancers (58459 nouveaux cas en 2018) [6]. Près d'une femme sur neuf développera un cancer du sein. L'âge moyen au diagnostic est de 63 ans en 2012 et moins de 10 % des cancers surviennent avant 40 ans. L'incidence augmente jusqu'à 65 ans. Ce cancer est la première cause de décès par cancer en France chez les femmes avec un âge médian de 74 ans (12146 décès en 2018). Néanmoins, la mortalité a diminué entre 2005 et 2012 de 1,5 % par an en moyenne. La survie nette standardisée sur l'âge est de 87 % à 5 ans et 76 % à 10 ans. Cette évolution inverse s'explique notamment par un dépistage organisé, conduisant à des diagnostics plus précoces et par l'amélioration de la prise en charge.

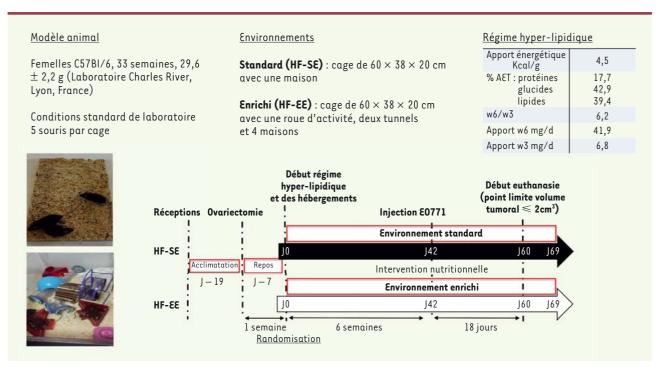


Figure 1. Matériel et méthodes.

Divers facteurs influencent le développement de ce cancer, l'âge en restant le principal. L'histoire hormonale et reproductive de la femme a un rôle important, la plupart des cancers du sein sont hormono-dépendants. Plus la durée d'exposition de la glande mammaire aux hormones est importante, plus le risque de développer un cancer du sein augmente. Les menstruations précoces, les grossesses après 30 ans, l'absence de grossesse à terme et la ménopause tardive (après 50 ans) augmentent le nombre de cycles menstruels [6]. Certains facteurs de risques sont endogènes, tels que les antécédents familiaux de cancer (sein, ovaires) ou les prédispositions génétiques (mutations BRCA [breast cancer]1 et 2, CHK2 [checkpoint kinase 2] et ATM [ataxia telangiesctasia mutated]) [6, 7]. II existe des facteurs de risques exogènes liés à nos modes de vie tels que la consommation d'alcool, de tabac, un régime riche en graisses animales et en sucre, l'obésité, la sédentarité et le manque d'activité physique [5]. À l'inverse, l'allaitement maternel et une AP régulière sont des facteurs protecteurs [8]. En prévention, puis à tous les stades du cancer, l'AP et le maintien d'un poids sain (correspondant à un indice de poids corporel [IMC]<sup>1</sup> compris entre 20 et 25) sont des facteurs importants dans la prise en charge des patientes.

Bien que longtemps considéré comme une masse unique de cellules malignes, il est maintenant établi que le cancer est un véritable organe multicellulaire. Les cellules tumorales évoluent et coexistent avec un microenvironnement composé de nombreux types cellulaires comme les adipocytes, les fibroblastes, les cellules stromales et les cellules immunitaires. L'interaction dynamique entre ces cellules permet la

### L'obésité et le cancer

L'obésité est associée à un risque accru de développement du cancer du sein après la ménopause, mais aussi à un mauvais pronostic et à une mauvaise réponse au traitement [4, 5]. L'obésité est définie par un IMC supérieur à 30 kg/m². Une expansion pathologique du tissu adipeux blanc se met en place, caractérisée par une hypertrophie et une hyperplasie des adipocytes, favorisant l'hypoxie, la production d'espèces réactives de l'oxygène et de cytokines pro-inflammatoires [4]. L'hypertrophie des adipocytes entraine leur nécrose et un stimulus phagocytaire important. L'inflammation accrue dans le tissu adipeux modifie le phénotype des cellules immunitaires résidentes. Les macrophages s'infiltrent et forment des structures caractéristiques en couronne (crown-like) autour des adipocytes nécrosés. Ces macrophages de type 1 jouent un rôle clé dans l'inflammation chronique et la résistance à l'insuline.

m/s hors série n° 1, vol. 36, octobre 2020 **29** 

progression tumorale faisant suite à leurs activations et sécrétions. Parmi les cellules du microenvironnement tumoral, les adipocytes représentent le composant majoritaire du stroma. La production d'adipokines, telles que la leptine ou l'adiponectine, est reliée à la quantité de tissu adipeux et se révèle importante lors du développement de cellule cancéreuse chez les personnes en situation d'obésité.

<sup>1</sup> IMC = poids (kg)/taille (m)2.

Une corrélation positive existe entre le nombre et la taille des adipocytes et l'obésité. Ainsi, le tissu adipeux d'une personne obèse devient la principale source de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, le LIF (leucocyte inhibitory factor), le TNF- $\alpha$  et l'IL-1, au dépend des cytokines anti-inflammatoires de type 2 comme l'IL-4, l'IL-5 ou l'IL-10, dont les taux sont diminués [9]. L'inflammation favorise l'expression du gène CYP19 et l'activité de l'aromatase au sein du tissu adipeux, augmentant localement la production d'æstradiol [3, 4]. Ces altérations et sécrétions favorisent le développement du cancer et la mortalité qui s'ensuit. Un transfert de triglycérides des adipocytes vers les cellules cancéreuses se met en place, augmentant le potentiel métastatique [10]. L'AP et la mobilité constituent une stratégie fondamentale de lutte contre l'obésité et le cancer du sein.

### La mobilité et l'activité physique

Si l'on tient compte du seuil que représente la ménopause dans la vie d'une femme, l'AP réduit le risque de cancer du sein de 27 % avant la ménopause et de 31 % après celle-ci [11, 12]. Une relation doseréponse entre l'AP et le risque de développer un cancer du sein a été démontré et la réduction moyenne est estimée à 25 % [12]. L'impact de l'AP sur la cancérogenèse est fondé sur la modulation des hormones sexuelles, de l'insuline, des marqueurs inflammatoires et de la fonction immunitaire [13].

Indépendamment du statut ménopausique et de l'IMC, l'AP est associée à une diminution des niveaux d'æstrogènes, entraînant un effet antiprolifératif dès un niveau d'AP modérée [12]. Les muscles squelettiques, qui représentent environ 40 % du poids total du corps, jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme énergétique. Lors d'un exercice, les muscles vont augmenter leur consommation d'énergie. Des exercices réguliers vont favoriser à terme une élévation du métabolisme, avec une réduction de l'adiposité et une meilleure sensibilité à l'insuline.

Un autre rôle important de l'AP est la réduction de l'inflammation observée dans l'obésité ou lors du vieillissement [2]. La pratique d'une AP régulière diminue l'inflammation et la réponse au stress, notamment par la sécrétion de myokines anti-inflammatoire, comme l'IL-10 ou l'IL-2, [14] qui diminuent en retour la sécrétion de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-6 ou MCP (monocyte chemoattractant protein)-1. Or l'inflammation est liée à tous les événements impliqués dans le développement et la progression du cancer. Cependant, les effets bénéfiques de l'AP sur l'inflammation causée par le cancer ne sont pas encore totalement établis. Dans les modèles de cancer du sein chez les rongeurs, l'AP imposée réduit le taux sérique des médiateurs de l'inflammation comme l'IL-6 après 20 semaines d'entraînements, et est associée à une croissance tumorale plus lente [14]. Les preuves épidémiologiques de l'importance des taux sanguins d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  dans la croissance tumorale sont moins convaincantes, notamment du fait de la difficulté à évaluer l'adéquation entre le comportement du patient et l'AP proposée [14].

En ce qui concerne le système immunitaire, les effets anti-inflammatoires de l'AP se traduisent par une baisse du nombre de monocytes

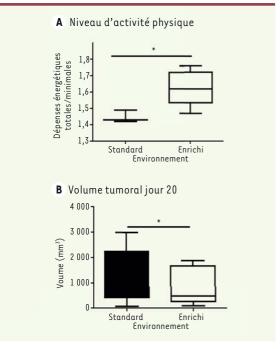


Figure 2. Volume tumoral et niveau d'activité physique. A. Niveau d'activité physique en fonction de l'environnement. Les résultats sont représentés comme étant la dépense énergétique totale divisée par la dépense énergétique minimale [moyenne  $\pm$  SEM (standard error of the mean (Ou erreur standard sur la moyenne.))] (n=10 animaux/groupe). B. Volume tumoral en fonction de l'environnement 20 jours après implantation des cellules E0771. Les résultats sont exprimés comme la moyenne  $\pm$  SEM (n=10 animaux/groupe). Un test statistique de Mann-Whitney a été utilisé [standard (SE) versus enrichi (EE)] pour analyser ces résultats. \* p < 0.05 est considéré comme étant significatif.

pro-inflammatoires circulants au profit de lymphocytes T régulateurs. L'immunité à médiation cellulaire est favorisée avec l'augmentation du nombre de macrophages et de lymphocytes T cytotoxiques. L'AP est capable de renforcer les défenses immunitaires antitumorales et de ralentir l'immunosénescence [2].

La littérature suggère que l'AP, grâce à ses effets antiinflammatoires et immunomodulateurs, est bénéfique pour prévenir le développement du cancer du sein après la ménopause chez les femmes obèses, que ce soit en prévention primaire, secondaire ou tertiaire [15]. Malgré ces données, peu de recherches ont été menées sur l'évolution du système immunitaire dans cette situation.

## Notre projet : explorer l'impact de l'activité physique sur la croissance tumorale

Notre objectif est d'explorer l'impact de l'AP spontanée sur l'environnement tissulaire mammaire dans un

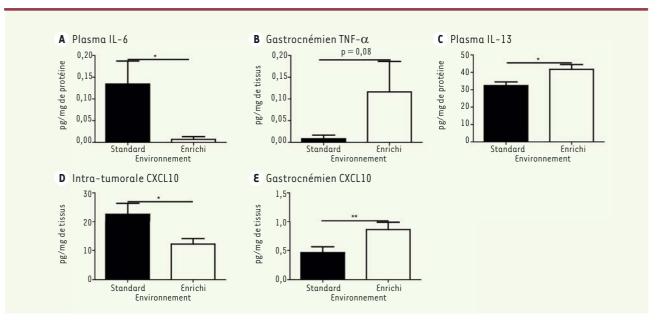


Figure 3. Taux de cytokines dans le plasma et les tissus. A. Quantités d'IL-6 par mg de protéines totales plasmatiques. B. Quantités de TNF- $\alpha$  par mg de muscle gastrocnémien. C. Quantités d'IL-13 par mg de protéines totales plasmatiques. D. Quantités de CXCL10 intra-tumoral par mg de tissu. E. Quantités de CXCL10 par mg de muscle gastrocnémien. Tous les résultats (A-E) sont exprimés sous forme de moyennes ± SEM (n = 6 animaux/groupe). Un test statistique de Mann-Whitney a été utilisé [standard (SE) versus enrichi (EE)] pour analyser ces résultats. \* p < 0.05 est considéré comme étant significatif.

modèle de croissance tumorale (Figure 1). Des souris C57BI/6, âgées de 33 semaines, sont ovariectomisées et nourries avec un régime riche en graisses. Les souris sont séparées en deux groupes suivant leur mode d'hébergement : standard (SE, standard environment), proche de la sédentarité, ou enrichi (EE, enriched environment) qui favorise une AP spontanée. Après six semaines, des cellules néoplasiques E0771 (issues d'une lignée d'adénocarcinome médullaire spontanée de souris C57BI/6) sont implantées dans le fat-pad de la quatrième glande mammaire gauche ( $5 \times 10^5$  cellules dans  $100 \,\mu$ l de matrigel). Le point limite de la croissance tumorale est fixé à 2 cm<sup>3</sup>. Les cytokines et les chimiokines sont alors analysées dans le micro-environnement tumoral, la glande mammaire controlatérale, le tissu adipeux inguinal et le muscle gastrocnémien. Au cours de l'expérimentation, le volume tumoral a été mesuré avec un pieds à coulisse grâce à la formule V =  $4/3\pi \times (largeur/2)^2 \times (longueur/2)$ . L'AP a été mesurée grâce à la calorimétrie indirecte avec le système TSE PhenoMaster/LabMaster. Après euthanasie et ponction cardiaque des souris, le sang a été centrifugé pour récupérer le plasma et les tissus ont été prélevés et stockés à -80 °C jusqu'à analyse. Les cytokines ont été dosées par une technique multiplex (kit Miliplex) à partir du broyat de tissu ou du plasma dilué de façon appropriée.

Nos premiers résultats montrent que l'EE augmente le niveau d'AP comparé au SE (Figure 2A) et l'AP ralentit la croissance tumorale. Vingt jours après l'implantation des cellules E0771, le volume tumoral est de  $634 \pm 388$  mm³ en EE contre  $1572 \pm 678$  mm³ en EE (Figure 2B). Ce modèle animal confirme donc les observations de la littérature sur

l'intérêt de l'AP pour limiter la croissance tumorale mammaire.

L'AP spontanée induit une baisse de la quantité d'IL-6 circulante, mais est accompagnée d'une tendance à l'augmentation de la quantité de TNF-lpha dans le muscle gastrocnémien (Figures 3A et 3B). En ce qui concerne les cytokines anti-inflammatoires, la quantité d'IL-13 par mg de protéines plamsatiques est augmentée (Figure 3C), favorisant l'accroissement du nombre de lymphocytes Thelper 2 (Th2). Ces résultats sont en accord avec la littérature où l'AP augmente de manière transitoire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires au sein des muscles, mais induit par la suite une réponse systémique anti-inflammatoire [15]. Une baisse de la quantité de CXCL (C-X-C motif chemokine)10 est observée dans les masses tumorales, alors qu'elle augmente dans le muscle gastrocnémien (Figures 3D et 3E). Cette observation confirme l'importance des microenvironnements tissulaires dans la régulation des recrutements cellulaires et nécessite des investigations plus détaillées. Par ailleurs, la chimiokine CXCL10 est sécrétée en réponse à l'INF (interféron)- $\gamma$  et au TNF- $\alpha$ . Nos résultats sont en accord avec la littérature puisque l'augmentation du TNF-lpha est associée à une augmentation de CXCL10 dans le muscle gastrocnémien en EE comparé au SE.

m/s hors série n° 1, vol. 36, octobre 2020 **31** 

### Une conclusion et des perspectives...

De nos jours, un nombre croissant de données suggère le rôle positif de l'AP dans le cancer du sein, notamment chez les patientes obèses, sans mécanisme clairement identifié. Nos résultats préliminaires suggèrent que l'AP spontanée permet de réduire la croissance tumorale mammaire dans le modèle murin utilisé. Cela semble passer par un effet anti-inflammatoire global et une régulation tissu-spécifique. Le modèle animal que nous utilisons, et à partir duquel nos premières données expérimentales sont cohérentes avec la littérature, permettra l'étude plus précise des mécanismes impliqués, notamment sur les échanges survenant entres tissus, dans des situations de prévention primaire ou secondaire et vis-à-vis d'intensités d'activités physiques différentes. Ces résultats pourraient permettre une adaptation plus fine de l'AP chez les personnes en situation d'obésité. Nous émettons l'hypothèse que l'AP a un effet anti-inflammatoire également au sein de la tumeur et des tissus immunitaires secondaires comme le thymus ou les ganglions inguinaux. Nous nous attendons à observer un recrutement plus important au sein de la tumeur de cellules immunitaires de type 2 comme les lymphocytes T régulateurs, helper ou les macrophages de type 2 pour l'EE comparé au SE, et cela en corrélation avec l'intensité d'AP.♦

Obesity and breast cancer: two diseases of aging limited by physical activity

### LIENS D'INTÉRÊT

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

### RÉFÉRENCES

- 1. Patterson RE, Cadmus LA, Emond JA, et al. Physical activity, diet, adiposity and female breast cancer prognosis: a review of the epidemiologic literature. Maturitas 2010; 66: 5–15.
- Weyh C, Krüger K, Strasser B. Physical activity and diet shape the immune system during aging. Nutrients 2020; 12: 622.

- Leeners B, Geary N, Tobler PN, Asarian L. Ovarian hormones and obesity. Hum Reprod Update 2017: 23: 300-21.
- Engin AB, Engin A, Gonul II. The effect of adipocyte-macrophage cross-talk in obesity-related breast cancer. J Mol Endocrinol 2019; 63: R201-22.
- World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Diet, nutrition, physical activity and cancer: A global perspective. Continous update. Project Expert Report 2018. Available at dietandcancerreport.org.
- Sofi NY, Jain M, Kapil U, et al. Reproductive factors, nutritional status and serum 25(OH)D levels in women with breast cancer: a case control study. I Steroid Biochem Mol Biol 2018: 175: 200-4.
- 7. Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann Oncol* 2015: 26: 1291-9.
- 8. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. Lancet. 2002; 360: 187-95.
- Spyrou N, Avgerinos KI, Mantzoros CS, et al. Classic and novel adipocytokines at the intersection of obesity and cancer: diagnostic and therapeutic strategies. Curr Obes Rep 2018; 7: 260-75.
- Himbert C, Delphan M, Scherer D, et al. Signals from the adipose microenvironment and the obesity-cancer link: a systematic review. Cancer Prev Res 2017: 10: 494-506.
- 11. Brown JC, Winters-Stone K, Lee A, et al. Cancer, physical activity, and exercise. Compr Physiol 2012; 2: 2775-809.
- Ennour-Idrissi K, Maunsell E, Diorio C. Effect of physical activity on sex hormones in women: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Breast Cancer Res 2015; 17: 139.
- 13. Kang DW, Lee J, Suh SH, et al. Effects of exercise on insulin, IGF axis, adipocytokines, and inflammatory markers in breast cancer survivors: a systematic review and meta-analysis. Cancer Epidemiol. Biomark Prev 2017; 26: 355-65.
- Dalamaga M. Interplay of adipokines and myokines in cancer pathophysiology: emerging therapeutic implications. World J Exp Med 2013; 3 · 26-33
- 15. Le Guennec D, Rossary A. The interrelationship between physical activity and metabolic regulation of breast cancer progression in obesity via cytokine control. Cytokine Growth Factor Rev 2020; 52:76-87.

TIRÉS À PART

D. Le Guennec





## Neuropathie périphérique induite par l'oxaliplatine

### Comment faire barrière?

Sonia Taïb, Juliette Durand, Isabelle Brunet



Centre interdisciplinaire de recherche en biologie (CIRB). Inserm U1050, CNRS UMR 7241, Collège de France, 11 place Marcelin Berthelot, 75005 Paris, sonia.taib@college-de-france.fr juliette.durand@college-defrance.fr isabelle.brunet@college-defrance.fr

L'utilisation de l'oxaliplatine, une molécule chimiothérapeutique, est fréquente pour traiter en première intention les cancers colorectaux et d'autres cancers ayant peu d'options thérapeutiques. L'efficacité de ce traitement est nuancée par les effets secondaires qu'il provoque, particulièrement les douleurs neuropathiques, qui conduisent à la diminution ou l'arrêt du traitement. Les neuropathies périphériques chimioinduites (NPCI) sont en effet caractérisées par des symptômes neurologiques très invalidants [1].

L'amélioration de la prise en charge des symptômes neuropathiques représente donc un objectif thérapeutique crucial, alors qu'il n'existe actuellement aucun traitement efficace pour les soigner ou les prévenir. Mieux comprendre l'étiologie des neuropathies consécutives à l'administration d'oxaliplatine par voie sanguine est donc absolument nécessaire. Peu d'études existent sur l'implication de la composante vasculaire dans leur développement, qui se caractérise par une dégénérescence nerveuse et vasculaire. Déterminer le rôle du système vasculaire intra-nerveux dans la survenue de la neuropathie est donc un enjeu important, qui pourrait permettre le développement de nouvelles pistes thérapeutiques pour traiter les neuropathies périphériques et améliorer la qualité de vie des patients cancéreux.

### La neuropathie induite par l'oxaliplatine : un effet secondaire fréquent encore mal compris

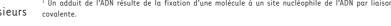
### L'utilisation de l'oxaliplatine comme antinéoplasique

L'oxaliplatine est une molécule antinéoplasique de synthèse appartenant à la famille des sels de platine, largement utilisée depuis 1996 pour le traitement de tumeurs solides. Elle est souvent utilisée comme traitement de première intention des cancers de la voie digestive, notamment les cancers colorectaux, de l'œsophage, gastriques et les cancers métastatiques du pancréas. Le traitement adjuvant de référence utilisé suit le protocole « FOLFOX4 » composé d'oxaliplatine, d'acide folinique et de 5-fluoro-uracile. Son administration se fait par voie intraveineuse avec plusieurs cycles d'injections. L'oxaliplatine a différentes cibles au sein de la cellule tumorale afin de conduire à sa dysfonction et à sa mort par apoptose (Figure 1). L'oxaliplatine est transportée dans la cellule tumorale par transport passif à travers la membrane plasmique ou par transport actif via des transporteurs cationiques de la famille des OCT (organic cationic transporter) comme OCT1 et OCT2 ou encore CTR1 (copper transporter 1) [2]. Une fois dans la cellule, la molécule est hydratée et devient réactive, provoquant des adduits<sup>1</sup> à l'ADN nucléaire et mitochondrial. La platination de l'ADN nucléaire provoque l'activation des mécanismes de réparation dits BER (base excision repair) et NER (nucleotides excision repair) de l'ADN, conduisant à une inhibition de la transcription et de la réplication. Au niveau de l'ADN mitochondrial, la réplication et la transcription sont alors également inhibées, provoquant une altération de la chaîne respiratoire. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, pour reactive oxygen species) est augmentée, ce qui augmente le stress oxydatif intracellulaire. Les molécules d'oxaliplatine hydratées se liant également aux molécules nucléophiles comme le glutathion, elles provoquent une déplétion des réserves d'antioxydants et participent aussi à l'augmentation de la concentration de ROS intracellulaire [3]. Enfin, des cellules immunitaires sont activées (macrophages, lymphocytes T et monocytes) et des cytokines pro-inflammatoires sont produites. Tous ces phénomènes conduisent à la mort cellulaire par apoptose.

