

ONCOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

Hugues DE THÉ

Membre de l'Institut (Académie des sciences),
professeur au Collège de France

Mots-clés : oncologie, cancer

La série de cours « Contrôle transcriptionnel de la transformation cellulaire » est disponible, en audio et/ou en vidéo, sur le site internet du Collège de France (<http://www.college-de-france.fr/site/hugues-de-the/course-2015-2016.htm>), ainsi que le colloque « Épigénétique et cancer » organisé en commun avec la chaire « Épigénétique et mémoire cellulaire » (<http://www.college-de-france.fr/site/hugues-de-the/symposium-2015-2016.htm>).

ENSEIGNEMENT

INTRODUCTION

Si la régulation de l'expression des gènes est un aspect essentiel du développement, celle-ci fait également partie intégrante de la transformation cancéreuse. La transcription des gènes fait l'objet de multiples régulations dont les grands principes ont été rappelés. Le cours a ensuite été centré sur l'étude détaillée d'un facteur de transcription particulier, P53. Cette protéine, qui joue un rôle central dans les cancers, agit principalement à travers le contrôle de l'expression des gènes. De ce fait, c'est probablement l'un des facteurs de transcription qui a été le plus étudié, et ce, dans ses aspects les plus divers. En particulier, l'analyse de mutants ponctuels *in vivo*, par les approches de « *knock-in* » dans des modèles de souris, a été particulièrement poussée, faisant de P53 un facteur de transcription modèle.

COURS – CONTRÔLE TRANSCRIPTIONNEL DE LA TRANSFORMATION CELLULAIRE

Les premiers cours ont présenté une large revue des mécanismes généraux de régulation de la transcription (spécificité tissulaire, relations entre facteurs de transcriptions et leurs cibles sur la chromatine, histones et leurs modifications post-

traductionnelles, insulateurs, méthylation de l'ADN). Cette introduction a été conclue par la présentation des cascades d'activation séquentielle, par exemple dans le contrôle de la spéciation cellulaire lors du développement. En vue du colloque, les modifications des histones et les marques épigénétiques sur l'ADN ont été présentées en détail, en particulier celles connues pour être ciblées par la transformation cellulaire. Ainsi, le rôle des enzymes contrôlant l'acétylation et la désacétylation des histones a été exposé, de même que celui des méthylases/déméthylases. Le contrôle de la méthylation et surtout de la déméthylation de l'ADN par les dioxygénases a été abordé. Compte tenu des développements récents dans le domaine du cancer, l'implication des mutations de DNMT3A, TET2, IDH1, WT1 sera traitée en détail dans un cours futur. Nous avons ensuite présenté le fonctionnement général des facteurs de transcriptions : domaines canoniques de reconnaissance de l'ADN, domaines de dimérisation, sites reconnus sur l'ADN. L'intégration des différents signaux par les acétylases de la famille P300, puis le complexe médiateur ont été présentés. Enfin, nous nous sommes attachés à décrire les grands modèles de régulation de l'activité de ces facteurs, par la phosphorylation, la protéolyse, la dimérisation, la liaison de petites molécules à activité hormonale. Nous avons présenté les techniques modernes d'exploration des facteurs de transcription, en particulier l'immuno-précipitation de chromatine et le SELEX, ainsi que leur utilisation pour déterminer les sites consensus de reconnaissance de l'ADN.

Nous avons ensuite abordé l'étude fine d'un facteur particulier, P53, en commençant par le rappel de ses multiples fonctions physiologiques. La diversité de ses fonctions reflète l'extrême variété des gènes cibles. Comment un activateur unique peut-il engendrer un tel spectre de réponses ? Les éléments historiques impliquant directement P53 dans la biogénèse des cancers ont été rappelés, en particulier la liaison de P53 aux protéines virales oncogéniques et sa mutation germinale dans les familles atteintes du syndrome de Li-Fraumeni. L'activation d'un gène cible donné va dépendre de nombreux facteurs. Les quatre principaux sont l'accessibilité et l'affinité intrinsèque de l'élément de réponse et l'abondance de la protéine P53, ainsi que les nombreuses modifications post-traductionnelles qui contrôlent son activité.

