

MSA

Médecine
Sciences
Amérique



Revue francophone d'information en sciences de la santé

Numéro Grands Auteurs

Vol.1 n°3



**Médecine
Sciences
Amérique**

NUMERO MSA/GRANDS AUTEURS

Numéro ISSN Médecine Sciences Amérique : 1927-5897

Source de l'image de couverture

Photo de l'oeuvre « Le penseur de Rodin » :

Crédit à l'auteur : Satyakamk, le détenteur des droits sur cette œuvre, la publie sous les licences suivantes : Licence de documentation libre de GNU (CC-BY-SA).

Référence : <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/>, via Wikimedia Commons



Table des matières

	page
Éditorial	
Entrevue éditoriale avec le Dr Alain Beaudet, Président des Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) <i>Danielle Jacques, rédactrice en chef de Médecine Sciences Amérique</i>	1
Nouvelle	
Combattre l'inflammation excessive dans la grippe sévère par l'activation des récepteurs nucléaires PPAR- γ <i>Émilie Gravel, Alexandre Cloutier, Martin V. Richter</i>	7
Revue	
Rôle de l'épididyme dans le contrôle de la fertilité mâle <i>Sylvie Breton et Nicolas Da Silva</i>	14
La persistance du phénomène de la douleur en biomédecine : Quel rôle joue l'identité du médecin ? <i>Sylvie Lafrenaye, Philippe Goffaux</i>	34
Étude de la régulation de l'expression des gènes par réaction de polymérisation en chaîne permise par un adaptateur <i>Josée Lamoureux, Martin Angers, Stéphane Ouellet et Régen Drouin</i>	52
Régulation génique en trois dimensions <i>Christian Lanctôt</i>	75
Rôle du TGF β dans le cancer chez l'humain : de la suppression tumorale vers le développement des métastases <i>Jean-Charles Neel, Laure Humbert, Jean-Jacques Lebrun</i>	87
La médecine personnalisée: le rein d'abord et avant tout <i>Gérard Eugène Plante</i>	114
Les kinases de type Polo : maîtresses du cycle cellulaire et cibles thérapeutiques anti-cancer <i>Xavier Pinson, Vincent Archambault</i>	130
Découverte de modulateurs allostériques peptidiques de récepteurs transmembranaires : focus sur la sélectivité fonctionnelle <i>Christiane Quiniou, Eugénie Goupil, William Lubell, Stéphane Laporte, Sylvain Chemtob</i>	146
L'émergence d'une nouvelle voie de signalisation: PAK-ERK3/4-MK5 <i>Pierre-Luc Tanguay, Paul Déleris* et Sylvain Meloche</i>	162



*Entrevue éditoriale avec le Dr.
Alain Beaudet,
Président des Instituts de
recherche en santé du Canada
(IRSC)*



Alain Beaudet

Par Danielle Jacques, rédactrice en chef de Médecine Sciences Amérique

Dans le cadre de nos entrevues éditoriales, la revue Médecine Sciences Amérique s'est rendue aux bureaux des Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) à Ottawa, afin d'y rencontrer son président, le Dr Alain Beaudet. Voici les points saillants de cette entrevue de type profil-carrière.

Comme vous le savez si bien, Dr Beaudet, la recherche scientifique universitaire est extrêmement exigeante. Qu'est-ce qui a poussé le médecin que vous êtes à faire un Ph. D. pour entamer une carrière de scientifique universitaire?

D'aussi loin que je me souviens, j'ai toujours été intéressé et fasciné par le cerveau et ai voulu en comprendre le fonctionnement. La médecine était à l'époque une des voies d'entrée pour qui était intéressé à la recherche scientifique en santé humaine. J'ai donc fait médecine et,

fasciné par la profession elle-même et les perspectives qu'elle offrait, j'en ai presque oublié les raisons qui m'y avaient amené! Mais la passion pour le cerveau était toujours là et les deux spécialités entre lesquelles j'hésitais étaient, sans surprise, la neurologie, et la psychiatrie. Aucune des