### Les effets iatrogènes de l'oxaliplatine

La chimiothérapie étant un traitement agressif, utilisant souvent des doses très élevées, les effets iatrogènes sont pratiquement

 $<sup>^{1}</sup>$  Un adduit de l'ADN résulte de la fixation d'une molécule à un site nucléophile de l'ADN par liaison



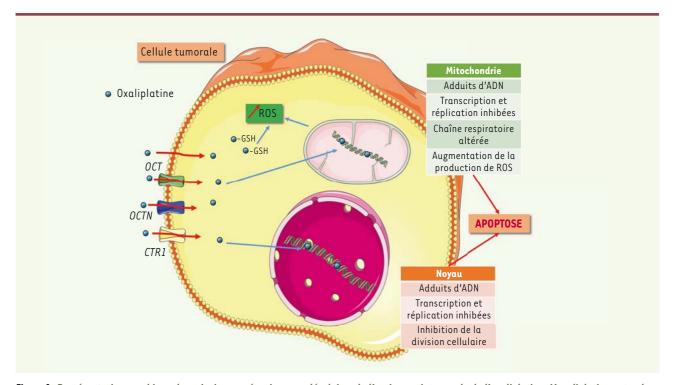


Figure 1. Représentation graphique des principaux mécanismes moléculaires de l'action anti-tumorale de l'oxaliplatine. L'oxaliplatine entre dans la cellule via des transporteurs ou par transport passif. Elle provoque des adduits à l'ADN nucléaire et mitochondrial inhibant la réplication et la transcription. L'altération de la chaine respiratoire mitochondriale et la diminution de l'activité des antioxydants (GSH : glutathion) participent à l'augmentation de la concentration en espèces réactives de l'oxygène (ROS pour reactive oxygen species) menant à un stress oxydatif. L'oxaliplatine provoque ainsi la mort cellulaire par apoptose.

inévitables. Les complications associées et leur incidence peuvent varier selon les facteurs de comorbidité du patient éventuellement présents, la molécule et la dose utilisées. L'effet neurotoxique, et donc le développement d'une NPCI, est une complication majeure de l'utilisation des agents anticancéreux. En effet, environ 70 % des patients recevant une chimiothérapie développent une NPCI dans le mois qui suit le traitement [4]. Dans le cas de l'oxaliplatine, la prévalence se situe entre 85 et 96 % pour les formes aigües (dans les heures qui suivent la perfusion). L'allodynie<sup>2</sup> provoquée par des températures froides est un effet secondaire aigu spécifique de l'utilisation de l'oxaliplatine. Les autres symptômes neurologiques sensoriels sont des paresthésies<sup>3</sup>, des dysesthésies<sup>4</sup> et des ataxies sensorielles au niveau des pieds, des mains et de la région périorale. Les symptômes neuropathiques moteurs sont constitués par des crampes aiguës et des fasciculations. Les perfusions se faisant par cycles, la neuropathie aiguë disparaît dans la plupart des cas avant l'entrée dans le cycle suivant. Cependant, la répétition de ces cycles conduit au développement d'une NPCI de forme chronique et cumulative, chez 40 à 93 % des patients [5]. L'apparition des symp-

tômes est la plupart du temps distale et symétrique

et se fait selon une distribution typique en « gants

et chaussettes » au niveau des pieds et des mains. La survenue et la sévérité de la forme chronique

dépendent de la dose cumulée : une dose cumulative

dépassant les 510-765 mg/m² engendre une neuro-

pathie sévère caractérisée par une persistance des

symptômes entre les cycles d'injections. La réversi-

bilité complète de ces symptômes reste rare. Ceux-ci

peuvent persister, s'aggraver ou apparaître des mois

## de l'oxaliplatine

Les sels de platine ont une faible spécificité pour les cellules cancéreuses, affectant aussi les cellules normales. L'oxaliplatine, contrairement aux autres sels de platine, est particulièrement neurotoxique car elle provoque une neuropathie périphérique aiguë et transitoire qui apparait dans les heures qui suivent

voire des années après l'arrêt de la chimiothérapie (effet appelé effet de coasting). Certains patients peuvent donc être en rémission mais continuer de souffrir d'une neuropathie chronique invalidante. Les mécanismes connus à l'origine de la neurotoxicité

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> L'allodynie est une douleur déclenchée par un stimulus normalement indolore.

 $<sup>^3</sup>$  La paresthésie est un trouble du sens du toucher, regroupant plusieurs symptômes désagréables mais non douloureux comme les fourmillements ou les picotements.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> La dysesthésie est une diminution ou une exagération de la sensibilité.

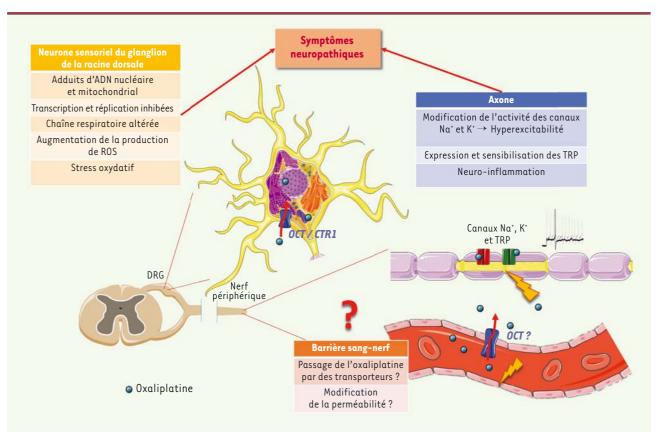
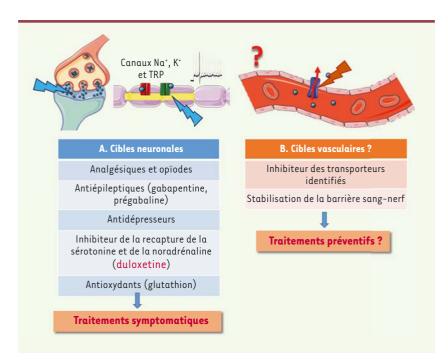


Figure 2. Représentation graphique des effets neurotoxiques de l'oxaliplatine. L'oxaliplatine s'accumule dans les neurones sensoriels des DRG (dorsal root ganglia) en entrant par des transporteurs (OCT et CTR1). Les effets sur les corps cellulaires et sur les axones sont à l'origine des symptômes neuropathiques ressentis. Le rôle de la barrière sang-nerf reste à être élucidé; l'oxaliplatine pourrait passer grâce à des transporteurs et/ou altérer la perméabilité de la barrière.

l'administration. Les mécanismes exacts menant à la NPCI ne sont pas complètement connus. Cependant, les cibles et mécanismes moléculaires responsables de l'effet anti-tumoral et de la neurotoxicité semblent être les mêmes. Plus spécifiquement, l'oxaliplatine serait transporté dans les neurones sensoriels des ganglions de la racine dorsale et s'y accumulerait préférentiellement [6]. Ce transport se ferait par le biais des OCT, notamment OCT2 [7] (Figure 2). L'hypothèse communément acceptée est que l'oxaliplatine provoque une dérégulation des canaux calciques voltage-dépendants situés au niveau des nœuds de Ranvier des axones sensoriels. Ces effets sont probablement dus à l'effet chélateur de l'oxalate (un métabolite de l'oxaliplatine) sur les ions calcique et magnésium, ce qui interfère sur la cinétique des canaux [3]. L'amplitude et la durée des potentiels d'action des neurones se retrouvent alors augmentées, tout comme les courants sodiques, menant à une hyperpolarisation prolongée des neurones. Cette hyperexcitabilité neuronale serait à la base de la neurotoxicité aigüe. Par ailleurs, les canaux appartenant à la famille des TRP (transient receptor potential), des canaux cationiques non sélectifs, sont responsables de la détection des signaux thermiques, mécaniques et chimiques. Ils sont exprimés par les neurones sensoriels des ganglions de la racine dorsale (DRG pour dorsal root ganglia) et joueraient un rôle dans la pathogenèse car leurs activités et leurs expressions sont augmentées après administration d'oxaliplatine [8]. Comme pour les cellules tumorales, l'oxaliplatine provoque un stress oxydatif qui jouerait un rôle majeur dans le développement de la NPCI. En effet, le système nerveux périphérique (SNP) est particulièrement sensible au stress oxydatif [9]. Par ailleurs, l'oxaliplatine provoque également des adduits à l'ADN nucléaire des neurones qui sont particulièrement sensibles à ces modifications car les différents systèmes de réparation de l'ADN y sont inefficaces, ce qui engage des mécanismes d'apoptose dans ces neurones. Enfin, une augmentation des niveaux de facteurs pro-inflammatoires comme le tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) l'interleukine (IL)- $1\beta$  et l'IL-6) mène à une neuro-inflammation et à la sensibilisation des nocicepteurs pouvant provoquer les douleurs neuropathiques.

m/s hors série n° 1, vol. 36, octobre 2020 **35** 



La barrière sang-nerf (BSN) : un acteur du développement de la neuropathie induite par l'oxaliplatine ?

### La BSN

Les NPCI sont des pathologies des nerfs périphériques. Ces nerfs rassemblent la partie axonale des neurones moteurs et sensoriels, et sont vascularisés par un système vasculaire appelé le vasa nervorum. Ce système apporte l'oxygène et les nutriments nécessaires au bon fonctionnement nerveux et joue également un rôle central dans le maintien de l'homéostasie du nerf. Les vaisseaux endoneuraux, situés à l'intérieur des nerfs, possèdent une propriété particulière de barrière. Les cellules endothéliales de ces vaisseaux sont liées entre elles par des protéines de jonctions serrées limitant le passage de solutés, de macromolécules et de xénobiotiques entre ces cellules. L'expression de différents transporteurs sur leurs membranes permet également de contrôler le passage de molécules spécifiques. Les neurones étant très sensibles, cette barrière permet de protéger les nerfs des agressions extérieures; cependant, elle reste moins imperméable que la barrière hémato-encéphalique (BHE), la plus restrictive des barrières présentes dans le corps humain. La composition moléculaire de la BSN reste très peu décrite. Une étude récente a permis d'établir le transcriptome de cette barrière chez l'homme [10]. Ce transcriptome a été établi à partir de micro-vaisseaux endoneuraux de nerfs sciatiques humains disségués au laser et à partir de de cultures primaires de cellules endothéliales humaines. Ces données pourraient permettre d'identifier de nouvelles molécules candidates jouant un rôle physiopathologique dans le développement des neuropathies périphériques.

### Rôle de la BSN dans le développement des NPCI?

La molécule anti-cancéreuse étant administrée par voie intraveineuse, elle circule dans tout l'organisme, y compris dans les nerfs, et peut y

Figure 3. Principales stratégies thérapeutiques visant à atténuer les symptômes neuropathiques. A. Les différentes familles de molécules utilisées agissant sur la transmission synaptique et la conduction nerveuse axonale. B. Les cibles possibles afin d'éviter les effets neurotoxiques au niveau des nerfs périphériques.

exercer son effet neurotoxique. Une des hypothèses est qu'elle passerait librement à travers les capillaires fenêtrés vascularisant les ganglions de la racine dorsale, là où se trouvent les corps cellulaires des neurones sensoriels. Les vaisseaux au niveau de la moelle épinière sont eux moins perméables. Cependant, les mécanismes par lesquels la molécule passerait des vaisseaux sanguins vers les axones, au niveau des nerfs périphériques, restent encore non

élucidés mais ne sont pas à exclure. En effet, les données disponibles sur les mécanismes d'action de l'oxaliplatine menant aux symptômes de la NPCI consistent essentiellement en une description de ses effets sur les neurones et ne discute pas du potentiel rôle de « porte d'entrée » des vaisseaux intra-nerveux. La BSN régulant l'homéostasie du nerf, elle est souvent impliquée dans des neuropathies périphériques induites par des lésions traumatiques du nerf comme un écrasement, une section, ou secondaires à des maladies comme le diabète [11]. Une altération de cette barrière peut entrainer une augmentation de sa perméabilité, laissant alors passer des molécules potentiellement nocives aux contact des cellules nerveuses. Par ailleurs, le nerf périphérique ne possède pas de système de drainage lymphatique. Une telle déstabilisation de la BSN peut alors contribuer à une dysfonction neuronale, une neuro-inflammation et donc au développement de neuropathies [12]. Enfin, les neuropathies centrales induites par l'oxaliplatine sont rares. Nous pouvons alors nous demander pourquoi les effets neurotoxiques de cette molécule sont majoritairement périphériques, et si la BHE jouerait un rôle protecteur. Considérant la rapidité d'apparition des symptômes, un effet direct sur les fibres nerveuses au niveau axonal est suggéré. L'oxaliplatine passerait-elle cette BSN grâce à des transporteurs spécifiques non ou peu exprimés par la BHE et la barrière sang-moelle épinière ? Cette molécule provoquerait-elle une déstabilisation de la BSN ? Répondre à ces questions permettrait d'identifier de nouvelles cibles afin de développer de nouvelles pistes thérapeutiques.

#### Stratégies thérapeutiques et nouvelles approches

Du fait de notre manque de connaissances actuel sur l'étiologie des NPCI, il n'existe actuellement aucune stratégie préventive ou curative efficace. Il existe des approches pharmacologiques et non-pharmacologiques visant à diminuer la sévérité des symptômes. De nombreuses molécules sont testées, mais elles n'ont soit pas d'effet bénéfique soit un effet sur un petit nombre de patients testés. Les NPCI entrainent des douleurs neuropathiques très difficiles à soulager. Des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, comme la duloxetine, sont utilisés pour traiter ces douleurs. Cette molécule est le seul médicament approuvé ayant un effet significatif sur la douleur neuropathique, d'après une étude clinique randomisée [13]. Elle permet l'inhibition du traitement des stimulus douloureux dans les neurones de la corne dorsale rachidienne. D'autres molécules sont aussi utilisées afin de calmer les douleurs neuropathiques, mais n'ont pas d'action préventive et leur efficacité n'est pas toujours complètement validée [14]. Les antiépileptiques, comme la gabapentine et la prégabaline ciblent les canaux calciques voltage-dépendants et diminuent le taux de neurotransmetteurs excitateurs comme le glutamate. Les analgésiques et des opioïdes, des antidépresseurs et des antioxydants sont également utilisés (Figure 3A). Des approches alternatives non-pharmacologiques sont aussi envisagées comme l'utilisation de produits naturels antioxydants (curcumine, éthoxyquine...) et de pratiques calmantes (massages, acupuncture, activité sportive...). Les stratégies thérapeutiques actuelles consistent donc à soulager les

Les stratégies thérapeutiques actuelles consistent donc à soulager les symptômes douloureux et ne servent pas à prévenir l'apparition des NPCI, démontrant un réel besoin de développer des thérapies fondées sur les mécanismes initiateurs. Considérant le rôle capital éventuel de la BSN, mieux comprendre comment l'oxaliplatine passe du système vasculaire au tissu nerveux et particulièrement au contact des axones, permettrait d'envisager des pistes thérapeutiques inédites, préventives et protectrices. En effet, réduire les effets neurotoxiques de cette molécule en empêchant son passage du système sanguin vers le tissu nerveux périphérique pourrait être une piste envisageable (Figure 3B). Enfin, aucune donnée n'existe quant à la toxicité des dérivés de sels de platine sur les cellules endothéliales et murales constituants les vaisseaux intra-nerveux. Si ces derniers sont endommagés et si la perméabilité de la BSN est altérée, l'homéostasie du nerf peut se retrouver dérégulée et exacerber les symptômes neuropathiques [12]. •

Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: how to create a barrier?

#### LIENS D'INTÉRÊT

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

#### RÉFÉRENCES

- Grisold W, Cavaletti G, Windebank AJ. Peripheral neuropathies from chemotherapeutics and targeted agents: diagnosis, treatment, and prevention. NeuroOncol 2012; 45-54.
- Harrach S, Ciarimboli G. Role of transporters in the distribution of platinumbased drugs. Front Pharmacol 2015; 6:17.
- Calls A, Carozzi V, Navarro X, et al. Pathogenesis of platinum-induced peripheral neurotoxicity: Insights from preclinical studies. Exp Neurol 2020; 325: 113141.
- Seretny M, Currie GL, Sena ES, et al. Incidence, prevalence, and predictors
  of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a systematic review and
  meta-analysis. Pain 2014; 155: 2461-70.
- 5. Colvin LA. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: where are we now? Pain 2019; 160: S1-10.
- Screnci D, McKeage MJ, Galettis P, et al. Relationships between hydrophobicity, reactivity, accumulation and peripheral nerve toxicity of a series of platinum drugs. Br J Cancer 2000; 82: 966-72.
- Sprowl JA, Ciarimboli G, Lancaster CS, et al. Oxaliplatin-induced neurotoxicity is dependent on the organic cation transporter OCT2. Proc Natl Acad Sci USA 2013: 110: 11199-204.
- Chukyo A, Chiba T, Kambe T, et al. Oxaliplatin-induced changes in expression
  of transient receptor potential channels in the dorsal root ganglion as a
  neuropathic mechanism for cold hypersensitivity. Neuropeptides 2018; 67:
  95-101.
- Areti A, Yerra VG, Naidu VGM, et al. Redox biology oxidative stress and nerve damage: role in chemotherapy induced peripheral neuropathy. Redox Biol 2014; 2: 289-95.
- Palladino SP, Helton ES, Jain P, et al. The human blood-nerve barrier transcriptome. Sci Rep 2017; 7: 17477.
- Richner M, Ferreira N, Dudele A, et al. Functional and structural changes of the blood-nerve-barrier in diabetic neuropathy. Front Neurosci 2019; 13: 1-9
- Maiuolo J, Gliozzi M, Musolino V, et al. The role of endothelial dysfunction in peripheral blood nerve barrier: molecular mechanisms and pathophysiological implications. Int J Mol Sci 2019; 20: 3022.
- 13. Smith EML, Pang H, Cirrincione C, et al. Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy: a randomized clinical trial. JAMA 2014; 309: 1359-67.
- Ibrahim EY, Ehrlich BE. Prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a review of recent findings. Crit Rev Oncol Hematol 2020; 145: 102831

TIRÉS À PART

S. Taïb



Tarifs d'abonnement m/s - 2020

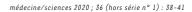
Abonnez-vous

à médecine/sciences

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

Abonnez-vous sur www.medecinesciences.org







> Les protéine kinases ont été rapidement identifiées comme favorisant l'apparition de cancers, à travers leur implication dans la régulation du développement et du cycle cellulaire. Il y a une vingtaine d'années, la mise sur le marché des premiers traitements par inhibiteur de protéine kinase, ouvrait la voie vers de nouvelles solutions médicamenteuses plus ciblées contre le cancer. Depuis, nombreuses sont les données structurales et fonctionnelles acquises sur ces cibles thérapeutiques. Les techniques informatigues ont elles aussi évolué, notamment les méthodes d'apprentissage automatique. En tirant parti de la grande quantité d'informations disponibles aujourd'hui, ces méthodes devraient permettre prochainement la prédiction fine de l'interaction d'un inhibiteur donné avec chaque protéine kinase humaine et donc, à terme, la construction d'outils de profilage de leurs inhibiteurs spécifiques. Cette approche intégrative devrait aider la découverte de solutions thérapeutiques anti-cancéreuses plus efficaces et plus sûres. <

Des mutations ou réarrangements de l'ADN chromosomique sont fréquemment à l'origine de dysfonctionnements cellulaires divers pouvant mener à l'apparition d'un cancer. En effet, les mutations peuvent drastiquement modifier la quantité ou l'activité de certaines protéines liées à la division cellulaire, la différenciation cellulaire ou l'apoptose, et donc modifier le comportement des cellules au sein d'un organisme. Parmi les protéines ayant un fort impact sur la vie cellulaire, les protéine kinases en constituent une famille importante, puisqu'on en recense actuellement 535 chez l'homme [1]. Leur fonction est de moduler l'activité d'autres protéines, notamment d'autres protéine kinases, ou également des phosphatases, très majoritairement par phosphorylation de leurs cibles. Le dérèglement des cascades de régulation où sont impliquées les protéine

## Profilage *in silico* des inhibiteurs de protéine kinases

Victor Reys, Gilles Labesse



CNRS UMR 5048 - Inserm U1054 -Université de Montpellier, 29 rue de Navacelles, 34090 Montpellier Cedex, France. reys@cbs.cnrs.fr labesse@cbs.cnrs.fr

kinases amplifie des signaux aberrants, pouvant stimuler la multiplication anarchique des cellules impactées, et donc l'apparition d'un cancer. Cette particularité fonctionnelle fait des protéine kinases des cibles thérapeutiques de choix.