L'extrême diversité des gènes cibles est en partie reflétée par la diversité des éléments de réponse. Les analyses récentes de CHIP-Seq ont permis de définir ceux-ci avec précision, sans être biaisées par les éléments canoniques. Les fonctions pro-apoptotiques nécessitent une grande quantité de P53 et correspondent donc à des éléments de faible affinité, alors que les fonctions de contrôle du cycle cellulaire et du métabolique sont activables par des niveaux très faibles de P53. La première manière de réguler l'abondance d'un facteur de transcription est de contrôler l'expression de son gène. Dans le cas de P53, le seul facteur connu à ce jour pour activer la transcription est l'interféron alpha. Néanmoins, l'activité de la protéine P53 est surtout réglée par de très nombreuses modifications post-traductionnelles, qui vont moduler sur la stabilité, la localisation et/ou l'activité intrinsèque de cette protéine. L'importance de cette régulation qualitative de P53 dans les cancers est démontrée par les modulations fréquentes de ces régulateurs (MDM2 et MDM4 sont souvent amplifiés, ARF est très fréquemment perdu ou son gène méthylé).

Alors que l'on pensait que la fonction anti-tumorale de P53 était principalement assurée par ses fonctions de contrôle sur le cycle et sur la mort cellulaire, des travaux récents ont montré qu'il n'en était rien. Au moins chez la souris, les fonctions anticancéreuses de P53 semblent plutôt assurées à travers ses activités sur le

métabolisme, l'autophagie et la protection contre le stress oxydant. Ainsi, un aspect important des recherches sur P53 tient aux liens entre ses différentes modifications post-traductionnelles et les fonctions cellulaires impliquées dans la protection contre le développement des cancers spontanés.

À cette complexité biochimique se superposent des considérations de biologie cellulaire. Celles-ci reflètent la compartimentation au sein de la cellule des différentes interactions et modifications de la protéine P53. Ainsi, ARF est principalement une protéine nucléolaire. En cas d'anomalies de la synthèse des ribosomes ou de stress oxydant, ARF peut sortir du nucléole, inhiber MDM2 et ainsi activer P53. De même, les corps nucléaires PML semblent être des sites particulièrement importants pour l'acétylation et certaines phosphorylations. Ils sont essentiels à l'activation de la sénescence. Enfin, P53 peut cibler la mitochondrie et, par la liaison à sa membrane externe, favoriser l'apoptose. De nombreux variants d'épissage de P53 ont été décrits dans des cellules normales. Les plus étudiés ont été les formes qui ont perdu le site d'interaction avec MDM2. Ils conduisent à une protéine plus stable et, chez la souris, à un vieillissement accéléré. Néanmoins, l'importance physiologique de ces variants n'est pas encore bien comprise.

Le gène P53 est muté dans la moitié des cancers humains. Si l'on y ajoute les anomalies des régulateurs d'amont, qui sont fonctionnellement voisines des mutations, la fonction de P53 est probablement altérée dans la grande majorité des tumeurs. En effet, la perturbation du cycle cellulaire et la résistance à la mort sont des caractéristiques essentielles de beaucoup de cancers. Clairement, les tumeurs ayant des mutations inactivant P53 prolifèrent plus et sont aussi caractérisées par une grande instabilité génomique. Dans le domaine de leucémies, la mutation de P53 est devenue l'un des facteurs majeurs du pronostic. L'existence de mutations « hotspot » suggère l'implication de mécanismes autres que de simples pertes de fonction. Effectivement, l'existence de gains de fonctions de certains de ces mutants a été formellement démontrée chez la souris. Ces gains de fonctions conduisent en particulier à des dérégulations métaboliques et des anomalies de la différenciation qui semblent très importantes dans les tumeurs épithéliales humaines. L'inactivation germinale de P53 est associée à une complète résistance à l'apoptose induite par l'irradiation massive. On pouvait donc imaginer que la réponse à la chimiothérapie serait meilleure chez les tumeurs P53 sauvages. La complexité génétique de celles-ci ainsi que la diversité des traitements anti-tumoraux chez l'homme rendent la réalité beaucoup plus complexe.