deux, toutefois, ne me satisfaisait pleinement : en psychiatrie, on donnait des médicaments sans toujours bien comprendre où et comment ils agissaient (c'était au début des années '70!), tandis qu'en neurologie, on excellait à des diagnostics très pointus, mais on n'avait que peu de traitements à proposer. Alors que j'hésitais entre ces deux spécialités, j'ai rencontré un jeune chercheur québécois, André-Roch Lecours, qui travaillait alors en recherche en neuropsychologie à l'hôpital de la Salpêtrière à Paris. Mes discussions avec Roch m'ont rappelé mon intention première de faire de la recherche. Comme je m'intéressais particulièrement aux neurotransmetteurs et aux drogues susceptibles d'en modifier la libération, il m'a dirigé vers Laurent Descarries, qui venait alors tout juste d'ouvrir son laboratoire à l'Université de Montréal et qui travaillait sur les amines biogènes, sur

lesquelles agissaient pratiquement tous les médicaments que l'on connaissait en psychiatrie à l'époque. C'était la grande époque où les Suédois venaient de découvrir les neurones à noradrénaline et à sérotonine dans le cerveau. C'était fascinant de pouvoir directement visualiser les sites de synthèse et de libération de ces neurotransmetteurs et d'ainsi mieux comprendre où s'exerce leur action. Et puis voilà, le reste est de l'histoire... J'ai entamé une maîtrise, prévoyant ensuite compléter ma résidence. Et voilà que les résultats sont venus très vite, et que la passion s'est installée. Lorsqu'on m'a offert de poursuivre directement au doctorat, ce qui était une offre exceptionnelle à l'époque, il ne m'est même pas venu à l'idée de refuser. Le doctorat a été suivi de trois années de formation post-doctorales, et la pratique de la médecine devenue pour moi chose du passé; j'étais dans un autre monde...

Où avez-vous fait votre stage postdoctoral?

J'ai fait deux ans de stage à Paris, plus précisément au Centre d'Études Nucléaires de Saclay, dans le laboratoire du professeur Bernard Droz. Ce qui était extraordinaire, c'est que j'avais la possibilité de faire synthétiser tous les composés radioactifs

dont j'avais besoin. C'est ainsi que j'ai pu avoir accès très tôt à des marqueurs tritiés des récepteurs opioïdes...J'ai ensuite passé une année très productive à l'Institut de recherche sur le cerveau de l'université de Zurich, sous la direction de Michel Cuénod.



Ça a été pour moi l'initiation à la recherche multidisciplinaire et au travail en équipe. Quand je suis revenu au Québec, j'ai obtenu un poste de professeur à l'Université McGill. Quel coup de veine de se retrouver chercheur au temple de la neurologie Montralaise où avaient œuvré les Penfield et Jasper, et d'être aux premières loges

pour suivre, au fil des ans les progrès de la neurologie et de l'imagerie cérébrale qui, comme le PET scan ou la résonance magnétique, devaient en modifier profondément les approches diagnostiques. C'était le poste idéal pour ne jamais perdre de vue le lien bidirectionnel entre le laboratoire et le malade.

L'Institut de neurologie est un bien bel endroit pour faire carrière!

Le neuro, c'est la réussite indéniable de l'intégration de la recherche aux soins. Du laboratoire au lit du malade, et du lit du malade au laboratoire. Il n'y avait là ni dichotomie ni hiérarchisation des différents domaines de la recherche scientifique, qu'elle soit fondamentale, appliquée ou clinique. J'ai été témoin de la construction du cyclotron, pour la synthèse de radioisotopes PET, de l'introduction de la génomique appliquée au diagnostic puis aux soins neurologiques, de la chirurgie stéréotactique dirigée par résonance magnétique nucléaire, des premiers essais de thérapie génique, etc. À l'externe, j'ai commencé très tôt à m'intéresser à l'administration de la recherche et à siéger sur des comités d'évaluation par les pairs : au Fonds de la recherche en Santé du Québec, au Conseil de recherches

médicales du Canada (CRM), aux National Institutes of Health (NIH) aux États-Unis, et au Human Frontier Sciences Program à Strasbourg. J'ai également fait partie des comités d'évaluations de diverses fondations privées. J'ai évalué beaucoup de demandes de fonds dans ma vie! Mes rôles à titre de président du Comité des Neurosciences au CRM, puis de Directeur adjoint (recherche) à l'institut neurologique de Montréal m'ont amené à m'intéresser de plus près au développement de la recherche, à l'importance de soutenir l'excellence, et à la nécessité de développer des approches stratégiques pour en assurer l'impact. Ils m'ont aussi amené à apprécier toutes les facettes de la recherche en santé, et à élargir mes horizons, au départ très classiquement biomédicaux.