L'histoire des traitements du cancer par inhibiteur de protéine kinases débute véritablement en 2001, avec la mise sur le marché de l'imatinib (Gleevec®) [2]. Depuis, une recherche très active a abouti à la mise sur le marché de plusieurs dizaines de médicaments ciblant cette famille de protéines [3]. Néanmoins, ces médicaments restent difficiles à concevoir et entraînent régulièrement des effets secondaires, principalement liés aux similarités entre leurs cibles thérapeutiques. À l'inverse, cette similarité favorise la poly-pharmacologie, destinée à cibler simultanément plusieurs protéine kinases impliquées dans la même cascade ou la même régulation cellulaire. Dans les deux cas, une connaissance fine de la spécificité des candidats-médicaments est requise.

#### Le kinome humain

#### Données expérimentales

L'analyse des séquences d'ADN des gènes humains a permis en 2002 d'établir une première liste de 518 protéine kinases qui constitue ce que l'on appelle maintenant le kinome humain [4]. Depuis, cette liste a été augmentée et comprend désormais 535 protéines, qui ont été classées par groupes, familles et sous-familles. Elles possèdent un même repliement et pour la très grande majorité (sauf une cinquantaine de pseudo-kinases) un site de liaison de l'ATP (adénosine triphosphate).

Les deux dernières décennies ont permis de résoudre la structure d'environ 250 de ces protéines, principalement par la diffraction aux rayons X. L'analyse de ces structures a confirmé la similarité globale de ces enzymes, mais a aussi révélé certaines particularités (organisation des domaines associés de type SH2 ([Src Homology 2] ou SH3 [Src Homology 3], multimérisation...). Ces études ont permis la caractérisation fine de leurs interactions avec de petites molécules à visée thérapeutique en vue d'une optimisation rationnelle de ces interactions.

#### Modélisation du kinome

Grâce à ces données expérimentales, il est de nos jours possible de modéliser de manière fiable la très grande majorité des protéine kinases humaines. Une version 3D du kinome est ainsi mise à jour chaque année avec le pipeline @TOME [5], développé par le CBS (Centre de biologie structurale de Montpellier). Cette modélisation permet d'explorer les différentes conformations qu'est susceptible d'adopter chaque protéine kinase et d'identifier ensuite certains des ligands comme des candidats potentiels pour le développement de nouveaux inhibiteurs [6]. Cette première étape de modélisation peut permettre de mieux caractériser le site de liaison de l'ATP et d'identifier par exemple les pseudo-kinases ou les substitutions spécifiques d'acides aminés trouvées dans une protéine kinase particulière (ou dans une famille de protéine kinases). Ces particularités sont importantes pour envisager la conception d'inhibiteurs spécifiques. L'ensemble des modèles produits est d'ores et déjà accessible à la communauté scientifique (http://atome.cbs.cnrs.fr/kinome).

#### Les inhibiteurs de protéine kinases

La majeure partie des inhibiteurs de kinases développés de nos jours sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP. Ils occupent la place de l'ATP au sein de la cible et empêche ainsi son hydrolyse et le transfert d'un phosphate sur une protéine substrat. L'utilisation d'inhibiteurs compétitifs dans le traitement du cancer a d'abord été controversée. Du fait du grand nombre de protéine kinases, de leur importante similarité de séquences (généralement 40-70 % et jusqu'à 90 %), de structure et d'activité, un manque important de spécificité était attendu.

Ce n'est que grâce à la résolution de structures cristallographiques (ex.: complexe Abl¹-imatinib) que l'on a pu identifier certaines conformations particulières qui ne sont pas toutes prises par l'ensemble des protéine kinases humaines, et qui, de ce fait, permettent d'envisager la conception de médications hautement spécifiques. Ainsi, l'imatinib n'inhibe fortement que 4 protéine kinases, dont Abl, mais, par exemple, pas Src [une autre protéine kinase découverte dans un sarcome (src), agissant comme un proto-oncogène] qui lui est pourtant identique à 70 %. Cette information structurale aide la recherche et la conception de nouveaux inhibiteurs. Toutefois, il reste de nombreuses protéine kinases orphelines et de nombreux cancers sans traitement efficace.

Ainsi, de nombreux criblages fonctionnels à large échelle [3, 7] ont été effectués pour identifier de nouveaux composés chimiques inhibant spécifiquement une ou quelques protéine kinases d'intérêt.

Ces données ont permis de mettre en évidence des inhibitions relativement spécifiques pour des châssis moléculaires particuliers. La dérivation de ces petites molécules pour optimiser leur spectre d'activité mais aussi leurs propriétés pharmaceutiques est, depuis, un domaine très actif. Toutefois, la synthèse organique de ces composés et le criblage systématique ne peuvent être envisagés pour tous les composés chimiques théoriquement accessibles. De même, toutes les protéines ne peuvent être produites et testées.

Néanmoins, les informations fonctionnelles acquises pour des milliers de composés et des centaines de protéine kinases complètent déjà utilement les données structurales plus parcellaires. Leur combinaison ouvre des perspectives intéressantes pour une optimisation plus rationnelle des inhibiteurs de protéine kinases.

#### Criblage intégré du kinome

De nombreux outils informatiques sont actuellement développés pour permettre de tirer parti de ces informations structurales et fonctionnelles. Les uns proviennent du domaine de la bio-informatique dite structurale et les autres de la chémo-informatique. Jusqu'à récemment, ces différents outils étaient rarement combinés, mais les progrès de ces techniques informatiques et la grande masse de données militent pour leur plus grande intégration. La fouille intense des données (que l'on peut considérer comme une intelligence artificielle) ouvre aussi de nouvelles possibilités pour extraire des informations plus pertinentes.

Parmi les stratégies modernes de développement d'un médicament, l'amarrage moléculaire et l'analyse de similarité des molécules chimiques sont des options de choix pour les premières étapes de définition d'inhibiteurs spécifiques. Ces deux méthodes virtuelles reposent sur des hypothèses différentes :

- l'amarrage moléculaire recherche des molécules se positionnant adéquatement dans le site actif d'une cible, - la similarité moléculaire recherche des molécules de structures chimiques semblables aux composés connus. Connaissant la structure tridimensionnelle d'une cible thérapeutique, il est possible de prédire les « poses »<sup>2</sup> probables de petites molécules (amarrage) et d'en déduire une affinité théorique (principalement l'enthalpie d'interaction). On peut ainsi classer les complexes a priori stables et trier ainsi les ligands potentiels. Cette information peut permettre de sélectionner les composés prometteurs et d'en guider l'optimisation. Toutefois, cette méthode souffre encore de nombreux faux négatifs et faux positifs. Ce criblage virtuel est souvent suivi d'une évaluation par un expert, étape longue et fastidieuse. Surtout, ces défauts limitent le criblage systématique de grandes

 $<sup>^2</sup>$  Pose : mode d'ancrage d'une petite molécule dans un récepteur macromoléculaire, généré par un algorithme d'amarrage moléculaire.



<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> L'imatinib inhibe l'activité kinase non régulée de bcr/abl, une protéine de fusion qui associe la kinase abl (Abelson proto-oncogen) avec bcr (breakpoint cluster region) en figeant sa conformation. Cette protéine de fusion est codée par un gène de fusion BCR-ABL1 issu d'une translocation réciproque (t9;22) (q34;q11), marquée notamment par l'apparition d'une anomalie chromosomique détectée en particulier dans les cellules de leucémie myéloïde chronique (LMC), le chromosome Philadelphie.

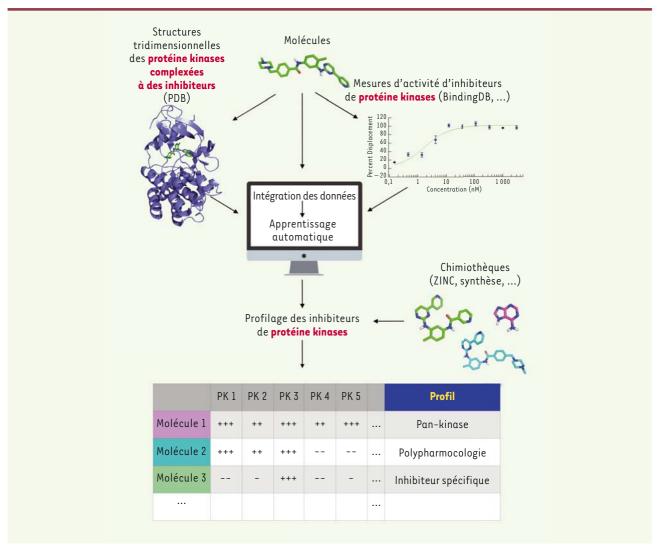


Figure 1. Le nombre des données structurales des protéine kinases et des données fonctionnelles obtenues par des criblages expérimentaux d'inhibiteurs croît depuis une vingtaine d'années. Les avancées techniques informatiques permettent l'intégration de ces différentes données afin d'en extraire des paramètres prédictifs. L'immense masse de données disponibles, combinée avec l'intelligence artificielle, permet des prédictions d'affinités et de « poses » au sein d'une protéine de façon précise. La construction d'outils de profilage des inhibiteurs de protéine kinases pour le kinome humain est la prochaine étape qui augmentera considérablement la vitesse de découverte de solutions thérapeutiques pour le traitement des cancers.

chimiothèques sur l'ensemble des protéine kinases humaines. Cependant, les données récemment acquises (quelques milliers de structures de complexes) permettent la mise en place de pipelines d'analyse faisant appel à l'intelligence artificielle pour mieux détecter les complexes valides et prédire plus finement les affinités correspondantes. C'est dans cette perspective que nous développons une nouvelle version de notre serveur @TOME, combinant maintenant la modélisation comparative des protéine kinases et le criblage virtuel pour accélérer ces analyses.

Les criblages expérimentaux (ci-dessus) sont reproduits in silico pour permettre l'apprentissage des paramètres en vue d'automatiser l'ensemble de ces étapes. De bonnes corrélations avec les données expérimentales suggèrent que l'on pourra prochainement estimer un profil d'activité pour de nombreux composés chimiques sur la majorité du kinome humain (Figure 1).

La comparaison des structures chimiques des petites molécules permet aussi d'extrapoler les propriétés des unes aux autres de manière très complémentaire. Toutefois cette approche requiert une grande masse de données expérimentales portant sur l'affinité ou l'activité. Or celles-ci étaient rarement accessibles aux laboratoires publics. Cet état de fait évolue et l'analyse de larges campagnes de criblage expérimental ouvre la voie à l'utilisation de telles méthodes comparatives par la recherche académique. Il s'agit d'optimiser les outils de comparaison et notamment de choisir les

caractéristiques chimiques à comparer. L'utilisation de méthodes consensus permet d'étendre la pertinence et la robustesse de ces comparaisons. Toutefois, cette recherche de similarité implique de se focaliser sur des séries chimiques déjà étudiées, contrairement à la méthode d'amarrage. À l'inverse, la similarité moléculaire permet des prédictions fonctionnelles plus précises. Par ailleurs, des molécules semblables adoptent régulièrement des modes d'amarrages similaires au sein de cibles similaires. Nous avons donc récemment développé un outil de comparaison des structures chimiques des petites molécules pour l'évaluation des prédictions d'amarrage. Nous allons prochainement tester systématiquement cet outil pour filtrer les criblages virtuels par amarrage en vue d'améliorer leurs prédictions. Des outils d'apprentissage machine permettront d'automatiser grandement ces tris. Enfin, l'ajout de données fonctionnelles devrait permettre d'optimiser simultanément la prédiction des affinités et des « poses » amarrées [8].

#### Conclusion

L'ensemble des données expérimentales (structure, activité) récemment acquises et l'avancée des techniques informatiques permet d'envisager le profilage des inhibiteurs de protéine kinases humaines dans un proche avenir. En effet, il devrait être prochainement possible de prédire le mode d'amarrage et l'affinité d'un composé pour une protéine kinase donnée et guider ainsi la conception de candidats médicaments de manière plus rationnelle. Nous espérons que ces approches intégrées permettront d'aider la découverte de nouvelles solutions thérapeutiques anti-cancéreuses. •

In silico profiling of protein kinases inhibitors

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions la Ligue contre le Cancer pour sa proposition de soumission à médecine/sciences à l'occasion de la Journée « Jeunes et Chercheurs » du 19 octobre 2020.

#### LIENS D'INTÉRÊT

Cette recherche est effectuée dans le cadre d'un contrat doctoral avec l'Université de Montpellier et financée par la Ligue Contre le Cancer (thèse de doctorat de Victor Reys).

#### RÉFÉRENCES

- Wilson LJ, Linley A, Hammond DE, et al. New perspectives, opportunities, and challenges in exploring the human protein Kinome. Cancer Res 2018; 78: 15-29
- 2. Lyseng-Williamson K, Jarvis B. Imatinib. Drugs 2001; 61:1765-76.
- Klaeger S, Heinzlmeir S, Wilhelm M, et al. The target landscape of clinical kinase drugs. Science 2017; 358: eaan4368.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, et al. The protein kinase complement of the human genome. Science 2002; 298: 1912-34.
- Pons JL, Labesse G. @Tome-2: a new pipeline for comparative modeling of protein-ligand complexes. Nucleic Acids Res 2009; 37: W485-91.
- Martin L, Catherinot V, Labesse G. kinDock: a tool for comparative docking of protein kinase ligands. Nucleic Acids Res 2006; 34: W325-9.
- Metz JT, Johnson EF, Soni NB, et al. Navigating the kinome. Nat Chem Biol. 2011; 7: 200-2.
- Schneider M, Pons JL, Bourguet W, Labesse G. Towards accurate highthroughput ligand affinity prediction by exploiting structural ensembles, docking metrics and ligand similarity. Bioinformatics 2020; 36: 160-8.

TIRÉS À PART

V. Reys





#### PTK7 et polarité cellulaire en cancérologie

Les signaux gouvernant la mise en place et le maintien de l'homéostasie des tissus épithéliaux, dont ceux impliqués dans leur architecture, sont des processus finement régulés. La dérégulation de ces cascades de signalisation peut conduire au développement d'un phénotype tumoral. Parmi ces voies, la voie de signalisation WNT<sup>1</sup>, fondamentale pour le développement embryonnaire des vertébrés et invertébrés, est classiguement divisée en deux axes qui se différencient par leur dépendance ou indépendance de la protéine  $\beta$ -caténine. D'une part, la voie canonique WNT/ $\beta$ caténine subit fréquemment des altérations pendant la tumorigenèse, en particulier dans les cancers colorectaux (CCR) [1]. D'autre part, la voie WNT non canonique (indépendante de la  $\beta$ -caténine) est divisée en deux axes principaux : la voie WNT/Ca<sup>2+</sup> utilisant le calcium intracellulaire en tant que messager secondaire et la voie WNT/PCP (polarité cellulaire planaire) initialement décrite chez la drosophile et très conservée au cours de l'évolution, y compris chez l'homme. Les protéines impliquées dans la voie WNT/PCP et leurs complexes moléculaires associés participent au cours du développement embryonnaire à la morphogenèse tissulaire mais également à la migration et à la division cellulaire grâce à des mécanismes moléculaires encore mal compris. De récentes études ont pu mettre en évidence un lien entre la voie WNT/PCP et le cancer, en particulier ceux touchant le sein et le côlon où l'hyperactivation de cette voie est corrélée à un mauvais pronostic et à une résistance aux traitements [2]. Dans ces maladies, certaines cellules tumorales sont le siège d'une réactivation de la voie WNT qui joue un rôle déterminant dans plusieurs étapes du processus cancéreux dont l'autorenouvellement des cellules souches cancéreuses, l'ini-

## Rôle en cancérologie et ciblage du récepteur à activité tyrosine kinase PTK7

Laetitia Ganier<sup>1</sup>, Xavier Morelli<sup>2</sup>, Jean-Paul Borg<sup>1,3\*</sup>



tiation tumorale, le développement métastatique, ainsi que la résistance aux traitements [3].

PTK(protein tyrosine kinase)7 est un récepteur membranaire appartenant à la superfamille des récepteurs à tyrosine kinase (RTK) qui a été ini<sup>1</sup>Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Équipe labellisée Ligue Cell polarity, cell signaling and cancer, Aix-Marseille Université, Inserm, CNRS, Institut Paoli Calmettes, 13009 Marseille, France.

<sup>2</sup>Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Aix-Marseille Université, Inserm, CNRS, Institut Paoli Calmettes, 13009 Marseille, France.

<sup>3</sup>Institut Universitaire de France, Paris, France.

\*Auteur correspondant : jean-paul.borg@inserm.fr

tialement identifié dans les mélanocytes et les carcinomes du côlon [4]. Ce récepteur est considéré comme une pseudokinase du fait de l'absence d'activité enzymatique de son domaine tyrosine kinase. PTK7 peut néanmoins s'hétérodimériser avec des RTK actifs comme le VEGFR (vascular endothelium growth factor) et ROR (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor)2 et jouer un rôle d'amplificateur de signal ou de co-récepteur [4, 5]. PTK7 est un acteur commun des voies de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine et WNT/PCP et peut agir positivement ou négativement sur ces deux voies de signalisation. Par exemple, PTK7 peut interagir directement avec la  $\beta$ -caténine, favorisant la signalisation WNT/ $\beta$ -caténine durant le développement du xénope ou avec ROR2, activant la signalisation WNT/PCP (Figure 1) [5-7].

PTK7 est surexprimé dans de nombreux types de cancers d'origine épithéliale (cancers du sein, du côlon, du poumon, de l'æsophage...), des sarcomes ainsi que des cancers d'origine hématologique. Bien que la plupart des études corrèlent l'expression de PTK7 à un mauvais pronostic, de rares études ont montré un bon pronostic associé à son expression, par exemple dans le cas des cancers gastriques [8]. Dans les leucémies aiguës myéloïdes, PTK7 est surexprimé dans les cellules souches leucémiques et représente un marqueur de mauvais pronostic lié à une augmentation de la résistance aux chimiothérapies (anthracyclines) [9]. Ce phénomène de résistance corrélé à la surexpression de PTK7 a également été décrit pour le cancer du sein [10] et les cancers

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Wnt (prononcez « wint ») est une famille de glycoprotéines riches en cystéines, d'environ 350 acides aminés chacune, sécrétées dans le milieu extracellulaire et impliquées chez tous les animaux dans l'embryogenèse et l'homéostasie des tissus adultes. Wnt est la contraction de Wg, wingless ou « sans ailes » et Int pour « integration site ».

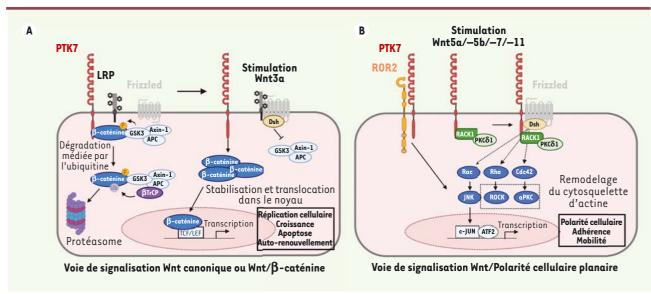


Figure 1. Les différents modes d'action de PTK7 dans la signalisation Wnt. A. Voie de signalisation Wnt canonique : en l'absence de ligands Wnt, la β-caténine est séquestrée à la membrane avec PTK7 et s'associe au complexe Adenomatous polyposis coli (APC), Axine-1 et glycogène synthase kinase 3β (GSK3β) qui va la phosphoryler, induisant sa dégradation par le protéasome. La stimulation par Wnt3a induit une dissociation du complexe, la β-caténine s'accumule alors dans le cytosol et subi une translocation dans le noyau où elle s'associe aux facteurs de transcription LEF(lymphoid enhancer binding factor)/TCF(T-cell specific transcription factor) pour induire l'expression des gènes cibles. B. Voie de signalisation Wnt/PCP : cette signalisation est activée par des ligands tels que Wnt5a, Wnt7 ou Wnt11. PTK7 va participer à la signalisation Wnt/PCP au travers de différentes interactions. D'une part, PTK7 va interagir avec RACK(receptor for activated C kinase)1 qui va recruter l'enzyme PKCδ(protein kinase C delta)1 afin de promouvoir le recrutement de Dishevelled (Dsh) à la membrane. La transduction du signal est alors permise par le récepteur Frizzled et Dsh qui active des petites protéines G (RhoA, Rac), activant à leur tour leurs cibles respectives. PTK7 se lie à Dsh en présence de Frizzled mais peut également se lier à ROR2 conduisant à l'activation de la voie Wnt/PCP via JNK(c-Jun N-terminal kinase) [3, 4].

colorectaux (CCR) [11]. Dans les CCR, la surexpression de PTK7 est associée in vitro à l'induction d'un phénotype pro-migratoire et pro-métastatique et, in vivo, à la survenue de métastases et à une réduction de la survie des patients non métastatiques [2]. Il a également été montré que PTK7 est fortement exprimé sur les cellules initiatrices de tumeurs (TIC, tumor initiating cells) issues de xénogreffes dérivées de patients (ou PDX, patient-derived xenografts) atteints de cancer du sein triple négatif (TNBC), de cancer ovarien (OVCA) et de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) [12]. Il n'a pas encore été montré si ces fonctions favorisant le processus tumoral sont associées à la voie WNT/β-caténine, à la voie WNT/PCP ou à un autre mécanisme encore non élucidé, mais ces données font de PTK7 une cible de choix pour le développement de nouvelles thérapies ciblées.