Plusieurs polymorphismes génétiques ont été décrits sur l'ensemble de la voie P53 : polymorphismes codants, polymorphismes contrôlant l'expression des régulateurs (MDM2) et polymorphismes contrôlant l'expression des cibles. Il existe un polymorphisme codant sur le codon 72 de P53 avec deux positions possibles R ou P, assez fréquent, selon l'ethnicité de la population. L'allèle PP augmente fortement l'incidence des tumeurs dans les familles présentant des rétinoblastomes familiaux. Il a aussi été lié à la longévité chez des personnes déjà âgées, soulignant la double fonction de P53 anti-cancer et pro-sénescence. Le promoteur de MDM2 joue un rôle dans les tumeurs et le vieillissement, en créant un site supplémentaire pour ETS, ce qui augmente le niveau basal. L'un des allèles favorise la survenue de tumeurs dans des familles présentant une inactivation germinale de P53 (syndrome de Li-Fraumeni). Enfin, un polymorphisme d'un site de liaison à P53 dans le promoteur du ligand du gène Kit augmente le risque de tumeurs de 2,7 par allèle pour les cancers du testicule. Au total, si dans des groupes à très hauts risques de tumeurs ces polymorphismes sont

importants, ils ne le sont pas dans la population générale. Au total, l'importance physiologique de P53 et son implication directe et essentielle dans la cancérogénèse en font l'un des facteurs de transcription les plus étudiés et dont les mécanismes de régulation sont les mieux cernés. De nombreuses recherches sont en cours pour moduler ou restaurer son activité dans les tumeurs humaines.

COLLOQUE – ÉPIGÉNÉTIQUE ET CANCER

L'épigénétique est devenue une part importante, voire essentielle, de certaines affections tumorales. Dans ce colloque (en langue anglaise), organisé conjointement avec Edith Heard et la chaire « Épigénétique et mémoire cellulaire », des spécialistes (Stephen B. Baylin, Stephan Beck, Ronan Chaligné, Manel Esteller, Andrew P. Feinberg, Zachary A. Gurard-Levin, Jean-Pierre Issa, Nada Jabado, Cigall Kadoch, Valérie Lallemand-Breitenbach, Raphaël Margueron, Thomas Mercher, Paolo Salomoni, Henk Stunnenberg) ont exposé des synthèses de la littérature, ainsi que leurs travaux les plus récents dans le domaine. Les aspects technologiques, développementaux, médicaux et thérapeutiques ont été présentés.

COURS À L'EXTÉRIEUR

1) Régulation de l'expression génétique et transformation cellulaire

2) P53, un facteur de transcription modèle

Ces deux cours, destinés aux étudiants de la filière francophone de l'école de médecine de l'université JiaoTong de Shanghai, ont eu lieu au mois de mai 2016. Une coopération très étroite entre l'hôpital Saint-Louis et l'hôpital Rui Jin existe depuis près de trente ans. Ces cours permettent ainsi de maintenir la tradition francophone dans l'un des plus prestigieux hôpitaux de Chine et d'entretenir les liens historiques et scientifiques très forts avec ce site. Dans la suite de l'enseignement dispensé à Paris, ces deux cours ont présenté des notions classiques sur la régulation de l'expression génétique, soulignant les facettes qui sont fréquemment altérées dans les tumeurs. La présentation du P53 était plus ciblée sur les développements récents, en particulier ceux touchant au rôle régulateur des modifications post-traductionnelles de la région C-terminale, comme ceux touchant à l'étude des animaux présentant des modifications ponctuelles (*knock-in*) de ce gène.

RECHERCHE

La leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) est déclenchée par une translocation chromosomique qui conduit à la formation d'une protéine de fusion PML/RARA, nécessaire et suffisante pour la transformation leucémique. PML/RARA est une protéine multifonction qui exerce des effets dominants négatifs aussi bien sur le contrôle de l'expression génétique par RARA que sur la biogénèse des corps nucléaires PML. L'existence de deux agents thérapeutiques découverts par hasard, l'acide rétinoïque et l'arsenic fait la puissance de ce système. L'un et l'autre des médicaments se fixent directement à PML/RARA, changeant profondément ses

fonctions biologiques. L'acide rétinoïque transforme PML/RARA d'un répresseur de l'expression génétique à un activateur de celle-ci. L'arsenic induit l'agrégation de PML et PML/RARA, permettant la reformation des corps nucléaires PML. Enfin, ces deux agents induisent la destruction de PML/RARA par le protéasome. En utilisant des approches pharmacologiques et génétiques, nous avons formellement démontré que la dégradation de PML/RARA est bien responsable de l'éradication définitive de la maladie par la combinaison acide rétinoïque/arsenic. L'éradication de la maladie ne fait pas appel à un programme d'apoptose (mort programmée), mais plutôt à un mécanisme de sénescence (vieillesse accélérée). De manière inattendue, la réponse à l'acide rétinoïque nécessite la présence du gène PML normal, qui est requis pour l'activation de P53, un gène-clé de réponse au stress cellulaire. L'analyse de patients historiques ayant présenté une résistance au traitement a permis de mettre en évidence une mutation de l'allèle normal de PML, démontrant formellement chez l'homme l'implication de PML dans la réponse thérapeutique.