Qu'est-ce qui vous a poussé à quitter votre brillante carrière de scientifique universitaire au profit de postes administratifs? Que vous apportent ces postes-là?

Ce sont vraiment les circonstances. J'étais heureux dans mon labo. J'ai d'ailleurs refusé des offres de postes administratifs qui m'auraient forcé de ralentir, où d'abandonner ma carrière de scientifique universitaire. De plus, je ne voyais pas comment je parviendrais à juguler des responsabilités administratives à une carrière concurrentielle en recherche. Finalement, le Dr Pierre Boyle, un homme très persuasif, qui était alors directeur général du Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ), m'a convaincu de me joindre à son équipe comme conseiller scientifique. Très tôt, je me suis passionné pour ce que je voyais comme une occasion unique de participer au développement scientifique du Québec. Aussi, lorsque le poste de directeur scientifique du FRSQ s'est libéré et que Pierre m'a demandé d'y poser ma candidature, je n'ai pas hésité. J'ai obtenu, et occupé ce poste pendant plus de trois ans, et ce furent trois belles années.

C'était un peu le meilleur des deux mondes : je partageais mon temps entre la Direction et les tranchées, à savoir mon laboratoire, qui était très actif à l'époque. Le choix déchirant est venu plus tard, lorsque le Ministre Michel Audet m'a offert le poste de Président du FRSQ, et a été très clair que je ne pouvais cumuler ces fonctions avec mon poste universitaire. Cela a été très difficile. Dans l'ensemble de ma carrière, deux décisions ont été pour moi très difficiles à prendre: quitter la clinique pour la recherche et quitter ma carrière de chercheur pour celui d'administrateur de la recherche. Mais je n'ai rien regretté. Les années au FRSQ ont été formidables. J'ai réalisé que l'on pouvait être aussi créatif dans un poste administratif qu'on peut l'être comme chercheur. Car pour moi, la créativité est le moteur de la recherche, comme elle l'est pour les arts. D'ailleurs, les chercheurs ne sont-ils pas un peu des artistes?



Pensez-vous que le beau temps de la recherche médicale est derrière ou devant nous?

Au contraire, je pense que la recherche en santé a un horizon brillant devant elle. C'est vrai que le contexte a changé : vous aurez remarqué que je n'ai pas utilisé le terme recherche médicale, mais celui de recherche en santé. Car la recherche ne doit plus porter uniquement sur la cause et le traitement des maladies, mais aussi sur leur prévention, sur le bien vivre et le bien vieillir. Le vocabulaire des bailleurs de fonds a lui aussi changé : on ne parle plus de subventions, mais d'investissements en recherche. Et qui dit investissements pense retour sur investissements. On parle en effet maintenant beaucoup plus que par le passé d'impact de la recherche, sur la santé et sur le développement économique et social. On ne se satisfait plus de ce que le chercheur fasse progresser les connaissances; on lui demande aussi d'en assurer le transfert. Quand un gouvernement investit plus d'un milliard de dollars de fonds publics en recherche en santé (c'est la contribution du gouvernement fédéral au budget des IRSC) il demande à ce qu'on évalue l'impact de ces investissements. Les soins et services

de santé sont au cœur des préoccupations des Canadiens. Avons-nous mis tout en œuvre pour que la recherche soit parfaitement intégrée aux systèmes de soins, qu'elle réponde aux attentes des patients et des décideurs? Peut-on maximiser l'impact de la recherche sur la qualité des soins? Sur leur accessibilité? Sur leur rapport coûts/bénéfices? Le public doit être mieux informé de l'extraordinaire performance du Canada en recherche en santé et de l'importance de cette recherche pour son système de santé. Il ne s'agit pas ici de faire la chasse aux résultats immédiats où de réduire la liberté académique. Il s'agit de développer des mécanismes pour tirer parti le plus efficacement possible des réussites de la recherche et de former des chercheurs qui sachent en implanter les résultats en pratique. Les Canadiens sont favorables à ce que leurs impôts servent à soutenir la recherche en santé. Nous avons le devoir de faire profiter le public de nos découvertes.



Quel est votre prochain défi? Pourquoi pas ne pas diriger un jour le système de santé au Canada?