#### Stratégies thérapeutiques en développement ciblant PTK7

L'absence d'activité enzymatique dans les pseudokinases comme PTK7 rend impossible le développement de stratégies classiques comme les petites molécules chimiques inhibant les fonctions catalytiques de protéines kinases actives. Au même titre que ces dernières, les pseudokinases ont un rôle important dans la signalisation cellulaire et sont souvent dérégulées dans les cancers : leur ciblage constitue donc un défi thérapeutique [13]. Dans le cas de PTK7, deux approches

actuellement développées reposent sur le même principe: cibler les cellules tumorales surexprimant PTK7 et les détruire grâce à un agent thérapeutique vectorisé (Figure 2).

La première approche, en cours de développement clinique, repose sur l'utilisation d'un conjugué anticorps-médicament (ADC, antibody-drug conjugate), le cofétuzumab pélidotine. Les ADC sont des molécules anticancéreuses ayant une action ciblée permettant de combiner la sélectivité tumorale des anticorps avec la puissance des petites molécules cytotoxiques afin d'en limiter les effets indésirables bien connus grâce au ciblage des cellules tumorales, permettant également une diminution de la dose injectée. L'ADC en développement est constitué d'un anticorps monoclonal (AcM) anti-PTK7 humanisé conjugué à l'auristatine, un puissant agent antimitotique inhibant la division cellulaire par blocage de la polymérisation de la tubuline, via un linker valine-citrulline (« vc »). Les études précliniques menées chez la souris ont permis d'observer une régression importante de la masse tumorale dans les xénogreffes issues de patients TNBC, OVCA et NSCLC, avec une efficacité supérieure ou égale à celle obtenue avec

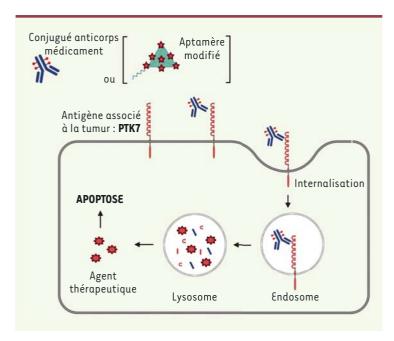


Figure 2. Stratégies thérapeutiques en développement ciblant PTK7. Ces stratégies reposent sur un principe consistant à cibler les tumeurs surexprimant PTK7, par ailleurs peu exprimé dans les tissus sains. Conjugué anticorps-médicament (ADC) et aptamère modifié présentent une bonne affinité et spécificité pour PTK7 et permettent une vectorisation de molécules thérapeutiques directement dans les cellules tumorales afin d'y induire une mort cellulaire par apoptose. Pour cela, la fixation de l'ADC ou de l'aptamère à PTK7 va induire une internalisation du récepteur par un mécanisme d'endocytose. Le clivage de l'ADC (clivage du linker et/ou dégradation de l'anticorps accompagné de la libération du médicament, ici l'auristatine) ou de l'ADN tétraèdre (contenant la doxorubicine) associé à l'aptamère se produit au cours du trafic dans la voie endo-lysosomale. Cela conduit à la diffusion des molécules bioactives dans le cytosol où les effets cytotoxiques surviennent. Certaines molécules pourront diffuser du cytosol vers le noyau afin d'accéder à leur cible (ADN par exemple).

des chimiothérapies de référence, ainsi qu'une réduction spécifique de la population de TIC. Cet ADC anti-PTK7 pourrait également présenter un effet anti-angiogénique et stimuler le système immunitaire du fait d'une expression de PTK7 par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et par les cellules dendritiques. Une première étude clinique de phase I (protocole NCT02222922) a été réalisée afin d'évaluer la sécurité et tolérabilité du cofétuzumab pélidotine chez des patients présentant des TNBC, OVCA et NSCLC avancés et résistants aux chimiothérapies standards. Les données préliminaires de l'étude présentées lors de la conférence internationale American Society of Clinical Oncology (ASCO) en 2018 ont montré une activité anti-tumorale prometteuse ainsi qu'un profil de sécurité gérable chez ces patients. Deux nouvelles études cliniques sont actuellement en cours. Une première étude, dite de phase I associant le cofétuzumab pélidotine au gédatolisib, un inhibiteur des voies de signalisation PI3K(phosphoinositide 3-kinase)/mTOR(mammalian target of rapamycin), consiste à évaluer la sécurité chez des patientes atteintes de TNBC métastatiques. La deuxième étude, dite de phase Ib, évalue l'efficacité et la sécurité du traitement chez des patients NSCLC dont les tumeurs présentent spécifiguement une forte expression de PTK7 [12].

Une deuxième stratégie qui repose sur l'utilisation d'un aptamère ou « anticorps chimique » est également en développement, mais les preuves d'efficacité *in vivo* n'ont pas encore été démontrées. Un aptamère est un oligonucléotide synthétique (ADN simple brin ou ARN) capable de fixer un ligand spécifique. Tout comme l'anticorps anti-PTK7 transformé en ADC par couplage avec l'auristatine, l'ADN de l'aptamère Sgc8 spécifique de PTK7 a été modifié par l'association d'un ADN tétraèdre afin de transporter des molécules de doxorubicine (une anthracycline) spécifiquement au sein de cellules de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) exprimant PTK7. Cette stratégie présente des avantages par rapport aux anticorps monoclonaux tels qu'une

grande stabilité, une meilleure compatibilité et une production chimique rapide ce qui fait des aptamères des candidats prometteurs pour le développement de nouvelles thérapies ciblées [14].

Bien que les premiers résultats cliniques de l'ADC aient confirmé que PTK7 constitue une cible de choix pour le développement de nouvelles thérapies ciblées, il sera important de proposer dans le futur des voies alternatives à ces stratégies, en particulier capables de bloquer sélectivement la fonction de PTK7.

#### Approches alternatives pour le ciblage de PTK7

Les deux stratégies citées ci-dessus n'utilisent en fait que la capacité de PTK7 à être surexprimé par les tumeurs. Malgré l'absence d'activité catalytique de PTK7, il est cependant possible de développer des composés s'attaquant à l'expression ou à la fonction du récepteur (fixation d'un ligand, dimérisation avec un autre récepteur) et d'ainsi spécifiquement intervenir sur ses propriétés anti-apoptotique et pro-invasive.

La première approche repose sur l'utilisation de petites molécules chimiques capables de se fixer de façon orthostérique sur le site de liaison à l'ATP (adénosine triphosphate) ou de façon allostérique (à distance du site de liaison à l'ATP) à une protéine kinase cible. Cette liaison pourra alors interférer avec la dimérisation de PTK7, la fixation à l'un de ses ligands, le stabiliser dans une conformation inactive ou dans un complexe inactif [13]. Au sein de notre laboratoire, nous expérimentons le développement de molécules chimiques inhibitrices

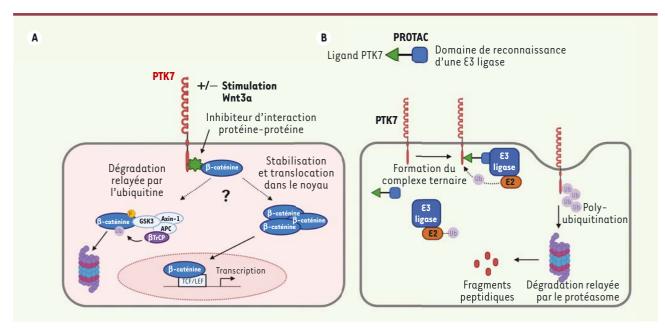


Figure 3. Approches alternatives ciblant PTK7 développées au Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille. A. L'inhibition de l'interaction PTK7/ $\beta$ -caténine pourrait favoriser la dégradation de la  $\beta$ -caténine, inhiber sa voie de signalisation et donc avoir un rôle bénéfique en cancérologie; cependant, elle pourrait favoriser sa stabilisation dans le cytosol et activer la signalisation renforçant ses propriétés tumorigéniques. B. Mécanisme d'action: les PROTAC sont de petites molécules chimiques bi-fonctionnelles qui facilitent le transfert de l'ubiquitine d'un complexe d'ubiquitine  $\xi 3$  ligase à un substrat spécifique, ici PTK7, afin de permettre sa reconnaissance et sa dégradation par le protéasome. La dégradation de PTK7 pourra directement inhiber ses propriétés anti-apoptotique et pro-invasive.

de l'interaction entre PTK7 et la  $\beta$ -caténine. Afin d'identifier ces molécules, nous avons mis en place une stratégie de criblage utilisant la technologie NanoBRET. Cette technologie permet une détection sensible et reproductible des interactions protéiques in cellulo sans altérer l'environnement membranaire du récepteur. Les molécules identifiées seront utilisées dans les TNBC et CCR de mauvais pronostic pour bloquer la formation du complexe PTK7/ $\beta$ -caténine et mesurer leur efficacité in vitro et in vivo. Dans le cas où l'inhibition de cette interaction présenterait un intérêt, les composés sélectionnés pourront être développés en molécules bioactives candidat-médicament en tant qu'inhibiteurs d'interactions protéine-protéine, une approche récemment développée avec succès dans d'autres situations (inhibiteurs de MDM2/P53, de bromodomaines...) (Figure 3A).

Une deuxième approche prometteuse consiste à induire la dégradation de la protéine cible grâce à une molécule chimèrique ciblant la protéolyse (PROTAC, proteolysis targeting chimera) ou par un marquage hydrophobe (HyT, hydrophobic tagging). Ces stratégies sont particulièrement intéressantes pour cibler les protéines non sensibles aux changements conformationnels ou sans activité enzymatique comme PTK7. C'est pourquoi nous expérimentons aussi le développement d'une approche PROTAC qui repose sur l'utilisation de petites molécules bifonctionnelles se liant d'une part à une protéine cible (oncoprotéine par exemple) et, d'autre part, au système ubiquitine-protéasome (UPS) grâce au recrutement d'une ubiquitine ligase. Le système UPS constitue un système multi-enzymatique permettant une dégradation régulée des protéines cellulaires. L'utilisation du PROTAC va permettre

de reprogrammer ce système afin d'induire la dégradation de la protéine cible par le protéasome (Figure 3B). Pour se faire, nous avons mis en place une deuxième stratégie de criblage in vitro par « thermal shift assay » afin d'identifier des composés se liant spécifiquement au domaine kinase de PTK7. Enfin, la stratégie HyT consiste à coupler une étiquette hydrophobe (une molécule bi-fonctionnelle comprenant une partie très hydrophobe et un linker servant au couplage) à la protéine cible afin d'imiter un état partiellement dénaturé qui engage alors la machinerie de contrôle cellulaire pour induire sa dégradation par le protéasome [13]. Des petites molécules chimiques peuvent également conduire à la dégradation de protéines cibles de façon indirecte. Cette troisième approche repose sur l'utilisation de composés induisant une inhibition sélective des processus cellulaires permettant la maturation et le trafic des protéines. Cette stratégie est particulièrement intéressante pour les protéines membranaires qui présentent de nombreuses étapes de maturation lors de leur passage dans la voie sécrétoire qui les conduira à la membrane. Par exemple, on pourrait utiliser des inhibiteurs de Sec61 induisant un blocage spécifique de l'insertion des protéines membranaires comme PTK7 dans la membrane du réticulum endoplasmique et conduisant à la dégradation de ces protéines [13].

Enfin, la dernière approche repose sur l'utilisation d'AcM ciblant la partie extracellulaire de PTK7, empêchant sa dimérisation ou son hétérodimérisation avec un corécepteur (par exemple ROR2) ou avec un ligand (par exemple WNT3A ou WNT5A). Dans le cadre de cette approche pourront également être développés des formats d'anticorps bispécifiques « Fab-like » (bsFab) permettant de bénéficier de la spécificité de liaison de deux AcM afin de bloquer une interaction protéine-protéine [13].

Un autre domaine d'application de ces anticorps bispécifiques consiste à associer le ciblage direct des cellules tumorales (via la reconnaissance d'antigènes tumoraux, dont PTK7), et la reconnaissance de récepteurs activateurs exprimés à la surface des cellules effectrices (lymphocytes T, cellules natural killer) du système immunitaire. Ce dernier joue un rôle-clé dans la réponse anti-tumorale, mais son action est souvent freinée par des mécanismes mis en place par les tumeurs et leur microenvironnement afin de perturber l'action des effecteurs immuns et de rendre l'hôte permissif au développement tumoral. La révolution de l'immunothérapie ouvre de nouvelles perspectives pour réinitialiser les défenses immunitaires du patient et offrir de nombreuses options de ciblage des cellules tumorales, en particulier en augmentant le recrutement de cellules immunitaires effectrices spécifiquement au sein de la tumeur. Cette approche a notamment été lancée pour cibler le récepteur ROR1, une pseudokinase de la voie WNT, à l'aide des technologies CAR(chimeric antigen receptor)-T cells et BiTE(bispecific T-cell engager) [15]. Les CAR-T cells (lymphocytes T porteurs d'un récepteur chimérique) sont des lymphocytes T modifiés génétiquement et exprimant un récepteur chimérique conçu pour reconnaître un antigène associé aux tumeurs (TAA, tumor-associated antigen), membranaire. La technologie BiTE constitue une classe d'AcM bispécifiques qui se lient d'une part aux lymphocytes T via la molécule CD3 et, d'autre part, au TAA (ex : le blinatumomab, anti-CD3 x anti-CD192). Ces approches seraient tout à fait adaptées au ciblage de cellules tumorales surexprimant PTK7. Bien que l'inhibition fonctionnelle de RTK de la famille des pseudokinases comme PTK7 constitue un challenge du fait de l'absence d'activité catalytique mais également en raison de leur mode d'action encore mal compris, il est évident que ces récepteurs constituent des cibles thérapeutiques prometteuses. Différentes stratégies thérapeutiques sont actuellement disponibles et leur développement pourrait permettre la conception de nouveaux candidats-médicaments capables de cibler ces récepteurs surexprimés dans de nombreux cancers et associés à un mauvais pronostic. ◊

Role in oncology and targeting of the PTK7 tyrosine kinase receptor

#### REMERCIEMENTS

Le laboratoire de JPB est soutenu par la Ligue Nationale Contre le Cancer (équipe labellisée 2019) et l'Institut Paoli-Calmettes. LG est financée pendant sa thèse par la Ligue Nationale Contre le Cancer. JPB est membre sénior de l'Institut Universitaire de France.

#### LIENS D'INTÉRÊT

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

#### RÉFÉRENCES

- 1. Shang S, Hua F, Hu ZW. The regulation of beta-catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget* 2017; 8: 33972-89.
- Lhoumeau AC, Martinez S, Boher JM, et al. Overexpression of the promigratory and prometastatic PTK7 receptor is associated with an adverse clinical outcome in colorectal cancer. PLoS One 2015; 10: e0123768.
- Daulat AM, Borg JP. Wnt/planar cell polarity signaling: new opportunities for cancer treatment. Trends Cancer 2017; 3:113-25.
- Peradziryi H, Tolwinski NS, Borchers A. The many roles of PTK7: a versatile regulator of cell-cell communication. Arch Biochem Biophys 2012; 524: 71-6.
- Martinez S, Scerbo P, Giordano M, et al. The PTK7 and ROR2 protein receptors interact in the vertebrate WNT/planar cell polarity (PCP) pathway. J Biol Chem 2015: 290: 30562-72.
- Puppo F, Thome V, Lhoumeau AC, et al. Protein tyrosine kinase 7 has a conserved role in Wnt/beta-catenin canonical signalling. EMBO Rep 2011; 12:47-9
- Lu X, Borchers AG, Jolicoeur C, et al. PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. Nature 2004; 430: 93-8.
- Lin Y, Zhang LH, Wang XH, et al. PTK7 as a novel marker for favorable gastric cancer patient survival. J Surg Oncol 2012; 106: 880-6.
- Prebet T, Lhoumeau AC, Arnoulet C, et al. The cell polarity PTK7 receptor acts as a modulator of the chemotherapeutic response in acute myeloid leukemia and impairs clinical outcome. Blood 2010; 116: 2315-23.
- Ataseven B, Angerer R, Kates R, et al. PTK7 expression in triple-negative breast cancer. Anticancer Res 2013; 33: 3759-63.
- Meng L, Sefah K, O'Donoghue MB, et al. Silencing of PTK7 in colon cancer cells: caspase-10-dependent apoptosis via mitochondrial pathway. PLoS One 2010: 5: e14018.
- Damelin M, Bankovich A, Bernstein J, et al. A PTK7-targeted antibody-drug conjugate reduces tumor-initiating cells and induces sustained tumor regressions. Sci Transl Med 2017; 9.
- Kung JE, Jura N. Prospects for pharmacological targeting of pseudokinases. Nat Rev Drug Discov 2019; 18: 501-26.
- 14. Liu M, Ma W, Li Q, et al. Aptamer-targeted DNA nanostructures with doxorubicin to treat protein tyrosine kinase 7-positive tumours. Cell Prolif 2019 · 52 · e12511
- 15. Karvonen H, Perttila R, Niininen W, et al. Targeting Wnt signaling pseudokinases in hematological cancers. Eur J Haematol 2018; 101: 457-45

#### TIRÉS À PART

L. Ganier





Abonnez-vous à médecine/sciences

www.medecinesciences.org

 $<sup>^2</sup>$  CD19 est une molécule exprimée par une très grande partie des lymphocytes B mais aussi très fortement par les lymphocytes B tumoraux (notamment dans les leucémies).



Selon les dernières estimations du CIRC (Centre international de recherche sur le cancer) 18,1 millions de nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués dans le monde en 2018. Malgré les progrès thérapeutiques considérables de ces dernières années, avec le développement des thérapies ciblées anti-cancéreuses et des immunothérapies, l'émergence de résistance à ces traitements constitue un problème majeur dans la prise en charge des patients atteints de cancer. L'identification de nouvelles cibles pharmacologiques est nécessaire pour retarder, voire contourner cette résistance, et améliorer la prise en charge thérapeutiques des patients. CD147 (cluster of differentiation 147) est une glycoprotéine surexprimée dans de nombreux types de cancers et cette surexpression est associée à un mauvais pronostic. Initialement connue sous le nom de EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) pour son rôle dans la régulation des MMP (matrix metalloproteinases), CD147 est désormais décrit comme étant impliqué dans la régulation de plusieurs autres mécanismes, notamment, l'angiogenèse tumorale et la modulation du métabolisme énergétique, et ce, en raison de sa capacité à réguler différents partenaires moléculaires impliqués dans la progression tumorale. Une meilleure compréhension de son rôle dans la régulation des processus tumoraux a permis de valider ce récepteur membra-

#### Structure de CD147

pour le traitement des cancers.

CD147 est une glycoprotéine transmembranaire de 269 acides aminés. Elle est composée d'une séguence signal, d'une région extracellulaire contenant deux domaines immunoglobulines-like, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique. Deux monomères de CD147 peuvent s'associer pour former un dimère et cette association peut se faire en cis à la surface d'une même cellule mais également en trans entre cellules tumorales et cellules endothéliales ou fibroblastes du microenvironnement.

naire comme cible pharmacologique très attractive

## **CD147**: rôle et ciblage thérapeutique dans les cancers

Alexandra Landras<sup>1</sup>, Samia Mourah<sup>1,2</sup>



<sup>1</sup>Université de Paris, Inserm UMRS 976, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris, France.

<sup>2</sup>Département de Pharmacologie et Génomique des Tumeurs, APHP, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris, France.

alexandra.landras@inserm.fr samia.mourah@aphp.fr

Trois sites de glycosylations sont retrouvés dans le domaine extracellulaire, conférant à CD147 un poids moléculaire variable. Enfin, sa glycosylation s'avère nécessaire pour sa fonction, les formes non glycosylées n'étant pas capables d'induire la production de MMP [1].

#### Rôles de CD147 dans la progression tumorale

CD147 est surexprimé par les cellules tumorales, et cette surexpression constitue un facteur de mauvais pronostic dans de nombreux cancers solides ainsi que dans les hémopathies malignes. C'est un promoteur de l'invasion et du potentiel métastatique des cellules cancéreuses via son rôle d'inducteur des MMP, enzymes capables de dégrader les composants de la matrice extracellulaire, permettant l'invasion des cellules cancéreuses. CD147 interagit avec les fibroblastes environnants et permet de stimuler la production des MMP-1, MMP-2, MMP-3 et de MT1-MMP (MMP-14) [2]. En plus d'induire une surexpression de ces différentes MMP, CD147 est responsable de l'activation de certaines de ces MMP, les MMP-2, ce qui favorise le pouvoir métastatique des cellules cancéreuses, notamment les cellules de mélanome [3]. Dans le cancer du sein, l'augmentation de l'expression de MMP-9 est dépendante de celle de CD147. En effet, lorsque l'expression de CD147 est diminuée, la production de MMP-9 est fortement inhibée [4]. Le rôle de CD147 dans la modulation du microenvironnement tumoral a été souligné par la démonstration de son action inductrice d'un autre système protéolytique de la matrice extracellulaire, le système sérine protéase uPA/uPAR/PAI-1. Cette régulation observée in vitro et in vivo dans différents modèles de cancers, notamment les cancers du sein et du mélanome, démontre l'importance du rôle de CD147 dans l'invasion tumorale et le potentiel métastatique [5].