L'équipe a investi beaucoup d'efforts dans la détermination de la fonction normale des corps nucléaires PML. Ces domaines recrutent de nombreuses protéines partenaires et nous avons pu montrer que ce recrutement s'accompagne de modifications post-traductionnelles de ces protéines, modulant alors leur fonction où leur abondance. L'une de ces modifications est la conjugaison du peptide SUMO. À ce titre, de nombreux régulateurs de P53 peuvent être conjugués par le peptide SUMO et sont localisés (au moins transitoirement) dans les corps nucléaires PML. Ceci pourrait donc expliquer l'activation de P53 par ceux-ci. Nos travaux en cours cherchent à comprendre les mécanismes moléculaires impliqués et à identifier des situations pathologiques où, comme dans la LAP, l'activation des corps PML pourrait avoir un bénéfice thérapeutique.

PUBLICATIONS

BALLY C., RENNEVILLE A., PREUDHOMME C., LEGRAND M., ADÈS L., DE THÉ H., FENAUX P. et LEHMANN-CHE J., « Comparison of TP53 mutations screening by functional assay of separated allele in yeast and next-generation sequencing in myelodysplastic syndromes », *Leukemia Research*, vol. 39, n° 11, 2015, p. 1214-1219, DOI : 10.1016/j.leukres.2015.07.001.

DASSOUKI Z., SAHIN U., EL HAJJ H., JOLLIVET F., KFOURY Y., LALLEMAND-BREITENBACH V., HERMINE O., DE THÉ H. et BAZARBACHI A., « ATL response to arsenic/interferon therapy is triggered by SUMO/PML/RNF4-dependent Tax degradation », *Blood*, vol. 125, n° 3, 2015, p. 474-482, DOI : 10.1182/blood-2014-04-572750.

DE CREMOUX P., DALVAI M., N'DOYE O., MOUTAHIR F., ROLLAND G., CHOUCANE-MLIK O., ASSAYAG F., LEHMANN-CHE J., KRAUS-BERTHIE L., NICOLAS A., LOCKHART B.P., MARANGONI E., DE THÉ H., DEPIL S., BYSTRICKY K. et DECAUDIN D., « HDAC inhibition does not induce estrogen receptor in human triple-negative breast cancer cell lines and patient-derived xenografts », *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 149, n° 1, 2015, p. 81-89, DOI : 10.1007/s10549-014-3233-y.

DE THÉ H., « Lessons taught by acute promyelocytic leukemia cure », *The Lancet*, vol. 386, n° 9990, 2015, p. 247-248, DOI : 10.1016/S0140-6736(15)61278-8.

EL HAJJ H., DASSOUKI Z., BERTHIER C., RAFFOUX E., ADES L., LEGRAND O., HLEIHEL R., SAHIN U., TAWIL N., SALAMEH A., ZIBARA K., DARWICHE N., MOHTY M., DOMBRET H., FENAUX P., DE THÉ H. et BAZARBACHI A., « Retinoic acid and arsenic trioxide trigger degradation of mutated NPM1, resulting in apoptosis of AML cells », *Blood*, vol. 125, n° 22, 2015, p. 3447-3454, DOI : 10.1182/blood-2014-11-612416.

GAILLARD C., TOKUYASU T.A., ROSEN G., SOTZEN J., VITALIANO-PRUNIER A., ROY R., PASSEGUÉ E., DE THÉ H., FIGUEROA M.E. et KOGAN S.C., « Transcription and methylation analyses of preleukemic promyelocytes indicate a dual role for PML/RARA in leukemia initiation », *Haematologica*, vol. 100, n° 8, 2015, p. 1064-1075, DOI : 10.3324/haematol.2014.123018.

IVANSCHITZ L., TAKAHASHI Y., JOLLIVET F., AYRAULT O., LE BRAS M. et DE THÉ H., « PML IV/ARF interaction enhances p53 SUMO-1 conjugation, activation, and senescence », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 112, n° 46, 2015, p. 14278-14283, DOI : 10.1073/pnas.1507540112.