Mon défi immédiat, c'est de m'assurer que les divers changements que j'ai initiés ici, aux IRSC, soient solidement implantés et commencent à porter fruit. Ces changements visent, tout d'abord à mieux soutenir l'excellence, et ce dans tous les domaines de recherche en santé. Je voudrais m'assurer que les IRSC répondent à l'ensemble de leur mandat, tel que défini dans la loi qui les a créés. Je veux voir s'établir un équilibre entre la recherche ouverte, qui permet l'expression sans

entraves des meilleures idées et l'éclosion des plus grands talents, et la recherche ciblée, qui vise à répondre à des problèmes spécifiques ou à développer des secteurs émergents. Je veux m'assurer que nos investissements stratégiques portent vraiment fruit; que les provinces, qui ont pour mandat de soutenir les soins et services de santé, pensent spontanément aux IRSC comme partenaire pour améliorer les soins et services à partir de données probantes.

Une dernière question: si vous avez un conseil à donner aux jeunes scientifiques universitaires, quel serait-il?

La recherche scientifique, c'est la plus belle profession au monde. Qu'ils y aillent les yeux fermés. Qu'ils n'aient pas peur. On dit que la carrière scientifique est devenue particulièrement difficile, exigeante, concurrentielle. Je pense qu'elle l'a toujours

été. Donnez-moi une autre profession où l'ensemble des citoyens d'un pays vous offre du financement pour que vous puissiez satisfaire votre curiosité tout en contribuant au bien commun. Il n'y en a pas beaucoup!



Nouvelle

**Combattre l'inflammation excessive dans la
grippe sévère par l'activation des récepteurs
nucléaires PPAR- γ**

PPAR- γ activation reduces hypercytokinemia during severe influenza

Émilie Gravel, Alexandre Cloutier, Martin V. Richter

Service de pneumologie, Département de médecine, Faculté de médecine et des sciences de la santé,
Université de Sherbrooke et Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel, Sherbrooke (Québec) Canada.

Auteur-ressource :
Martin Richter Ph. D.
Service de pneumologie
Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel
3001, 12e Avenue Nord
Sherbrooke (Québec) Canada J1H 5N4
Téléphone : (819) 346-1110 Poste 1-3834
Fax : (819) 564-5377
Courriel : Martin.Richter@USherbrooke.ca



Martin V. Richter

Article reçu le : 9 février 2012
Article accepté le : 2 avril 2012



La grippe et les traitements actuels

Chaque année, l'influenza cause des centaines de milliers de victimes dans le monde. Ayant une grande capacité de mutation, les virus influenza A ont causé plusieurs pandémies au cours de l'histoire, dont la récente pandémie d'influenza A H1N1 de 2009. Il existe plusieurs sous-types de virus influenza A, classifiés selon le type d'hémagglutinine et de neuraminidase qu'ils possèdent [1]. Deux classes d'antiviraux sont principalement utilisées pour combattre l'influenza : les inhibiteurs du canal ionique M2 (amantadine et rimantadine) et les inhibiteurs de la neuraminidase (zanamivir et oseltamivir [Tamiflu]) [1]. Ces médicaments ciblent des protéines virales, mais plusieurs souches de virus y sont devenues résistantes. Afin de développer un traitement universel qui n'entraînerait pas le développement de résistance, il s'avère essentiel de bien comprendre le fonctionnement du virus et la maladie.

Les bons et les mauvais côtés de l'inflammation

À cet égard, la morbidité et la mortalité causées par l'infection avec les virus hautement pathogènes (p.ex. : H5N1 et H1N1 pandémique) sont associées avec une surproduction de cytokines pro-inflammatoires (hypercytokinémie), telles IL-1 β , IL-6, TNF α , CCL2, IFN β , IFN γ et CCL5 [2, 3]. La production de ces médiateurs permet le recrutement et l'activation de cellules inflammatoires dans les voies respiratoires à la suite de l'infection. La migration de ces cellules est nécessaire pour contrôler l'infection, mais lorsqu'elles sont présentes en grande quantité, elles peuvent aggraver la maladie. Par contre, aucune des cytokines mentionnée n'est responsable à elle seule des effets délétères causés par l'infection : les souris déficientes en l'une ou l'autre des cytokines n'étaient pas protégées lors d'une infection létale [1]. Une autre étude a montré que les souris déficientes en cyclooxygénase 2 (COX-2) ont un taux de mortalité plus faible, moins d'inflammation pulmonaire et ceci malgré des titres viraux plus élevés [4]. Ces résultats montrent que la sévérité de la maladie n'est pas seulement déterminée par la charge virale, mais aussi par la réponse