En plus de son rôle de promoteur de l'invasion tumorale, CD147 régule l'angiogenèse tumorale, indépendamment de son rôle d'inducteur

des MMP, stimulant ainsi la progression métastatique. Des travaux en condition normoxique (concentration normale d' $^{\circ}0_2$  dans le sang) sur les cellules endothéliales ont permis de démontrer que CD147 exogène était capable d'induire une augmentation de la production du VEGF (vascular endothelial growth factor) et de l'expression de son principal récepteur, le VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor 2), par un mécanisme impliquant le facteur de transcription HIF-2 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 2 alpha), contribuant ainsi à une induction de l'angiogenèse in vitro et in vivo [6]. Ce mécanisme de régulation du système VEGF/VEGFR-2/HIF-2 $\alpha$  par CD147 a également été observé dans les cellules tumorales, exacerbant ainsi leurs propriétés malignes de prolifération, de survie et d'invasion [7].

Un autre rôle majeur de CD147 est son implication dans le métabolisme tumoral. Les cellules cancéreuses utilisent fréquemment la glycolyse pour augmenter la génération de molécules d'ATP (adénosine triphosphate). Du fait de son interaction avec les MCT (monocarboxylate transporter) et de son rôle de protéine chaperonne, CD147 contrôle la stabilité et la localisation fonctionnelle des transporteurs MCT, augmentant la glycolyse des cellules tumorales via l'exportation du lactate [8].

# Implication de CD147 dans la résistance aux traitements anti-cancéreux

L'efficacité des traitements anticancéreux est limitée par la résistance, qu'elle soit primaire, lorsque le traitement est inefficace d'emblée, ou acquise au cours du temps. L'identification de facteurs associés à la résistance représente un enjeu majeur, et permettrait de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques adaptées. Plusieurs études montrent la surexpression de CD147 dans les cellules résistantes aux traitements de chimiothérapie, ainsi que son implication dans la résistance à certains traitements anticancéreux.

Dans le cancer de l'ovaire, le complexe CD147/CD98 est surexprimé et est responsable de la résistance au cisplatine. En effet, ce complexe interagit avec les MCT et permet le relargage du cisplatine dans le milieu extracellulaire. L'inhibition de ce complexe permet de restaurer la sensibilité au cisplatine, avec une accumulation intracellulaire de celui-ci [9].

Des données cliniques ont montré que la surexpression tumorale de CD147 était associée à la résistance, chez des patients atteints d'un cancer du rein et traités par le sunitinib, un inhibiteur de nombreux récepteurs à activité tyrosine kinase, notamment des récepteurs des facteurs de croissance endothéliale vasculaire (VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3) ainsi que des récepteurs des facteurs de croissance plaquettaire (PDGFR $\alpha$  et PDGFR $\beta$ ) [10].

La sensibilité aux chimiothérapies dans le sarcome de Kaposi est proportionnelle à l'expression de CD147, de Lyve-1 (*lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1*) et du transporteur ABCG2 (*ATP-binding cassette super-family G member 2*). CD147 induit une résistance au traitement, via une production accrue du transporteur ABCG2, qui a été impliqué dans l'efflux des agents anticancéreux vers l'extérieur de la cellule [11].

#### Stratégies d'inhibition de CD147

La surexpression de CD147 dans les cellules cancéreuses, son rôle dans le processus tumoral ainsi que son implication dans la résistance aux traitements, font de cette molécule une cible thérapeutique intéressante; à ce jour, plusieurs stratégies ciblant CD147 sont en cours d'évaluation.

Un anticorps monoclonal (AcM) (MEM-M6/1), qui bloque l'interaction de CD147 avec le transporteur MCTl, permet d'induire une mort cellulaire par nécrose de cellules de mélanome et de cancer du côlon, sans pour autant avoir d'impact sur l'intégrité des fibroblastes. La mort cellulaire observée semble être induite par une diminution de la glycolyse et une diminution de la production d'ATP [12]. Le Licartin, un AcM anti-CD147 (le métuximab) couplé à un isotope radioactif (1131), a été approuvé par la « China State Food and Drug Administration » (SFDA, numéro d'enregistrement S20050039) pour le traitement du cancer du foie. Récemment, l'utilisation de cet agent a permis de sensibiliser les cellules tumorales du pancréas à deux agents de chimiothérapie, la gemcitabine et le géfitinib [13]. Dans le cancer du foie, la molécule AC-73, une petite molécule qui inhibe la dimérisation de CD147, a montré son efficacité en diminuant la production des MMP-2, provoquant une perte de la mobilité et de la capacité invasive des cellules tumorales [14]. AC-73 a également montré son efficacité dans la leucémie myéloïde aiguë, en inhibant la prolifération des cellules leucémiques et en induisant un mécanisme d'autophagie. De plus, l'utilisation de cette molécule a permis une augmentation de la sensibilité des cellules cancéreuses à la cytarabine et au trioxyde d'arsenic (Figure 1) [15].

La compréhension des mécanismes conduisant à la malignité des cellules tumorales par la modulation de processus cruciaux tels que l'invasion, les métastases, le métabolisme, l'angiogenèse, mais également ceux impliqués dans l'émergence de la résistance, est primordiale pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Au cours des dernières années, les travaux émergeants de notre groupe ont montré que CD147 était capable d'induire : 1) la production de protéases (MMP et uPA) par les cellules stromales, augmentant le potentiel invasif des cellules tumorales et 2) l'angiogenèse, en régulant le VEGF et son principal récepteur, le VEGFR-2 via l'activation de HIF-2 $\alpha$ , dans les cellules endothéliales. Plus récemment, nous avons rapporté cette régulation dans les cellules tumorales, avec des conséquences sur leurs propriétés malignes, suggérant qu'il s'agit d'un mécanisme plus général. Nos

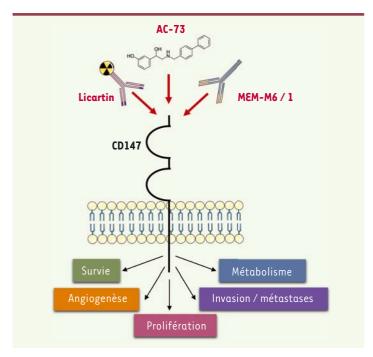


Figure 1. Rôle de CD147 dans le processus tumoral et stratégies de son inhibition. Le rôle de CD147 dans la progression tumorale fait intervenir plusieurs facteurs, notamment, les MMP, le système uPA/uPAR, les MCT, et le système VEGF/VEGFR-2. Plusieurs stratégies ciblant CD147 sont en cours d'évaluation, préclinique (AC-73 et MEM-M6/1) et clinique (Licartin). AC-73 est une petite molécule capable d'empêcher la dimérisation de CD147 alors que MEM-M6/1 et le Licartin sont des anticorps bloquants de CD147.

récents travaux ont permis d'identifier un tout nouveau mécanisme d'action de CD147, celui d'être un corécepteur du VEGFR2, capable de réguler son activation.

Les données de notre groupe et d'autres chercheurs mettent en évidence l'importance de CD147 dans la progression tumorale; les premières approches de son inhibition sont prometteuses et confirment le potentiel thérapeutique de son ciblage dans les cancers, en particulier dans les cancers où les cellules tumorales surexpriment cette glycoprotéine. L'objectif de notre projet est d'évaluer les effets pharmacologiques de molécules inhibitrices de CD147 dans des modèles tumoraux, notamment de mélanomes. La caractérisation pharmacologique de ces inhibiteurs permettra de compléter cette évaluation et d'amener les plus efficaces d'entre eux aux études pharmacologiques précliniques, avec pour objectif ultime de valider le potentiel thérapeutique du ciblage de CD147 dans le traitement du cancer (Figure 1). •

CD147: role and therapeutic targeting of a promising molecule in the treatment of cancers

#### LIENS D'INTÉRÊT

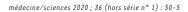
Les auteures déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

- Tang W, Chang SB, Hemler ME. Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1. Mol Biol Cell 2004; 15: 4043-50.
- Caudroy S, Polette M, Nawrocki-Raby B, et al. EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells. Clin Exp Metastasis 2002; 19: 697-702
- Kanekura T, Chen X, Kanzaki T. Basigin (cd147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int J Cancer* 2002; 99:520-8.
- Rucci N, Millimaggi D, Mari M, et al. Receptor activator of NF-kB ligand enhances breast cancer-induced osteolytic lesions through upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147. Cancer Res 2010; 70: 6150-60.
- Quemener C, Gabison EE, Naïmi B, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer up-regulates the urokinase-type plasminogen activator system promoting tumor cell invasion. Cancer Res 2007; 67: 9-15.
- Bougatef F, Quemener C, Kellouche S, et al. EMMPRIN promotes angiogenesis through hypoxia-inducible factor-2 -mediated regulation of soluble VEGF isoforms and their receptor VEGFR-2. Blood 2009; 114: 5547-56.
- Bougatef F, Menashi S, Khayati F, et al. EMMPRIN promotes melanoma cells malignant properties through a HIF-2alpha mediated up-regulation of VEGF-receptor-2. PLoS One 2010; 5: e12265.
- Le Floch R, Chiche J, Marchiq I, et al. CD147 subunit of lactate/H\* symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108: 16663-8.
- Yang H, Zou W, Li Y, et al. Bridge linkage role played by CD98hc of anti-tumor drug resistance and cancer metastasis on cisplatin-resistant ovarian cancer cells. Cancer Biol Ther 2007; 6:942-7.
- Sato M, Nakai Y, Nakata W, et al. EMMPRIN promotes angiogenesis, proliferation, invasion and resistance to sunitinib in renal cell carcinoma, and its level predicts patient outcome. PLoS One 2013; 8: e74313.
- Qin Z, Dai L, Bratoeva M, et al. Cooperative roles for emmprin and LYVE-1 in the regulation of chemoresistance for primary effusion lymphoma. Leukemia 2011; 25: 1598-609.
- Baba M, Inoue M, Itoh K, et al. Blocking CD147 induces cell death in cancer cells through impairment of glycolytic energy metabolism. Biochem Biophys Res Commun 2008; 374: 111-6.
- Fan XY, He D, Sheng CB, et al. Therapeutic anti-CD147 antibody sensitizes cells to chemoradiotherapy via targeting pancreatic cancer stem cells. Am J Transl Res 2019; 11: 3543-54.
- 14. Fu Z, Wang L, Cui H, et al. A novel small-molecule compound targeting CD147 inhibits the motility and invasion of hepatocellular carcinoma cells. Oncotarget 2016; 7: 9429-47.
- 15. Spinello I, Saulle ε, Quaranta MT, et al. The small-molecule compound AC-73 targeting CD147 inhibits leukemic cell proliferation, induces autophagy and increases the chemotherapeutic sensitivity of acute myeloid leukemia cells. Haematologica 2019; 104: 973-85.

TIRÉS À PART

A. Landras





#### Succès et limites de l'immunothérapie du cancer

De nouvelles thérapies qui favorisent l'immunité antitumorale ont été récemment mises au point. Ces approches se sont concentrées sur l'amélioration des réponses des lymphocytes T, soit en ciblant les voies inhibitrices avec des points de contrôle immunitaires (immune checkpoint inhibitor, ICI) ou en ciblant les voies d'activation, comme dans le cas des cellules T exprimant des récepteurs antigéniques chimériques (CAR-T cells) ou des anticorps bispécifiques. Bien que ces thérapies aient connu des succès sans précédent, seule une minorité de patients atteints de cancer bénéficient de ces traitements, soulignant la nécessité d'identifier de nouvelles cellules et molécules qui pourraient être exploitées dans la prochaine génération de l'immunothérapie. Étant donné le rôle important des réponses immunitaires innées dans l'immunité, l'exploitation de ces réponses ouvre de nouvelles possibilités pour un contrôle durable des tumeurs. Les cellules natural killer (NK) sont des lymphocytes du système immunitaire inné capables de tuer des cellules tumorales. Les cellules NK sécrètent également des cytokines qui participent à l'orientation de la réponse immunitaire adaptative [1].

En outre, la diminution de l'expression des molécules HLA (human leukocyte antigen) de classe I et la perte de l'expression de la microglobuline  $\beta 2$  par les cellules tumorales, deux signaux activateurs pour les cellules NK, ont été décrits comme des mécanismes de résistance à la lyse après les thérapies ICI ciblant les lymphocytes T CD8 $^{\star}$  [2]. Les tumeurs présentant de telles caractéristiques pouraient être des cibles idéales dans les thérapies engageant les cellules NK.

L'objectif de cette revue est de résumer les stratégies actuelles ciblant les cellules NK et leurs voies de signalisation pour proposer de nouvelles pistes en immunothérapie du cancer.

# Importance des cellules NK dans la réponse anti-tumorale

Dans de nombreuses études précliniques, les cellules NK ont montré une capacité à limiter la propagation

## Une piste en immunothérapie du cancer

# Cibler la signalisation des cellules NK

Pierre-Louis Bernard<sup>1</sup>, Vladimir Laletin<sup>1</sup>, Sonia Pastor<sup>1</sup>, Jacques A. Nunès<sup>1,\*</sup>, Geoffrey Guittard<sup>1,\*</sup>



<sup>1</sup>Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, CRCM, Institut Paoli-Calmettes, Inserm, CNRS, Aix Marseille Université, Marseille, France. \*Auteurs correspondants: jacques.nunes@inserm.fr geoffrey.guittard@inserm.fr

métastatique des tumeurs expérimentales et spontanées [3]. En clinique, l'activité des cellules NK a été inversement corrélée à l'incidence du cancer, et plusieurs études montrent que l'infiltration des cellules NK dans les cancers du poumon, gastrique et les carcinomes colorectaux sont associés à de meilleurs résultats pour les patients [4].

Il existe cependant des déficits NK (baisse d'expression de récepteurs activateurs et des fonctions NK) observés dans divers types de cancers, à l'origine de l'échappement tumoral [5]. Différentes stratégies d'immunothérapie visent à optimiser les fonctions anti-tumorales des cellules NK par l'administration d'anticorps ou de cytokines agissant sur des récepteurs de surface qui vont accroître leur signalisation.

#### Stimuler les voies de signalisations cytokiniques

L'administration in vivo de cytokines, telles que l'IL(interleukine)-2 et l'IL-15, importantes dans l'activation et l'expansion des cellules NK, est majoritairement employée en clinique. L'administration d'IL-2 a été approuvée pour le traitement des patients atteints de carcinome rénal et de mélanome. L'efficacité de ce traitement nécessite cependant de fortes doses qui sont responsables d'effets secondaires majeurs [6]. L'utilisation de l'IL-15 semble représenter une meilleure option thérapeutique car, outre le fait qu'elle cible les cellules NK, cette cytokine favorise la mise en place d'une réponse T mémoire [7]. Son effet est en cours d'investigation clinique (NCT01727076) chez des patients atteints de différents types de cancers.

D'autres cytokines régulant l'activité des cellules NK sont également en cours d'investigation : la combinaison d'IL-12 et d'IL-18 favorise la persistance des cellules NK, alors que l'IL-21 protège de l'apparition de l'épuisement cellulaire (Figure 1). Ces traitements ciblent

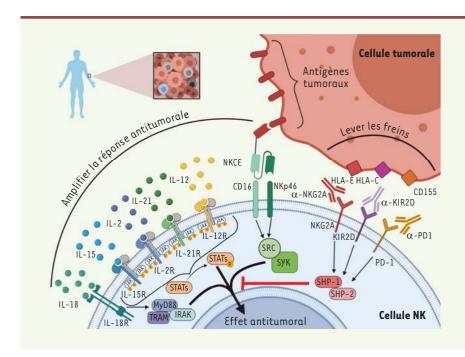


Figure 1. Rétablir la fonction des cellules NK in vitro. Les cellules NK peuvent être stimulées et leur nombre amplifié via l'administration de cytokines telles que certaines interleukines (IL-2, IL-15, IL-18 et IL-21). En se fixant sur leurs récepteurs, ces cytokines entraînent la phosphorylation spécifique de protéines de la famille des STAT, ce qui conduit in fine à l'amélioration de la réponse anti-tumorale. Mais d'autres molécules de signalisation peuvent être engagées : par exemple, l'engagement du récepteur de l'IL-18 conduit à l'activation d'une voie dépendante du complexe MyD88-TRAM-IRAK. Des anticorps permettant de rediriger les cellules NK contre les cellules tumorales ont été récemment développés, c'est le cas notamment des anticorps tri-spécifiques NKCE (NK cell engager) dont deux domaines recon-

naissent des récepteurs activateurs exprimés par les cellules NK (NKp46, CD16a) et les activent, déclenchant la voie SRC-SYK-dépendante (protéines à activité tyrosine kinase). Le troisième domaine reconnaît un antigène associé à la tumeur. Enfin, il existe des récepteurs inhibiteurs qui inhibent l'effet anti-tumoral en activant les protéine phosphatases SHP-1 et SHP-2, qui s'opposent à l'activation des cellules NK. Ces récepteurs sont ciblés par les anticorps ICI (immune checkpoint inhibitors), qui empêchent la fixation de ces récepteurs à leurs ligands.

les récepteurs membranaires de ces cytokines et activent alors leurs voies de signalisation via les protéines JAK (Janus kinase)/ STAT (signal transducers and activators of transcription) (sauf pour l'IL-18 pour laquelle l'activation de son récepteur engage la voie TRAM [TRIF¹-related adaptor molecule]-MyD88[myeloid differentiation primary response 88]-IRAK[Interleukin-1 receptor-associated kinase]).

# Lever les freins à la surface de la cellule : les points de contrôle immunitaires (immune checkpoint inhibitors)

Un des mécanismes majeurs de l'échappement tumoral est la surexpression par les cellules cancéreuses de ligands des récepteurs inhibiteurs des lymphocytes cytotoxiques, freinant ainsi leur activité anti-tumorale. La conception et le développement d'anticorps monoclonaux (AcM) inhibant la fixation ligands-récepteurs est une stratégie importante en immunothérapie du cancer. Si les récepteurs PD-1 et CTLA-4(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) ont été les premiers à être ciblés par les ICI, de nombreux anticorps ciblant des récepteurs inhibiteurs sont actuellement évalués chez l'homme, tels que les KIR(killer-cell immunoglobulin-like receptors), Tim-3(T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3), LAG-3(lymphocyte-activation gene 3) ou TIGIT(T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains), ce dernier semblant être un frein majeur à

la cytotoxicité NK [8]. Certains récepteurs inhibiteurs sont partagés par différents types cellulaires (lymphocytes T CD8+, cellules NK). C'est le cas notamment de NKG2A(NK group 2 member A), cible du monalizumab qui inhibe la fixation de son ligand sur les cellules NK et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> [1]. Cinq essais cliniques sont en cours, où le monalizumab est testé en monothérapie ou en association avec d'autres agents, pour le traitement de divers cancers. De plus en plus d'études et d'essais cliniques se tournent vers la combinaison de plusieurs anticorps ou l'utilisation d'anticorps ayant fait l'objet d'une ingénierie moléculaire (anticorps bi-tri-spécifiques) ciblant la surface des cellules cytotoxiques. Ainsi, l'anticorps NKCE (NK Cell Engager) va induire spécifiquement la réponse des cellules NK (Figure 1) [9].

#### Utilisation des cellules NK en thérapie cellulaire

Les approches abordées ci-dessus visent à rétablir in vivo les fonctions des cellules NK. En complément, il est possible de suppléer l'organisme du patient avec des lymphocytes cytotoxiques isolés et cultivés ex vivo, puis réinjectés au patient. Si les thérapies cellulaires ont été d'abord développées avec les lymphocytes T, les cellules NK s'avèrent être des candidats prometteurs.

<sup>1</sup> TIR(Toll/interleukin-1 receptor) domain-containing adaptor inducing IFN-eta.

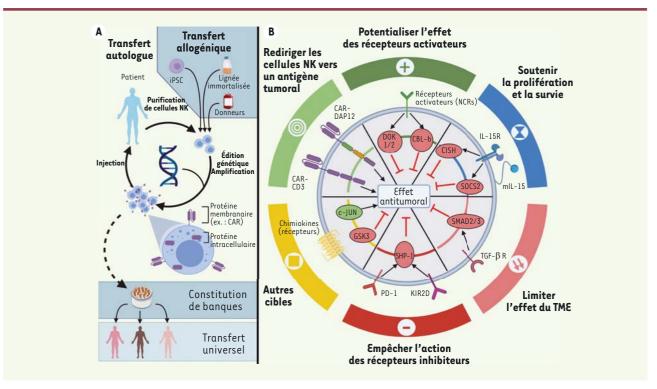


Figure 2. Optimiser génétiquement le pouvoir antitumoral des cellules NK. A. Principe des thérapies NK. Des cellules NK sont isolées à partir du sang de patients, de donneurs sains, de cellules différenciées à partir de cellules souches reprogrammées iPSC (induced-pluripotent stem cell) ou de lignées cellulaires immortalisées (NK-92). Elles sont cultivées ex vivo et modifiées génétiquement afin de leur faire exprimer, par exemple, un récepteur chimérique CAR (chimeric antigen receptor) à leur surface avant d'être réinjectées. Certaines protéines intracellulaires peuvent également être ciblées génétiquement avec l'espoir d'un bénéfice thérapeutique. Les deux approches CAR et protéines intracellulaires peuvent être combinées. Les particularités des cellules NK permettent d'utiliser des cellules autres que celles du patient, dans le cadre de transferts allogéniques. Le transfert allogénique doit permettre de constituer des banques de cellules NK qui pourront être administrées de manière universelle. B. Pistes pour optimiser les cellules NK. Il existe de nombreuses pistes pour améliorer génétiquement les cellules NK. Elles portent sur (1) l'optimisation des constructions des récepteurs CAR, notamment de leur partie responsable de la signalisation; (2) sur la potentialisation de l'activité de leurs récepteurs activateurs comme les NCR (natural cytotoxicty receptors); (3) sur le renforcement du développement et de la prolifération des cellules NK via une signalisation induite par la présence de cytokines, comme la surexpression d'une version modifiée de l'IL-15 liée à la membrane (mIL-15); (4) sur l'isolation des cellules NK du microenvironnement tumoral (TME, tumor microenvironnement); (5) sur la limitation de l'action des récepteurs inhibiteurs ou encore (6) sur une action sur un ensemble de cibles variées, telles que les récepteurs de chimiokines. Ces stratégies peuvent être aussi bien dirigées contre des molécules membranaires, en surexprimant ou en inactivant les protéines concernées, qu'au niveau intracellulaire, en ciblant les protéines impliquées dans la régulation de la signalisation des cellules NK. De nombreux freins intracellulaires ont été mis en évidence (en rouge), qui peuvent être supprimés génétiquement pour augmenter l'effet anti-tumoral des cellules NK.