LIU X., JIA X., YUAN H., MA K., CHEN Y., JIN Y., DENG M., PAN W., CHEN S., CHEN Z., DE THÉ H., ZON L.I., ZHOU Y., ZHOU J. et ZHU J., « DNA methyltransferase 1 functions through C/ebpα to maintain hematopoietic stem and progenitor cells in zebrafish », *Journal of Hematology & Oncology*, vol. 8, n° 1, 2015, p. 15, DOI : 10.1186/s13045-015-0115-7.

NETTER J., LEHMANN-CHE J., LAMBERT J., TALLET A., LOURENCO N., SOLIMAN H., BERTHEAU P., PARIENTE B., CHIRICA M., POCARD M., ALLEZ M., DE THÉ H. et GORNET J.-M., « Functional TP53 mutations have no impact on response to cytotoxic agents in metastatic colon cancer », *Bulletin du Cancer*, vol. 102, n° 2, 2015, p. 117-125, DOI : 10.1016/j.bulcan.2014.12.010.

YUAN H., WEN B., LIU X., GAO C., YANG R., WANG L., CHEN S., CHEN Z., DE THÉ H., ZHOU J. et ZHU J., « CCAAT/enhancer-binding protein α is required for hepatic outgrowth via the p53 pathway in zebrafish », *Scientific Reports*, vol. 5, n° 15838, 2015, DOI : 10.1038/srep15838.

YUAN H., ZHANG T., LIU X., DENG M., ZHANG W., WEN Z., CHEN S., CHEN Z., DE THÉ H., ZHOU J. et ZHU J., « Sumoylation of CCAAT/enhancer-binding protein α is implicated in hematopoietic stem/progenitor cell development through regulating runx1 in zebrafish », *Scientific Reports*, vol. 5, n° 9011, 2015, DOI : 10.1038/srep09011.

ABLAIN J., POIROT B., ESNAULT C., LEHMANN-CHE J. et DE THÉ H., « P53 as an effector or inhibitor of therapy response », *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 6, n° 1, 2015, a026260, DOI : 10.1101/cshperspect.a026260.

DVORKINA M., NIEDDU V., CHAKELAM S., PEZZOLO A., CANTILENA S., LEITE A.P., CHAYKA O., REGAD T., PISTORIO A., SEMENTA A.R., VIRASAMI A., BARTON J., MONTANO X., LECHERTIER T., BRINDLE N., MORGENSTERN D., LEBRAS M., BURNS A.J., SAUNDERS N.J., HODIVALA-DILKE K., BAGELLA L., DE THÉ H., ANDERSON J., SEBIRE N., PISTOIA V., SALA A. et SALOMONI P., « A promyelocytic leukemia protein-thrombospondin-2 axis and the risk of relapse in neuroblastoma », *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 22, n° 13, 2016, p. 3398-3409, DOI : 10.1158/1078-0432.CCR-15-2081.

FERHI O., PÉRÈS L., TESSIER S., DE THÉ H. et LALLEMAND-BREITENBACH V., « Comment on "SUMO deconjugation is required for arsenic-triggered ubiquitylation of PML" », *Science Signaling*, vol. 9, n° 440, 2016, tc1, DOI : 10.1126/stke.9.440.tc1.

SAHIN U., JOLLIVET F., BERTHIER C., DE THÉ H. et LALLEMAND-BREITENBACH V., « Detection of protein SUMOylation in situ by proximity ligation assays », *Methods in Molecular Biology*, vol. 1475, 2016, p. 139-150, DOI : 10.1007/978-1-4939-6358-4_10.

TESSIER S., MARTIN-MARTIN N., DE THÉ H., CARRACEDO A. et LALLEMAND-BREITENBACH V., « Promyelocytic leukemia protein, a protein at the crossroad of oxidative stress and metabolism », *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 26, n° 9, 2017, p. 432-444, DOI : 10.1089/ars.2016.6898.

RIBET D., LALLEMAND-BREITENBACH V., FERHI O., NAHORI M.-A., VARET H., DE THÉ H. et COSSART P., « Promyelocytic leukemia protein (PML) controls listeria monocytogenes infection », *MBio*, vol. 8, n° 1, 2017, e02179-16, DOI : 10.1128/mBio.02179-16.