inflammatoire induite. Inhiber une voie de régulation contrôlant la production de plusieurs cytokines permettrait d'empêcher l'hypercytokinémie et ainsi, de diminuer la gravité de la maladie. De plus, le fait de cibler une voie de signalisation de l'hôte plutôt que de cibler directement le virus permettrait d'éviter que celui-ci ne mute pour devenir résistant au traitement.

Le contrôle de l'inflammation

Deux voies de signalisation sont particulièrement importantes pour contrôler l'inflammation : la voie de NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*) et celle des récepteurs nucléaires PPARs (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*). D'une part, NF- κ B induit l'expression de plusieurs cytokines et participe à la propagation du virus en permettant l'exportation des ribonucléoprotéines virales hors du noyau. Il a été montré que l'acide acétylsalicylique (aspirine), à fortes doses, inhibe la kinase IKK2 (*Inhibitor of Nuclear Factor kappa-B Kinase 2*) ce qui diminue l'expression de gènes contrôlés par NF- κ B et bloque la réplication de plusieurs souches de virus [5]. En effet, l'administration d'aspirine à fortes doses permet de protéger 60% des souris d'une infection létale par un virus de type H7N7 [5]. À l'opposé, une étude par

Droebner, *et al.* a montré qu'après une infection par un virus de type H5N1, le processus d'hypercytokinémie ne s'est pas produit au niveau des poumons de souris déficientes en sous-unité p50 de la voie NF- κ B. Malgré cela, la survie des animaux n'a pas été affectée par rapport aux souris contrôles [6]. D'autre part, la famille PPARs comprend trois membres : PPAR- α , PPAR- β/δ et PPAR- γ . Plusieurs études ont montré l'importance des PPARs dans la résolution de l'inflammation [7]. Tout d'abord, les agonistes PPARs inhibent la maturation des cellules dendritiques, c'est-à-dire les cellules présentatrices d'antigènes qui stimulent la réponse immunitaire adaptative en activant les lymphocytes T. Leur inhibition diminue donc la réponse spécifique des lymphocytes T. Les agonistes PPARs peuvent aussi limiter le recrutement de cellules inflammatoires en diminuant l'expression de cytokines et de chimiokines dans les cellules épithéliales et les macrophages, ainsi que des molécules d'adhésion dans les cellules endothéliales.



L'activation de PPAR- γ protège contre la grippe sévère

Dans l'optique de diminuer l'inflammation, nous avons testé si la 15-deoxy $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ (15d-PGJ₂), un activateur de PPAR- γ et un inhibiteur de NF- κ B, diminue la mortalité et la morbidité liées à l'infection par le virus de l'influenza. Ainsi, nous avons démontré dans une étude récente, publiée dans le *Journal of Infectious Diseases*, que l'administration de 15d-PGJ₂ diminue la morbidité et la mortalité associées à une infection sévère par un virus de l'influenza de type H1N1 chez des souris [8]. Nos résultats ont montré que le traitement avec la 15d-PGJ₂ (250 μ g/kg/jour), débutant 24h post-infection et ayant une durée de 7 jours, augmente la survie des souris infectées avec 1×10^3 PFU (*plaque-forming unit*, c'est-à-dire le nombre de particules infectieuses formant des plages de lyse) de la souche H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (PR8). En effet, 79,2% des souris traitées ont survécu comparativement à 13,7% des souris contrôles. De plus, la perte de poids (marqueur de morbidité) est aussi moins élevée chez les souris ayant reçu la 15d-PGJ₂ (2,2% au jour 5 post-infection) par rapport aux souris contrôles