En effet, la cytotoxicité des lymphocytes T est centrée autour du récepteur des cellules T (TCR, *T-cell receptor*) qui s'active en présence d'antigènes étrangers présentés par le CMH (complexe majeur d'histocomptabilité). Le TCR est particulièrement impliqué dans la maladie du greffon contre l'hôte provoquée par les différences d'haplotypes du CMH entre donneurs et receveurs, ce qui limite la source des cellules utilisables dans les protocoles d'immunothérapie cellulaire T aux seules cellules du patient (cellules autologues). En revanche, les cellules NK n'expriment pas le TCR et utilisent un ensemble de récepteurs pour distinguer les cellules à épargner des cellules à tuer. Ainsi, les cellules NK ne sont notamment pas responsables de rejets de greffe,

et permettent le transfert de cellules allogéniques. Par conséquent, il existe une possibilité de développer des cellules NK universelles anti-cancéreuses « prêtes à l'emploi » comme produit de thérapie cellulaire. Ces cellules peuvent être préparées à l'avance, optimisées et administrées à la demande à plusieurs patients. Cette perspective a été renforcée par le développement de méthodes en accord avec les exigences cliniques pouvant générer un grand nombre de cellules NK provenant de sources multiples, y compris le sang périphérique, le sang du cordon ombilical, de cellules NK

immortalisées et maintenues en culture (lignée cellulaire NK-92) ou encore de cellules NK générées à partir de cellules souches pluripotentes induites (*iPSC*) [10] (Figure 2A).

Les cellules NK peuvent être rendues plus compétentes pendant la phase de culture *ex vivo* par l'ajout de petites molécules spécifiques dans le milieu de culture ou par édition génétique. Ces efforts en ce sens se concentrent sur leurs récepteurs de surface et, plus récemment, sur des voies de signalisation impliquées dans l'activation des cellules NK.

#### Thérapie cellulaire : cibler la surface de la cellule par des modifications génétiques

Les thérapies CAR (chimeric antigen receptor) utilisent des cellules modifiées qui expriment alors un récepteur antigénique chimérique visant à permettre la reconnaissance et potentialiser l'action des lymphocytes contre les tumeurs. Ce récepteur est composé de deux domaines principaux. Le premier (extracellulaire) reconnaît des antigènes exprimés par des tumeurs et le deuxième (intracellulaire) traduit cette fixation en cascades de signalisation activatrices.

Les thérapies CAR ont d'abord été appliquées aux lymphocytes T, et deux protocoles ont été autorisés par les autorités sanitaires américaines (FDA, Food and Drug Administration) et européennes (EMA, European Medicines Agency). Leur fabrication impose cependant des coûts élevés et des délais de fabrication parfois incompatibles avec la prise en charge des patients. Ces obstacles sont susceptibles d'être levés avec l'utilisation de cellules NK.

En effet, les thérapies CAR-NK sont pour l'instant une extension de ce qui a été réalisé pour les lymphocytes T. Ainsi, les constructions utilisées ont d'abord été conçues pour induire l'activation de ces cellules. Bien qu'une partie de la signalisation soit conservée entre les lymphocytes T et les cellules NK (CD3 $\zeta$  et 4-1BB), certaines molécules de costimulation (ex. la molécule CD28) dont les domaines intracellulaires sont couramment utilisés pour fabriquer le récepteur chimérique CAR dans les cellules CAR-T sont absentes dans les cellules NK.

Ainsi, les récepteurs activateurs des cellules NK utilisent une variété de molécules adaptatrices pour la signalisation telles que CD3 $\zeta$ , DAP(DNAX-activating protein)10, DAP12 et la chaîne  $\gamma$  des récepteurs de la région Fc des IgG de type III (RFc $\gamma$ IIIa/CD16a). Les constructions CAR spécifiques des cellules NK sont largement fondées sur l'incorporation de DAP10 ou DAP12 comme domaine de transduction ou comme domaine co-stimulateur au côté de CD3 $\zeta$  [11].

Différentes constructions CAR-NK spécifiques ont été testées dans les cellules de la lignée cellulaire NK-92, capables de cytotoxicité anti-tumorale ; ces constructions contiennent des domaines intracellulaires activateurs (dérivés de CD16a, NKp44, NKp46 ou NKG2D) et des domaines de co-stimulation (dérivés de 2B4, DAP10, DAP12 ou CD137) diversement combinés avec CD3 $\zeta$  [11]. Trois constructions ont montré une potentialisation des capacités anti-tumorales des cellules NK-92 (TM NKp46 - 2B4 - CD3 $\zeta$ ; TM NKG2D - 2B4 - DAP10 - CD3 $\zeta$ ; TM NKG2D - CD137- 2B4 - CD3 $\zeta$ ). Ces combinaisons doivent maintenant être testées dans des cellules NK primaires et les études

sur le signal intracellulaire induit dans ces cellules NK primaires doivent se poursuivre pour comprendre le comportement des CAR dans des cellules NK primaires amplifiées.

Récemment, l'injection de cellules anti-CD19 CAR-NK, lors d'une étude de phase I/II, a montré une rémission complète de sept patients sur une cohorte de 11 patients leucémiques, sans développement d'effets toxiques majeurs [12]. Des pistes pour perfectionner l'effet des CAR-NK sont déjà à l'étude, certaines portant notamment sur la conception même du récepteur CAR à employer. Cela concerne à la fois le choix de la cible reconnue par le récepteur pour cibler divers cancers (CD19, CD22, mésothéline, HER2...) et le choix des modules de signalisation échafaudés dans la partie intracellulaire.

L'expression de CAR à la surface des NK n'est pas le seul axe d'optimisation génétique de ces cellules. De nombreux efforts portent sur la modification des protéines exprimées à leur surface et se concentrent notamment sur les récepteurs de l'IL-2 et de l'IL-15. Ainsi, il a été proposé de rendre les cellules NK capables de produire leur propre IL-15, dans une version légèrement modifiée afin que cette cytokine reste insérée dans la membrane et ne diffuse pas dans l'environnement [12]. Une telle expression membranaire permet le soutien de la croissance et de la survie des cellules NK, indépendamment de leur environnement.

Une autre stratégie vise à isoler les cellules NK des mécanismes immunosuppresseurs du microenvironnement tumoral en inactivant génétiquement les récepteurs impliqués dans cette régulation, comme les récepteurs TIGIT ou le récepteur du TGF(transforming growth factor)- $\beta$  [1, 13]. L'expression d'une version non fonctionnelle du récepteur du TGF-eta sur des cellules NK dérivées du sang de cordon ombilical empêche l'action immunosuppressive de ce facteur sur les cellules NK, qui ont alors un effet anti-tumoral plus puissant in vitro. Ces résultats sont confirmés dans un modèle de xénogreffe de neuroblastome : comparée à l'injection de cellules NK non modifiées génétiquement, l'injection de cellules NK exprimant ce récepteur non fonctionnel améliore significativement la survie des souris.

Enfin, il existe des chimiokines qui permettent « l'adressage » (homing) des cellules NK dans les tissus. La surexpression de certains des récepteurs de ces chimiokines, comme CCR(C-C chemokine receptor type)7, CXCR(C-X-C motif chemokine receptor)-1, 2, 3 ou 4, favorise la pénétration des cellules NK au sein des tissus [14]. Les conséquences fonctionnelles de cet adressage restent encore à déterminer.

#### Cibler des protéines intracellulaires de la signalisation

Certaines protéines régulatrices ont un spectre d'action large sur la fonctionalité des lymphocytes cytotoxiques et pourraient être ciblées à ce titre. C'est le cas notamment de la protéine GSK(glycogen synthase kinase) 3 dont l'inactivation génétique ou pharmacologique potentialise l'activité des cellules NK [15]. Plusieurs essais cliniques utilisant l'inhibiteur pharmacologique GSK3 LY2090314 ont été réalisés chez des patients atteints de cancers du pancréas et de leucémies (NCT01287520; NCT01214603). L'administration par voie générale d'une telle molécule peut cependant avoir des effets indésirables car elle agit sur d'autres types cellulaires tels que les Tregs qui favorisent l'immunotolérance. Un ciblage de GSK3 dans le cadre d'une thérapie cellulaire, notamment NK, permettrait de limiter ces effets aux cellules d'intérêt.

Il existe des protéines intracellulaires dont la surexpression ouvre la voie à une optimisation des thérapies cellulaires. La surexpression génétique de c-JUN dans les CAR-T les protège de l'épuisement [16], un phénomène également rencontré avec les cellules NK, qui perdent peu à peu leur fonctionnalité à la suite de stimulations chroniques, notamment par l'intermédiaire de l'expression de récepteurs inhibiteurs [17]. La surexpression du facteur de transcription c-JUN a un effet similaire dans les cellules T CD8+ et dans les cellules NK, au moins en ce qui concerne la transcription de certains gènes codant quelques protéines [18]. Il est possible que ce qui a été observé avec les CAR-T puisse s'appliquer également aux CAR-NK.

#### Lever les freins de la signalisation de la cellule

De nombreuses protéines intracellulaires régulent négativement l'activité des cellules NK. Ces protéines constituent une nouvelle de classe de cibles dont il faudrait, à l'instar des ICI, empêcher l'action.

C'est le cas des protéines SMAD(small mothers against decapentaplegic) 2/3 qui sont activées en aval du récepteur du TGF-β. Elles sont le relais de ce récepteur inhibiteur et leur déplétion favorise la réponse anti-tumorale des cellules NK [19]. En particulier, il a été montré que l'utilisation d'un inhibiteur de Smad-3 permet de freiner la progression tumorale en agissant notamment sur les cellules NK [20]. Cependant, toutes les protéines inhibitrices ne sont pas susceptibles d'être ciblées pour optimiser l'efficacité des cellules NK. En effet, bien que la phosphatase SHP(Src homology region 2 domain-containing phosphatase)-l soit activée en aval de certains récepteurs inhibiteurs comme PD(programmed cell death)-1 ou certains récepteurs KIR, pour autant, l'inactivation génétique de cette phosphatase ne favorise pas la réponse anti-tumorale des cellules NK, mais les rend hyporéactives [21]. Il est donc primordial d'étudier les conséquences fonctionnelles de leur absence, à la fois dans les voies de signalisation et dans la réponse anti-tumorale.

C'est le cas des protéines adaptatrices DOK(downstream of [tyro-sine] kinases)1/2 qui inhibent, dans les cellules NK, la signalisation de certains récepteurs activateurs chargés de reconnaître les cellules tumorales [22]. Des études sont nécessaires pour tester l'efficacité

anti-tumorale de cellules NK dont les gènes *DOK1* et *DOK2* auraient été invalidés.

L'ubiquitine ligase CBL(Casitas B-lineage lymphoma)-b atténue le signal induit par le récepteur de l'IL-2 à la fois dans les lymphocytes T et les cellules NK, participant ainsi au blocage de l'activité anti-tumorale. Ces résultats ont été confirmés en utilisant des cellules NK issues de donneurs humains et ont permis le développement d'un essai clinique de phase I en utilisant la technique d'interférence par ARN (NCT03087591).

Enfin, les protéines inhibitrices de la famille SOCS (suppresror of cytokine signaling) sont largement étudiées en aval de la signalisation de certains récepteurs de cytokines, dont le récepteur de l'IL-15. Une étude récente menée chez la souris a montré que l'invalidation de SOCS2 favorise la réponse anti-tumorale des cellules NK en potentialisant l'effet de l'IL-15 [23]. Cependant, la délétion du gène Socs2 s'accompagne d'une hyperactivité des cellules NK qui présentent alors un phénotype plus mature et sont retrouvées en plus grand nombre dans l'organisme, accentuant les risques d'effets secondaires.

L'expression de CISH (cytokine-inducible SH2-containing protein) est régulée par l'activation de la protéine STAT-5 située en aval des récepteurs de l'IL-15 et de l'IL-2, dont elle inhibe la signalisation. Nous avons montré que l'absence de CISH favorise les fonctions anti-tumorales des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> [24, 25]. Ces études ont permis la mise en place d'un essai clinique de phase I/II (NCT04426669) où le gène CISH est inactivé par la technique CRISPR-Cas9 dans des lymphocytes infiltrés au niveau de la tumeur (TIL) de patients ayant un cancer gastro-intestinal (GI). CISH favorise également la réponse anti-tumorale des cellules NK, sans toutefois modifier l'homéostasie de ces cellules [26]. CISH pourrait être un frein intracellulaire majeur à cibler pour optimiser l'effet des cellules NK, à l'instar de ce qui a été montré dans les lymphocytes T. Il convient maintenant d'étudier en détail son rôle dans la réponse anti-tumorale murine et humaine.

#### Conclusion

Les immunothérapies donnent des résultats encourageants dans la prise en charge des patients atteints de cancer. Pour l'instant, l'essentiel des efforts se concentrent sur le ciblage de molécules exprimées à la surface de cellules immunitaires. Il existe plusieurs pistes prometteuses permettant de cibler des molécules intracellulaires. Nous sommes entrés désormais dans l'ère où la thérapie cellulaire et la modification génétique d'une cellule est possible. De nouvelles

stratégies peuvent être envisagées, ciblant des protéines intracellulaires d'intérêt, après avoir procédé à une ingénierie de la cellule. Ces approches permettront de compléter les stratégies actuellement développées dans le cadre de l'immunothérapie et pourront également être utilisées en combinaison avec d'autres traitements tels que ceux fondés sur l'utilisation d'ICI ou de cellules CAR-NK. Il convient cependant d'étudier en détail la signalisation des cellules NK pour proposer de nouveaux traitements innovants. •

#### Unleashing NK cell signaling to improve cancer immunotherapy

#### REMERCIEMENTS

Le laboratoire (Équipe CRCM « Immunité et Cancer ») est soutenu par un label Équipe FRM2018 et par les financements institutionnels (Inserm, CNRS, Aix-Marseille Université et Institut Paoli-Calmettes). Ce travail est tout particulièrement financé par le fonds Janssen Horizon et la fondation ARC pour la recherche sur le cancer. PLB est soutenu par une allocation de 1'e année de thèse de la Ligue Nationale contre le Cancer, VL par une allocation de thèse du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche, et de l'Innovation, GG par le fonds Janssen Horizon. Les figures ont été conçues sur BioRender (https://BioRender.com/).

#### LIENS D'INTÉRÊT

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

#### RÉFÉRENCES

- Demaria O, Cornen S, Daeron M, et al. Harnessing innate immunity in cancer therapy. Nature 2019; 574: 45-56.
- Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, et al. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma. N Engl J Med 2016; 375: 819-29.
- Chockley PJ, Chen J, Chen G, et al. Epithelial-mesenchymal transition leads to NK cell-mediated metastasis-specific immunosurveillance in lung cancer. J Clin Invest 2018; 128: 1384-96.
- Souza-Fonseca-Guimaraes F. NK cell-based immunotherapies: awakening the innate anti-cancer response. Discov Med 2016; 21:197-203.
- Chretien AS, Devillier R, Fauriat C, et al. NKp46 expression on NK cells as a prognostic and predictive biomarker for response to allo-SCT in patients with AML. Oncoimmunology 2017; 6: e1307491.
- Rosenberg SA. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. J Immunol 2014; 192: 5451-8
- Pilipow K, Roberto A, Roederer M, et al. IL15 and T-cell stemness in T-cell-based cancer immunotherapy. Cancer Res 2015; 75: 5187-93.
- Zhang Q, Bi J, Zheng X, et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. Nat Immunol 2018; 19: 723-32.
- Gauthier L, Morel A, Anceriz N, et al. Multifunctional natural killer cell engagers targeting NKp46 trigger protective tumor immunity. Cell 2019; 177: 1701-13e16.
- 10. Chabannon C, Mfarrej B, Guia S, et al. Manufacturing natural killer cells as medicinal products.

- Front Immunol 2016; 7:504.
- Li Y, Hermanson DL, Moriarity BS, Kaufman DS. Human iPSC-derived natural killer cells engineered with chimeric antigen receptors enhance anti-tumor activity. Cell Stem Cell 2018; 23: 181-92e5.
- Liu E, Marin D, Banerjee P, et al. Use of CAR-transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors. N Engl J Med 2020; 382: 545-53.
- 13. Burga RA, Yvon E, Chorvinsky E, et al. Engineering the TGFbeta receptor to enhance the therapeutic potential of natural killer cells as an immunotherapy for neuroblastoma. Clin Cancer Res 2019; 25: 4400-12.
- Castriconi R, Carrega P, Dondero A, et al. Molecular mechanisms directing migration and retention of natural killer cells in human tissues. Front Immunol 2018: 9: 2324.
- Cichocki F, Valamehr B, Bjordahl R, et al. GSK3 inhibition drives maturation of NK cells and enhances their antitumor activity. Cancer Res 2017; 77: 5644-75
- Lynn RC, Weber EW, Sotillo E, et al. c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance. Nature 2019; 576: 293-300.
- Judge SJ, Murphy WJ, Canter RJ. Characterizing the dysfunctional NK cell: assessing the clinical relevance of exhaustion, anergy, and senescence. Front Cell Infect Microbiol 2020; 10:49.
- Marusina AI, Burgess SJ, Pathmanathan I, et al. Regulation of human DAP10 gene expression in NK and T cells by Ap-1 transcription factors. J Immunol 2008; 180: 409-17.
- 19. Viel S, Marcais A, Guimaraes FS, et al. TGF-beta inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. Sci Signal 2016; 9: ra19.
- Tang PM, Zhou S, Meng XM, et al. Smad3 promotes cancer progression by inhibiting £4BP4-mediated NK cell development. Nat Commun 2017; 8: 14677.
- Viant C, Fenis A, Chicanne G, et al. SHP-1-mediated inhibitory signals promote responsiveness and anti-tumour functions of natural killer cells. Nat Commun 2014; 5: 5108.
- Celis-Gutierrez J, Boyron M, Walzer T, et al. Dok1 and Dok2 proteins regulate natural killer cell development and function. EMBO J 2014; 33: 1928-40.
- Kim WS, Kim MJ, Kim DO, et al. Suppressor of cytokine signaling 2 negatively regulates NK cell differentiation by iinhibiting JAK2 activity. Sci Rep 2017; 7:46153
- 24. Palmer DC, Guittard GC, Franco Z, et al. Cish actively silences TCR signaling in CD8\* T cells to maintain tumor tolerance. J Exp Med 2015; 212: 2095-113.
- Guittard G, Dios-Esponera A, Palmer DC, et al. The Cish SH2 domain is essential for PLC-gammal regulation in TCR stimulated CD8\* T cells. Sci Rep 2018: 8: 5336.
- Delconte RB, Guittard G, Goh W, et al. NK Cell priming from endogenous homeostatic signals is modulated by CIS. Front Immunol 2020; 11: 75.

TIRÉS À PART

P-L. Bernard



Tarifs d'abonnement m/s - 2020

Abonnez-vous

à médecine/sciences

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

Abonnez-vous sur www.medecinesciences.org



55



> L'immunothérapie à base d'anticorps monoclonaux (AcM) connaît un plein essor en cancérologie. En 2020, plus de 40% des anticorps approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) (34 sur 84 anticorps, selon The Antibody Society) ont une indication pour les thérapies anti-cancéreuses. Contrairement à la chimiothérapie standard, ils démontrent un bien meilleur profil de tolérance pour les patients. Malgré cela, des effets indésirables néfastes peuvent survenir en raison du ciblage de l'antigène qui est également exprimé au niveau des tissus sains. C'est pourquoi des stratégies émergentes visent à optimiser le format des anticorps et à tenir compte des particularités du microenvironnement tumoral pour conférer une action encore plus spécifique de l'anticorps au niveau tumoral. <

#### Succès des anticorps thérapeutiques

L'immunothérapie à base d'anticorps monoclonaux (AcM) a considérablement amélioré le pronostic des patients atteints de cancers, même à des stades métastatiques. Ces AcM ciblent des marqueurs membranaires surexprimés par les cellules tumorales, appelés antigènes associés aux tumeurs (AAT) ou bien des molécules du micro-environnement tumoral. Le plus souvent, ces AcM agissent en tuant les cellules tumorales ou en bloquant l'activation des AAT ou en stimulant le système immunitaire pour induire une régression tumorale. Par exemple, la combinaison des AcM nivolumab et ipilimumab, qui ciblent respectivement les points de contrôles du système immunitaire PD1 et CTLA-4 présents à la surface des lymphocytes T (LT), a permis d'augmenter la médiane de survie globale de 9 mois à plus de 5 ans pour les patients atteints de mélanomes avancés. Malgré une faible expression de ces AAT par les tissus sains, la fixation des AcM sur ces derniers peut générer des toxicités, parfois sévères pour le patient.

# Stratégies de ciblage spécifique de la tumeur fondées sur les caractéristiques des antigènes tumoraux et du microenvironnement tumoral

Tristan Mangeat, Matthieu Gracia, Pierre Martineau, Bruno Robert



IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier U1194, Université de Montpellier, Institut régional du Cancer de Montpellier, France. tristan.mangeat@inserm.fr matthieu.gracia@inserm.fr bruno.robert@inserm.fr

## Les toxicités dues au ciblage des antigènes associés aux tumeurs

Il est bien documenté que le traitement du cancer du côlon métastatique par l'AcM anti-EGFR (epithelial growth factor receptor), le cétuximab, entraîne des effets indésirables cutanés du fait de sa fixation sur les kératinocytes de la peau qui expriment également ce récepteur [1]. Ces toxicités dues à la liaison à la cible extra-tumorale sont encore plus importantes avec certains nouveaux formats d'anticorps. C'est le cas du bivatuzumab mertansine, un AcM armé¹ se liant au récepteur CD44v6, surexprimé dans les carcinomes squameux de la tête et du cou. Lors de l'essai clinique de phase I, près de 80% des patients traités ont souffert de manifestations cutanées importantes dès la dose de 100 mg/m² (environ 0,83mg/kg) et un patient a succombé à la suite d'une nécrolyse épidermique toxique. Ces toxicités cutanées, attribuées à l'expression basale de ce variant par les épithéliums squameux, ont conduit à l'arrêt du développement de l'AcM [2].

Face au rôle prépondérant du système immunitaire dans la lutte anti-tumorale, des LT ont été modifiés pour exprimer à leur surface un récepteur chimérique (CAR-T)<sup>2</sup>, qui est constitué d'un fragment

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Anticorps armés : anticorps couplés chimiquement à des molécules de chimiothérapie hautement cytotoxiques pour permettre une délivrance plus spécifique de la drogue au niveau du tissu cible.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> CAR-T : population de LT d'un patient, modifiés génétiquement pour exprimer un récepteur chimérique capable de reconnaître une molécule cible et d'induire une cytotoxicité contre les cellules exprimant cette cible après réinjection chez le patient.

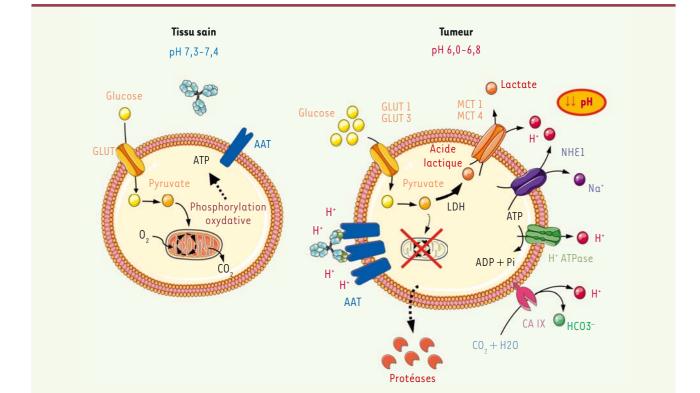


Figure 1. Caractéristiques du métabolisme tumoral. AAT : antigènes associés aux tumeurs ; LDH : lactate deshydrogénase ; GLUT : transporteurs du glucose ; CA : anhydrase carbonique ; MCT : transporteur des monocarboxylates ; NHE : transporteur du sodium et du proton.

d'anticorps fusionné à des modules d'activation intracellulaires. Ces LT sont capables d'être activés après fixation du fragment d'anticorps à l'antigène tumoral. Si le potentiel anti-tumoral des CAR-T est prometteur, une activation dérégulée de ces cellules peut induire un syndrome de relargage des cytokines<sup>3</sup> faisant suite à la reconnaissance de la cible extra-tumorale. L'administration de CAR-T ciblant le récepteur HER2 (human epithelial growth factor receptor-2) chez une patiente atteinte d'un cancer du côlon métastatique a induit une infiltration pulmonaire lymphocytaire, précédant le choc cytokinique, et une détresse respiratoire fatale due à la reconnaissance par les CAR-T de la cible présente au niveau pulmonaire [3].

Ainsi, l'expression, même à faible densité, de la cible par le tissu sain reste problématique pour le développement de thérapies anti-tumorales avec un bon profil de sécurité pour le patient. Face à la difficulté d'identifier des antigènes parfaitement spécifiques des tumeurs, il est nécessaire de développer des stratégies améliorant la spécificité des anticorps thérapeutiques pour les AAT de la tumeur de façon à limiter leurs toxicités chez le patient. Nous présentons dans cette revue les nouvelles pistes de ciblage spécifique de la tumeur fondées sur les caractéristiques antigéniques de la tumeur et du microenvironnement tumoral.

# Stratégies fondées sur l'utilisation de pro-drogues

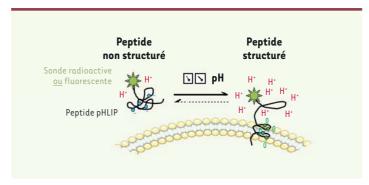
#### Activation de pro-anticorps par les protéases du microenvironnement tumoral

Il est désormais établi que le microenvironnement tumoral est enrichi en protéases, qui jouent un rôle dans le caractère invasif de la tumeur, et dont l'expression est corrélée à un mauvais pronostic. En tirant profit de cette caractéristique, ont été développés des proanticorps, dont l'activité de liaison à l'antigène cible est restituée après protéolyse d'un « masque ».

Desnoyers et al. ont ainsi associé un peptide, masquant et bloquant le paratope<sup>4</sup> du cétuximab, à l'extrémité N-terminale de la chaine légère, par l'intermédiaire d'un site peptidique clivable par des protéases spécifiques, telles que la matriptase. Dans un environnement dépourvu de protéases, ce proanticorps, appelé PB1, perd fortement sa capacité de fixation à la cible, l'EGFR. En revanche, une fois la tumeur atteinte, les protéases présentes dans le microenvironnement tumoral assurent alors le clivage

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Syndrome de relargage des cytokines : réponse inflammatoire sévère initiée par la libération massive de médiateurs de l'inflammation par les cellules du système immunitaire, ici les CAR-T, se manifestant par un syndrome pseudo-grippal et pouvant conduire au décès du patient par défaillance des organes.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Paratope : partie de l'anticorps directement impliquée dans la liaison à l'antigène.



**Figure 2.** Principe de l'imagerie par peptides pHLIP. Représentation du mécanisme d'insertion membranaire pH-dépendante des peptides pHLIP (pH-low insertion peptides) couplés à une sonde (fluorescente ou radioactive) [11].

du lien peptidique, libérant l'accessibilité du paratope pour rétablir la liaison de l'anticorps à sa cible. Outre son activité anti-tumorale similaire au cétuximab contre des xénogreffes de cancer du poumon chez la souris, ce pro-anticorps démontre un très bon profil de tolérance chez le macaque. En effet, alors qu'une toxicité cutanée survient chez 66% des singes recevant une dose d'entretien de 25 mg/kg/semaine de cétuximab pendant 5 semaines, il faut une dose de 75 mg/kg/semaine de l'AcM PB1 pendant 7 semaines pour voir survenir les premiers effets indésirables cutanées [4].

Sur ce même principe, Trang et al. ont conçu un masque peptidique « universel », constitué de superhélices peptidiques. Une fois associées aux chaines lourdes et légères de l'anticorps via un espaceur clivable par les protéases, les hélices assurent un blocage stérique du paratope de l'anticorps. Comme attendu, l'ajout de ce masque à un AcM armé anti-CD19 entraine une réduction drastique de sa cytotoxicité dans un modèle cellulaire de lymphome in vitro. En revanche, dans un modèle de souris immunodéficientes greffées avec les cellules d'un lymphome humain non Hodgkinien, une dose unique de 6 mg/kg du pro-anticorps armé suffit à contrôler la croissance tumorale de manière identique à l'anticorps parental [5].

#### Activation de pro-anticorps par l'hypoxie tumorale

La croissance rapide des tumeurs se traduit par un défaut de vascularisation responsable de l'apparition de zones appauvries en oxygène. Cet environnement hypoxique a déjà été exploité pour l'activation conditionnelle de petites molécules. L'équipe de W. Tan a généré des macromolécules cagées (anticorps et aptamères<sup>5</sup>), dont le paratope est bloqué stériquement par du polyéthylèneglycol, qui peut être éliminé en condition réductrice. En normoxie, les électrons fournis par l'oxygène empêchent la bioréduction de la fonction clivable par les réductases. Le site de liaison à l'antigène reste alors inaccessible. Mais, la fixation de la macromolécule est spécifiquement restaurée sur des sphéroïdes cultivés en hypoxie. Une étude de biodistribution chez la souris démontre que l'accumulation privilégiée des macromolécules au niveau de la tumeur n'est rendue possible qu'avec l'élimination du masque par bioréduction [6].

# Stratégies fondées sur les propriétés de liaison de l'anticorps

#### Modulation de l'affinité et du format des anticorps

La plupart des AcM thérapeutiques actuels sont sélectionnés sur la base de leur affinité élevée (de l'ordre du nanomolaire [nM] voire du picomolaire [pM] pour l'AAT cible). Ceci engendre une fixation des anticorps très largement indépendante de la densité de l'antigène présent à la surface des cellules. Wong et al. ont donc généré un AcM armé anti-EGFR de faible affinité (une centaine de nM) : celuilà montre une fixation restreinte et une moindre toxicité sur les kératinocytes présentant une faible densité antigénique à des doses où le cétuximab (~0,5 nM) est, quant à lui, cytotoxique. Seule une expression tumorale élevée de l'EGFR permet de restaurer une liaison bivalente de cet anticorps ainsi que son internalisation. Couplé à des agents antimitotiques cet anticorps possède un fort potentiel anti-tumoral [7]. L'utilisation d'anticorps bispécifigues, c.à.d. liant simultanément deux antigènes co-exprimés par la tumeur, a aussi été envisagée pour accroître la spécificité de ciblage tumoral. Mais l'équipe de Dall'Acqua a montré avec un anticorps bispécifique anti-HER2/neu et anti-EGFR qu'il est nécessaire de réduire l'affinité d'un des partenaires (dans son cas l'EGFR) pour augmenter la sélectivité et ainsi épargner les tissus sains [8]. Slaga et al. ont développé un anticorps engageant les LT par liaison monovalente au récepteur CD3 et par une liaison bivalente mais de faible affinité (~ 50 nM) au récepteur HER2/neu (fusion de deux Fab en tandem à l'extrémité N-terminale de la région charnière de l'IgG). Ce format original limite la liaison, et donc l'activation des LT, à des cellules ayant un faible niveau d'expression de HER2, comme les cardiomyocytes (qui ont été impliqués dans les effets cardiologiques indésirables observés chez des patientes traitées par un AcM anti-HER2/neu). La liaison bivalente au récepteur HER2, rendue possible par une densité antigénique élevée, déclenche par contre in vitro un effet cytotoxique des LT spécifiquement contre les cellules tumorales [9].

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Aptamère : courte séquence d'oligonucléotides simple brin, capable de reconnaître une cible spécifique.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Bivalence : la notion de valence renvoie au nombre de sites de liaison d'un anticorps pour un même antigène.

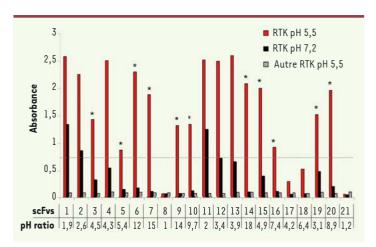


Figure 3. Exemple de criblage de scFvs pH-dépendants. Analyse par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) de la liaison pH-dépendante et de la spécificité des fragments d'anticorps scFv (single chain fragment variable) anti-récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) ciblée et non pertinent. Sélection des meilleurs scFvs (\*) selon leur fixation à pH acide et leur ratio de fixation pH 5,5/pH 7,2.

#### Interaction pH-dépendante des anticorps

#### Implication et mise en évidence de l'effet de Warburg

La modification métabolique des cellules cancéreuses, décrite par Otto Warburg, se caractérise, entre autres, par un besoin accru en glucose. Ce dernier est préférentiellement métabolisé en acide lactique au cours de la glycolyse aérobie lors d'un processus non oxydatif. L'excès acide est alors principalement sécrété par les transporteurs des monocarboxylates (MCT 1,4) et le transporteur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de type 1 (NHE 1) dans le microenvironnement tumoral. Il en résulte une acidification du microenvironnement tumoral stimulant l'invasion tumorale [10] (Figure 1). L'apparition de nouvelles méthodes d'imagerie permet maintenant de visualiser le pH tumoral acide de manière non invasive. De par leur insertion pH-dépendante au sein des membranes cellulaires (pH<6,5), les peptides pHLIP (pH-low insertion peptides) assurent la détection des zones acides des tumeurs de souris par tomographie à émission de positrons (Figure 2). En clinique, l'imagerie IRM de transfert d'aimantation par échange chimique avec le iopamidol (Acido-CEST pour acido-chemical exchange saturation transfer) permet la détection de l'acidification de tumeurs de l'ovaire et du sein [11].

#### Conceptions empirique et rationnelle d'anticorps pH-dépendants

Une approche consiste à exploiter ce phénomène métabolique pour développer des AcM dits « pH-dépendants », c'est-à-dire capables de se lier à leur cible au pH tumoral acide (pH 6,0-6,8) tout en n'ayant qu'une fixation très faible, voire nulle, sur la même cible exprimée à l'état basal par le tissu sain à pH physiologique (pH 7,2-7,4). Kodandapani et al. ont muté aléatoirement résidu par résidu une centaine de positions des parties variables du cétuximab. Après un premier criblage différentiel selon le pH de 1 501 simples mutants, 39 ont présenté une

meilleure interaction à pH acide qu'à pH physiologique. En combinant ces différentes mutations, ces chercheurs ont identifié un AcM qui démontre in vitro une très bonne fixation pH-dépendante à l'EGFR [12]. A l'issue d'un procédé similaire, des AcM pH-dépendants armés, dirigés contre le récepteur AXL, ont montré une cytotoxicité spécifique à pH acide contre des cellules de lignées cancéreuses. De plus, l'administration d'une dose unique à 6 mg/kg d'un de ces anticorps pH-dépendant suffit à contrôler la croissance de tumeurs du poumon et de prostate chez des souris, aussi efficacement que l'anticorps parental. Finalement, cet anticorps semble présenter un meilleur profil de tolérance hépatique et immunologique chez le macaque [13]. Ces résultats encourageants ont mené à l'évaluation de cet AcM anti-AXL pH-dépendant couplé à l'auristatine & dans le traitement de tumeurs solides localement avancées ou métastatiques (essai de phase I, NCT04425279). Plus récemment, T. Sulea et al. ont opté pour l'introduction de manière rationnelle d'histidines dans le paratope d'un AcM afin de le rendre pH-dépendant, à partir de la structure cristallographique du complexe immun. En effet, la chaîne latérale imidazole des histidines présentant un pKa moyen de 6,0, ces acides aminés sont théoriquement les seuls dont l'état de protonation change entre le pH acide tumoral et le pH physiologique des tissus sains. Avec cette méthode, les chercheurs ont réduit le nombre de mutants à tester et ont identifié des AcM pH-dépendants dirigés contre le récepteur HER2/neu. Ces anticorps perdent totalement leur fixation à pH physiologique, jusqu'à 300 nM sur une lignée avec une expression de HER2/neu similaire aux cellules cardiaques. Les anticorps ainsi sélectionnés induisent un ralentissement de la croissance de sphéroïdes spécifiguement en condition acide, alors que le trastuzumab, l'anticorps anti-HER2/neu de référence (Herceptin®), exerce un effet cytostatique indépendant du pH [14]. Cependant, en l'absence de données structurales sur le complexe anticorps-antigène, la génération ainsi que la caractérisation d'un grand nombre de clones mutants peut s'avérer laborieuse.

#### Sélection d'anticorps pH-dépendants par phage display

Afin de contourner cette dernière limitation, notre équipe a privilégié une approche combinatoire pour sélectionner des anticorps pH-dépendants en s'appuyant sur la technologie du phage display. À partir de banques de phages exprimant des fragments d'anticorps à leur surface [15], nous avons mis au point une méthode pour favoriser l'identification d'anticorps se liant préférentiellement à pH acide à une cible d'intérêt. À l'issue d'un criblage différentiel utilisant

deux pH distincts, plusieurs fragments d'anticorps ayant une liaison pH-dépendante contre un récepteur à activité tyrosine kinase ont pu être sélectionnés (Figure 3). Lorsque ces fragments ainsi sélectionnés ont été reformatés sous forme d'IgG, la plupart des AcM obtenus conservent cette propriété de fixation pH-dépendante sur la protéine recombinante, mais également sur le récepteur exprimé par des cellules de différentes lignées cellulaires. Nous évaluons actuellement la biodistribution de ces anticorps dans un modèle murin présentant à la fois du tissu sain et tumoral humain, pour démontrer leur innocuité.

#### En conclusion

Ces stratégies prometteuses, visant à prévenir les toxicités liées au ciblage des antigènes hors tumeur par des AcM, commencent à être intégrées dans le développement clinique des AcM. À long terme, ces traitements innovants devraient améliorer la qualité de vie des patients tout en maintenant leur fort potentiel anti-tumoral mais devraient aussi permettre d'augmenter le nombre futur d'AcM à usage thérapeutique. ♦

#### **SUMMARY**

# Strategies of tumor-specific targeting based on the antigenic tumor specificities and the tumor microenvironment characteristics

Monoclonal antibody (mAb)-based immunotherapy is booming in oncology. In 2020, more than 40% of FDA (Food and Drug Administration)-approved antibodies (34 out of 84 antibodies, according to *The Antibody Society*) have an indication for cancer therapy. In contrast to standard chemotherapy, they demonstrate a much better safety profile for patients. Despite this, adverse side effects may occur due to the targeting of the antigen also expressed by healthy tissues. For this reason, emerging strategies aim at optimizing the antibody format and considering the particularities of the tumor microenvironment to confer a more specific action of the antibody at the tumor site. ◊

#### LIENS D'INTÉRÊT

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

#### RÉFÉRENCES

- Peréz-Soler R, Saltz L. Cutaneous adverse effects with HER1/EGFR-targeted agents: is there a silver lining. J Clin Oncol 2005; 23: 5235-46.
- Riechelmann H, Sauter A, Golze W, et al. Phase I trial with the CD44v6targeting immunoconjugate bivatuzumab mertansine in head and neck squamous cell carcinoma. Oral Oncol 2008; 44: 823-9.
- Morgan RA, Yang JC, Kinato M, et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. Mol Ther 2010; 18:843-51.
- Desnoyers LR, Vasiljeva O, Richardson JH, et al. Tumor-specific activation of an EGFR-targeting probody enhances therapeutic index. Sci Transl Med 2013; 5: 207ra144.
- Trang VH, Zhang X, Yumul RC, et al. A coiled-coil masking domain for selective activation of therapeutic antibodies. Nat Biotechnol 2019; 37: 761-5
- Zhou F, Fu T, Huang Q, et al. Hypoxia-activated PEGylated conditional aptamer/antibody for cancer imaging with improved specificity. J Am Chem Soc 2019; 141: 18421-7.
- Desnoyers LR, Vasiljeva O, Richardson JH, et al. Tumor-specific activation of an EGFR-targeting probody enhances therapeutic index. Sci Transl Med 2013: 5: 207ra144.
- Mazor Y, Sachsenmeir KF, Yang C, et al. Enhanced tumor-targeting selectivity by modulating bispecific antibody binding affinity and format valence. Sci Rep 2017; 7:1-11.
- Slaga D, Ellerman D, Lombana TN, et al. Avidity-based binding to HER2 results in selective killing of HER2-overexpressing cells by anti-HER2/CD3. Sci Transl Med 2018; 10: eaat5775.
- 10. Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, et al. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. Nat Rev Cancer 2011; 11:671-7.
- Anemone A, Consolino L, Arena F, et al. Imaging tumor acidosis: a survey of the available techniques for mapping in vivo tumor pH. Cancer Metastasis Rev 2019; 38: 25-49.
- Kodandapani L, Bookbinder LH, Frost GI, et al. Methods for assessing and identifying or evolving conditionally active therapeutic proteins. 2017; US9683985B2.
- Short JM, Chang HW, Frey G, et al. Anti-Axl antibodies, antibody fragments and their immunoconjugates and uses thereof. 2017; W02017180842A1.
- 14. Sulea T, Rohani N, Baardsnes J, et al. Structure-based engineering of pH-dependent antibody binding for selective targeting of solid-tumor microenvironment. mAbs 2020; 12: e1682866-1-15.
- Philibert P, Stoessel A, Wang W, et al. A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm. BMC Biotechnol 2007; 7:81.