(15,9%). Ces effets bénéfiques s'expliquent, d'une part, par une moins grande charge virale et, d'autre part, par une réduction de la réponse inflammatoire. En effet, les souris traitées montrent une réduction des titres viraux de 3,1 fois par rapport aux contrôles. Toutefois, l'effet antiviral de la 15d-PGJ₂ n'est pas direct puisque le composé ne diminue pas la réplication du virus PR8 lors d'essais d'infection *in vitro*. Quant à l'expression des cytokines IL-6, TNF- α , CCL2, CCL3 et CXCL10, elle est diminuée de moitié chez les souris traitées avec la 15d-PGJ₂, comparativement aux souris infectées non traitées. Par contre, l'expression des IFN- α , - β et - γ n'est pas affectée, ce qui indique qu'une défense antivirale est maintenue lors du traitement. L'expression résiduelle des cytokines et des interférons est importante puisqu'elle contribue à freiner la réplication virale, résultant en un plus grand taux de survie des souris. De plus, nous avons montré pour la première fois que la protection apportée par la 15d-PGJ₂ est médiée par l'activation des récepteurs PPAR- γ . En effet, le prétraitement des souris avec le GW9662, un antagoniste de PPAR- γ , avant l'administration quotidienne de 15d-PGJ₂ élimine tous les bienfaits de celle-ci; les souris prétraitées avec l'antagoniste



présentent un taux de mortalité et de morbidité équivalent aux souris contrôles.

Nos résultats montrent que l'activation de PPAR- γ est une cible prometteuse dans le but de traiter la maladie puisqu'elle diminue l'inflammation (mode d'action résumé dans la **Figure 1**).

De façon intéressante, d'autres études ont également montré que l'utilisation prophylactique de deux agonistes PPAR- γ , soit la rosiglitazone, soit la pioglitazone, diminue la morbidité et la mortalité à la suite d'une infection létale par le virus PR8 [9, 10]. Contrairement à notre étude, les auteurs de ces articles n'ont toutefois pas démontré l'implication de PPAR- γ dans l'effet protecteur de ces molécules. Par contre, ils ont montré que la pioglitazone exerce son effet protecteur en réduisant l'expression de la chimiokine CCL2, ce qui diminue le recrutement d'un type de cellules dendritiques nommées tipDCs (*TNF- α /inducible nitric oxide synthase (iNOS)-producing DCs*) [9]. L'élimination totale du

recrutement des tipDCs n'est toutefois pas bénéfique, car ces cellules présentent les antigènes viraux aux lymphocytes T CD8. Sans les tipDCs, le nombre de lymphocytes T CD8 activés est insuffisant et ne permet pas de contrôler l'infection. Il est à noter qu'aucune différence significative n'est observée entre les titres viraux retrouvés dans les lavages broncho-alvéolaires des souris traitées avec la pioglitazone et ceux des souris contrôles. Ces résultats montrent qu'une utilisation en prophylaxie protège contre une infection létale, mais n'indique pas si ces traitements peuvent diminuer la sévérité de la maladie après l'infection. À l'inverse, nos résultats montrent que la 15d-PGJ₂ protège les souris uniquement lorsque celles-ci sont traitées après l'infection. En effet, un prétraitement avec la 15d-PGJ₂ empêche la génération d'une réponse inflammatoire précoce nécessaire à la survie des souris. Lors d'une infection, la 15d-PGJ₂ semble donc être une meilleure option thérapeutique que les autres agonistes PPAR- γ testés jusqu'à présent.