#### TIRÉS À PART

T. Mangeat





> Des avancées majeures révèlent l'hétérogénéité intra-tumorale des cancers d'origine épithéliale, incluant des cellules initiatrices de tumeurs qui ressemblent aux cellules souches adultes. Les cellules souches normales et tumorales partagent en effet leur plasticité entre phénotypes épithéliaux et mésenchymateux, progressant par une série d'états intermédiaires, réversibles. Si un cœur de régulateurs (Snail, Zeb, ...) est bien connu pour déclencher la transition épithéliomésenchymateuse (TEM), les facteurs OvoL/ Shavenbaby sont récemment apparus comme des stabilisateurs épithéliaux. La balance entre facteurs pro-TEM et OvoL pourrait ainsi réguler la plasticité phénotypique et le potentiel métastatique des tumeurs. Nous abordons cette question chez la drosophile, un modèle pour disséquer in vivo la fonction de Shavenbaby. Nos travaux montrent que Shavenbaby est un régulateur clé de l'homéostasie des cellules souches adultes. Shavenbaby est indispensable à leur survie, agissant en interaction directe avec la voie Hippo pour protéger les cellules souches de la mort cellulaire programmée. <

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) intervient à différentes étapes du développement embryonnaire (gastrulation, crêtes neurales, somitogenèse, ...) et aussi chez l'adulte, par exemple pour la cicatrisation [1]. Cette transition phénotypique réduit l'adhérence entre cellules épithéliales et favorise la migration invasive (Figure 1A). La TEM est bien connue pour contribuer à l'agressivité des cancers d'origine épithéliale, ou carcinomes, notamment les cancers du sein, du poumon, de la prostate ou colorectaux, etc. [1, 2]. La TEM déclenche la dissociation des cellules de la tumeur primaire et facilite leur migration, l'intravasation, et leur dissémination vers des sites distants pour former des métastases. Une transition réciproque de l'état

### Les facteurs Ovol

## Des régulateurs clés de la plasticité épithélium-mésenchyme et des cellules souches

Alexandra Mancheno-Ferris<sup>1,2</sup>, Cédric Polesello<sup>1,2</sup>, François Payre<sup>1,2</sup>



<sup>1</sup>Centre de Biologie du Développement, Université Paul Sabatier Toulouse III. Bâtiment 4R3, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France. <sup>2</sup>CNRS, UMR5547, Centre de Biologie du Développement, Toulouse, France. francois.payre@univ-tlse3.fr

mésenchymateux vers des propriétés épithéliales, ou transition mésenchymo-épithéliale (TME), favorise ensuite la formation de macro-métastases (Figure 1B), largement responsables de la morbidité des cancers [1, 2].

#### Plasticité phénotypique entre épithélium et mésenchyme

Des travaux récents montrent que les transitions entre phénotypes épithéliaux et mésenchyme (TEM et TME) n'agissent pas comme de simples « interrupteurs » entre deux types cellulaires alternatifs [2, 3]. Au contraire, ces transitions progressent par une série d'états intermédiaires, où les cellules présentent des propriétés mixtes entre propriétés épithéliale (E) et mésenchymateuse (M), appelés états hybrides E/M (Figure 1A). Remarquablement, l'existence de ces états hybrides permet une réversibilité des transitions entre caractères épithéliaux et mésenchymateux. On parle ainsi de plasticité épithélomésenchymateuse, un paramètre sans doute fondamental pour la progression tumorale et l'échappement aux thérapies [2, 3]. Élucider comment ces états intermédiaires se forment et se remodèlent en fonction du microenvironnement représente aujourd'hui un enjeu majeur en cancérologie.

#### Les facteurs OvoL dans la plasticité épithéliomésenchymateuse et les cancers

Les nombreuses études réalisées depuis la découverte de la TEM ont permis l'identification des facteurs déclenchant le passage de l'état épithélial à l'état mésenchymateux [1]. Ces facteurs pro-TEM regroupent des facteurs de transcription (Snail, Slug, Zebl, Zeb2, Twist, ...) et leurs micro-ARN régulateurs (miR200, ...). Ensemble, ces facteurs vont promouvoir l'état mésenchymateux et inhiber les

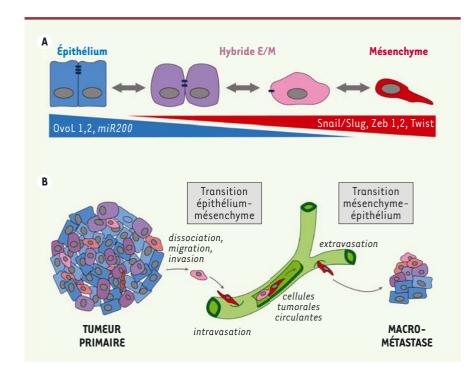


Figure 1. Plasticité épithélium-mésenchyme et progression tumorale. A. Les transitions de l'état épithélial à l'état mésenchymateux (de gauche à droite), ou l'inverse (de droite à gauche), passent par une série d'états intermédiaires réversibles caractérisés par des phénotypes hybrides épithélio-mésenchymateux (E/M). Ces transitions résultent des différentes activités de facteurs de transcription : Snail/Slug, Zeb1,2 et Twist qui déclenchent la TEM, et les facteurs OvoLs qui stabilisent l'état épithélial. B. La transition épithélio-mésenchymateuse favorise la dissociation, migration, l'invasion, l'intravasation et l'extravasation des cellules tumorales. Quand elles atteignent des organes distants, ces cellules cancéreuses engagent une transition mésenchymo-épithéliale, qui accroit leur potentiel prolifératif, pour former des tumeurs secondaires.

propriétés épithéliales, par exemple en réprimant l'expression de la E-cadhérine, un composant essentiel des jonctions cellulaires [1, 2]. Plus récemment, des facteurs qui, au contraire, stabilisent l'état épithélial, viennent d'être identifiés ; en particulier, la famille des facteurs de transcription Ovo-Like (OvoL1/3) [1, 2] est conservée chez tous les animaux et ses membres vont contrebalancer l'activité des facteurs pro-TEM [4]. Les niveaux relatifs entre facteurs pro-TEM d'une part, et facteurs Ovols d'autre part, pourraient ainsi réguler et/ou stabiliser les états hybrides E/M (Figure 1A). Le profilage systématique des tumeurs relie en effet l'expression des facteurs Ovol au potentiel métastatique des carcinomes [4]. D'une manière générale, la réduction de l'expression des facteurs OvoL dans les tumeurs primaires est de très mauvais pronostic. La réexpression artificielle d'une isoforme spécifique du facteur OvoL2 permet d'inhiber la formation de métastases dans des souris greffées avec des cellules de tumeurs mammaires dérivées de patients [5]. Cependant, des travaux de profilage de cellules uniques montrent que les tumeurs secondaires ré-expriment les gènes épithéliaux, ainsi que l'influence à la fois du microenvironnement et de l'infiltration des macrophages sur les transitions entre épithélium et mésenchyme [6]. Il est donc important de comprendre la fonction et le mode d'action des facteurs Ovol in vivo. Chez les vertébrés, l'existence de trois gènes paralogues (Ovol1-3) aux fonctions souvent redondantes, codant chacun différentes isoformes, complexifie malheureusement leur étude fonctionnelle.

#### La drosophile pour étudier la fonction des facteurs OvoL

Bien connue pour son apport à la compréhension des mécanismes de l'hérédité et du développement, la drosophile (*Drosophila melanogaster*)

devient désormais un modèle fécond pour l'étude des altérations génétiques conduisant aux tumeurs [7]. Le génome de la drosophile code un seul gène OvoL, ovo/shavenbaby (svb), le membre fondateur de la famille. Ce gène code trois isoformes protéiques: OvoA et B, qui sont essentielles au développement de la lignée germinale, et la forme somatique Shavenbaby (Svb), qui gouverne la différenciation épithéliale des cellules épidermiques [8, 9].

L'expression de svb est régulée par une large région cisrégulatrice qui intègre de nombreuses voies de signalisation et facteurs de transcription [8]. Svb est traduit sous la forme d'un long répresseur de transcription (SvbREP). La protéine Svb est ensuite partiellement dégradée par le protéasome (Figure 2), conduisant à la libération d'une forme courte qui agit comme activateur de transcription (SvbACT) [10, 11]. Cette maturation post-traductionnelle est induite par les peptides Polished-rice (Pri), fondateurs d'une nouvelle famille de micro-peptides régulateurs traduits à partir d'ARN apparemment non-codants [12]. Dans l'épiderme embryonnaire, SvbACT va induire l'expression d'une batterie de gènes cibles, codant des régulateurs du cytosquelette, des jonctions cellulaires, de la matrice extracellulaire, etc. [13], expliquant son rôle dans le remodelage épithélial.

## Shavenbaby contrôle l'homéostasie des cellules souches adultes

Chez l'adulte, nous venons de découvrir l'expression spécifique de Svb dans les cellules souches digestives,

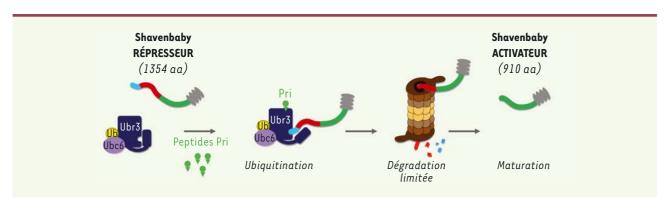


Figure 2. Processus de maturation post-traductionnelle de Shavenbaby. La liaison des micro-peptides Pri à l'ubiquitine ligase Ubr3 permet la fixation du complexe Ubc6/Ubr3 (enzyme de conjugaison E2 et ubiquitine ligase E3) sur la région N-terminale de SvbREP (cyan), conduisant à son ubiquitination, ainsi que la dégradation de la région répresseur (rouge) par le protéasome. Cette maturation produit une protéine tronquée, SvbACT, qui est un activateur de transcription. La région activatrice de la protéine Svb est représentée en vert, le domaine de liaison à l'ADN, en gris.

regroupant cellules souches intestinales et rénales. Les cellules souches digestives de la drosophile ont permis d'identifier de nouveaux facteurs et mécanismes (influence de la nutrition, des infections bactériennes,..), dont l'importance a été par la suite démontrée chez l'homme [7].

Nos travaux montrent que Svb est essentiel à la maintenance des cellules souches adultes [14]. Nous nous sommes d'abord focalisés sur les cellules souches rénales qui sont quiescentes, ce qui permet une analyse quantitative de l'ensemble du compartiment souche (Figure 3A). Les cellules souches digestives sont caractérisées par un phénotype hybride E/M et expriment le cœur des facteurs pro-TEM, i.e., Escargot, Zfh1 (les équivalents respectifs de Snail, Zeb chez la drosophile) dont l'expression est régulée négativement par le micro-ARN miR8 (l'équivalent de miR200) [15]. La surexpression de miR8 suffit à provoquer la disparition des cellules souches qui se différencient massivement en cellules épithéliales [15], montrant l'importance des régulateurs pro-TEM pour le maintien des cellules souches. Si l'inactivation de Svb aboutit aussi à la disparition des cellules souches (Figure 3B), elle n'induit cependant pas leur différenciation précoce mais déclenche leur élimination par apoptose. On voit ainsi que les facteurs pro-TEM et le facteur épithélial Svb n'agissent pas par simple antagonisme, mais au contraire collaborent pour assurer l'homéostasie des cellules souches. Comme au cours du développement, le contrôle post-traductionnel de Svb, effectué par les peptides Pri, est déterminant pour les cellules souches adultes. Ainsi, le blocage de la maturation de Svb conduit à la disparition des cellules souches rénales, qui meurent par apoptose.

#### Shavenbaby interagit avec la voie Hippo

Nos travaux démontrent que, dans les cellules couches adultes, Svb interagit fonctionnellement avec la voie de signalisation Hippo, un régulateur clé de la survie cellulaire. Le médiateur nucléaire de la voie Hippo est la protéine Yorkie (YAP/TAZ, chez les mammifères), qui doit se lier à des facteurs de transcription pour réguler l'expression génique [16]. L'analyse bio-informatique des profils de fixation à la chroma-

tine (ChIP-seq) a permis de montrer que Svb et Yorkie partagent environ 30% de leurs sites de liaison génomique [14]. Remarquablement, l'ADN des gènes cibles de Svb responsables de la différenciation de l'épiderme [9, 13] n'est pas liés par Yorkie. Réciproquement, les séquences des gènes régulés par Yorkie pour contrôler la croissance cellulaire [16] ne sont pas fixées par Svb, suggérant que Svb/Yorkie interagissent spécifiquement pour la maintenance des cellules souches. En effet, nous montrons que les protéines Svb et Yorkie s'associent physiquement pour former un complexe nucléaire qui va directement notamment activer dans les cellules souches l'expression du gène DIAP-1 (Figure 3C), codant l'inhibiteur majeur de l'apoptose.

Ces résultats établissent l'importance in vivo des facteurs OvoL/Svb pour le maintien du caractère « souche », et montrent comment chaque isoforme influe positivement ou négativement sur les cellules souches tumorales. La voie Hippo est impliquée dans différents cancers, et YAP/TAZ interagit aussi avec les facteurs pro-EMT [16] soulignant les relations intimes entre les différents régulateurs de la plasticité épithélio- mésenchymateuse. Nos travaux chez la drosophile aident ainsi à mieux comprendre les mécanismes de survie des cellules souches cancéreuses et de leur résistance aux traitements. Ils ouvrent aussi de nouvelles pistes pour le diagnostic et les thérapies anticancéreuses ciblées. Si, aux premiers stades des cancers épithéliaux, l'inhibition de la TEM peut prévenir l'invasion (par exemple en stimulant l'expression des facteurs OvoL), il faut au contraire inhiber la ré-acquisition des propriétés épithéliales des tumeurs secondaires. Nos résultats montrant le rôle clé des facteurs OvoL dans l'organisation épithéliale et la survie cellulaire renforcent l'intérêt de leur ciblage thérapeutique.

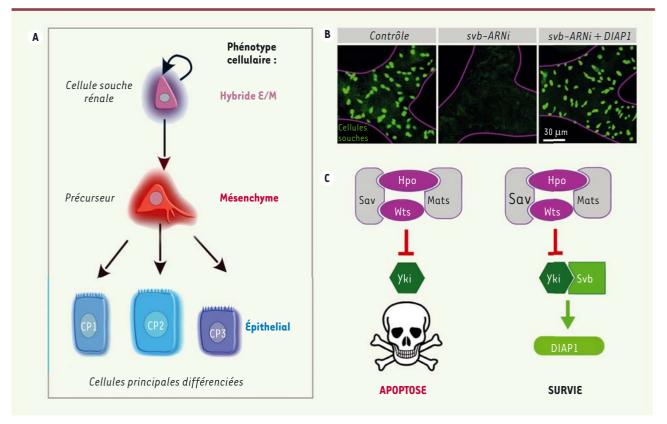


Figure 3. Svb protège les cellules souches rénales de l'apoptose. A. Les cellules souches adultes rénales présentent un phénotype hybride E/M. Elles assurent leur autorenouvèlement et la production d'un précurseur transitoire mésenchymateux, qui va migrer et se différencier en différentes cellules épithéliales principales (CP1,2,3). B. Images de microscopie montrant la disparition des cellules souches rénales (marquées par la GFP [green fluorescent protein], en vert) suite à l'inactivation de Shavenbaby par ARN interférent (ARNi). La restauration concomitante de l'expression de l'inhibiteur d'apoptose DIAP1 suffit à la survie des cellules souches. C. Mode d'action du complexe Svb/Yorkie (Yki) pour activer l'expression de DIAP1 et, ainsi, la maintenance des cellules souches. Hpo, Hippo ; Sav, Salvador ; Wts, Warts ; Mats, Mob as tumor suppressor.

#### **Futures directions**

Une caractéristique des facteurs Ovol est la production de multiples isoformes, présentant des activités différentes, voire antagonistes, y compris dans la progression tumorale [5]. Élucider la fonction des facteurs Ovol nécessitera donc de comprendre l'impact respectif de chaque isoforme sur la plasticité épithéliale, le contrôle des cellules souches, saines et cancéreuses. Grâce à l'accumulation des connaissances et l'utilisation d'outils génétiques bien maîtrisés chez cette espèce, la drosophile pourrait aider à percer les mécanismes respectifs des isoformes Ovol répresseur et activateur. Nous avons entrepris une combinaison d'approches de génomique fonctionnelle et de bioinformatique pour identifier le mode d'action moléculaire de chaque isoforme sur la régulation de l'expression du génome des cellules souches. Par ailleurs, nous analysons à l'échelle du génome entier les relations réciproques entre OvoL/Shavenbaby et les facteurs de remodelage de la chromatine, dont on découvre le rôle dans la plasticité épithélio-mésenchymateuse et les tumeurs [2]. Ces approches intégratives devraient fournir un nouvel éclairage sur les mécanismes

reliant plasticité épithélio-mésenchymateuse et la dynamique des cellules souches cancéreuses, et permettre d'identifier les meilleurs régulateurs à cibler, en fonction des différents stades de cancers, pour une médecine personnalisée. •

#### **SUMMARY**

# OvoL factors: a family of key regulators of epithelium mesenchyme plasticity and stem cells

Most prevalent cancers are of epithelial origin and their morbidity often results from secondary tumors. Cancer aggressiveness relates to intratumoral heterogeneity, including rare tumor initiating cells that share many features with adult stem cells. Both normal and cancer stem cells are characterized by their plasticity between epithelial and mesenchymal phenotypes, progressing through a series of reversible intermediates. While a core of regulators (Snail, Zeb1-2,...) is renowned to promote epithelial to mesenchyme transition (EMT),

OvoL/Shavenbaby factors now emerge as a family of key epithelial stabilizers. Therefore, pro-EMT and OvoL/Shavenbaby transcription factors could provide a molecular rheostat to control stemness and epithelial-mesenchyme plasticity. We address this question in flies, in which the unique OvoL/Shavenbaby factor offers a powerful *in vivo* paradigm for functional analyses. Our results show that Shavenbaby is critical for adult stem cell homeostasis, and directly interacts with the Hippo pathway to protect stem cells from death. •

#### REMERCIEMENTS

Ces travaux sont soutenus par la Ligue contre le cancer (Allocation Doctorale), la Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20170336739) et l'Agence Nationale de la Recherche (ChronoNet).

#### LIENS D'INTÉRÊT

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

#### RÉFÉRENCES

- 1. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. Emt: 2016. Cell 2016; 166: 21-45.
- Gupta PB, Pastushenko I, Skibinski A, et al. Phenotypic plasticity: driver of cancer initiation, progression, and therapy resistance. Cell Stem Cell 2019; 24:65-78.
- Lu W, Kang Y. Epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression and metastasis. Dev Cell 2019; 49: 361-74.
- 4. Jia D, Jolly MK, Boareto M, et al. OVOL guides the epithelial-hybrid-mesenchymal transition.

  Oncotarget 2015; 6: 15436-48.
- 5. Watanabe K, Villarreal-Ponce A, Sun P, et al. Mammary morphogenesis and regeneration require the inhibition of EMT at terminal end buds by Ovol2 transcriptional repressor. Dev Cell 2014; 29: 59-74.

- Pastushenko I, Brisebarre A, Sifrim A, et al. Identification of the tumour transition states occurring during EMT. Nature 2018; 556: 463-8.
- Singh SR, Aggarwal P, Hou SX. Cancer stem cells and stem cell tumors in Drosophila. Adv Exp Med Biol 2019; 1167: 175-90.
- Payre F, Vincent A, Carreno S. ovo/svb integrates Wingless and DER pathways to control epidermis differentiation. *Nature* 1999; 400: 271-5.
- Chanut-Delalande H, Hashimoto Y, Pelissier-Monier A, et al. Pri peptides are mediators of ecdysone for the temporal control of development. Nat Cell Biol 2014; 16: 1035-44.
- Kondo T, Plaza S, Zanet J, et al. Small peptides switch the transcriptional activity of Shavenbaby during Drosophila embryogenesis. Science 2010; 329 336-9
- Zanet J, Benrabah E, Li T, et al. Pri sORF peptides induce selective proteasome-mediated protein processing. Science 2015; 349: 1356-8.
- 12. Plaza S, Menschaert G, Payre F. In search of lost small peptides. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2017; 33: 391-416.
- Menoret D, Santolini M, Fernandes I, et al. Genome-wide analyses of Shavenbaby target genes reveals distinct features of enhancer organization. Genome Biol 2013: 14: R86.
- Bohere J, Mancheno-Ferris A, Al Hayek S, et al. Shavenbaby and Yorkie mediate Hippo signaling to protect adult stem cells from apoptosis. Nat Commun 2018; 9: 5123.
- Antonello ZA, Reiff T, Ballesta-Illan E, Dominguez M. Robust intestinal homeostasis relies on cellular plasticity in enteroblasts mediated by miR-8-Escargot switch. EMBO J 2015; 34: 2025-41.
- Manning SA, Kroeger B, Harvey KF. The regulation of Yorkie, YAP and TAZ: new insights into the Hippo pathway. *Development* 2020; 147: dev179069.

TIRÉS À PART

A. Mancheno-Ferris





Proposés par H. Gilgenkrantz sur

www.medecinesciences.org

## 2000-2010

## LA LIGUE, UN ENGAGEMENT AU FIL DES DÉCENNIES















## 2010-2018

