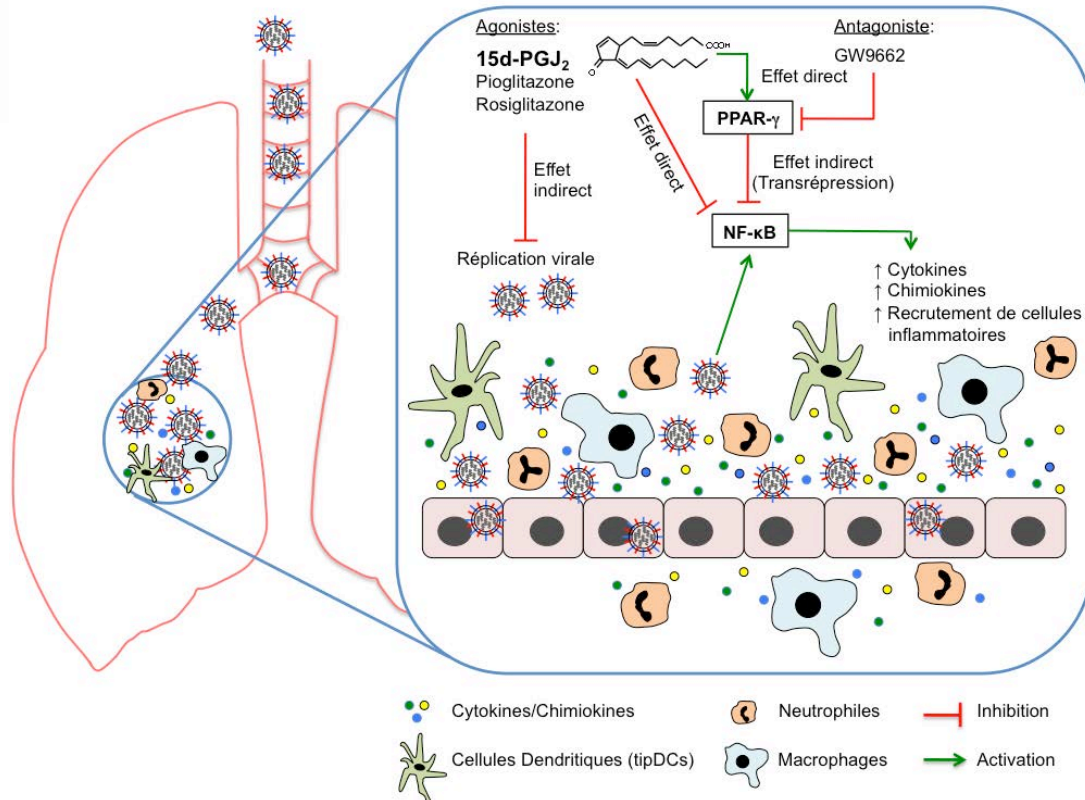


Figure 1. Mécanismes d'action des agonistes PPAR-γ dans la protection contre la grippe.

L'infection par le virus de l'influenza entraîne l'activation du facteur de transcription NF-κB ce qui induit une production massive de cytokines et de chimiokines. Cela entraîne le recrutement de cellules inflammatoires, tels les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques (tipDCs) dans les voies respiratoires. Lors du traitement, la 15d-PGJ₂ active PPAR-γ (effet direct) et inhibe NF-κB (effet direct ou indirect

par transrépression, c'est-à-dire que l'inhibition de la transcription des gènes a lieu via une interaction protéine-protéine entre le récepteur nucléaire PPAR-γ et le facteur de transcription NF-κB) ce qui diminue l'inflammation. De plus, la 15d-PGJ₂ diminue la réplication virale dans les poumons de souris (effet indirect). Quant à l'antagoniste de PPAR-γ (GW9662), il bloque tous les effets bénéfiques de la 15d-PGJ₂.

Conclusion

En conclusion, la 15d-PGJ₂ ou d'autres agonistes PPAR-γ pourraient diminuer la sévérité de la maladie et donc être efficaces pour soigner les patients infectés par le virus de la grippe. De plus, par leur mode

d'action, ces agonistes pourraient aussi être utiles pour traiter d'autres infections caractérisées par une inflammation excessive.



Conflits d'intérêts

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

Ces travaux ont été appuyés financièrement par les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC; octroi MPO-1026770).

Références

1. Salomon R, Webster RG. The influenza virus enigma. *Cell* 2009; 136: 402-10.
2. de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, *et al.* Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med* 2006; 12: 1203-7.
3. Kash JC, Tumpey TM, Proll SC, *et al.* Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus. *Nature* 2006; 443: 578-81.
4. Carey MA, Bradbury JA, Seubert JM, *et al.* Contrasting effects of cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 deficiency on the host response to influenza A viral infection. *J Immunol* 2005; 175: 6878-84.
5. Mazur I, Wurzer WJ, Ehrhardt C, *et al.* Acetylsalicylic acid (ASA) blocks influenza virus propagation via its NF-kappaB-inhibiting activity. *Cell Microbiol* 2007; 9: 1683-94.
6. Droebner K, Reiling SJ, Planz O. Role of hypercytokinemia in NF-kappaB p50-deficient mice after H5N1 influenza A virus infection. *J Virol* 2008; 82: 11461-6.
7. Yessoufou A, Wahli W. Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. *Swiss Med Wkly* 2010; 140: w13071.
8. Cloutier A, Marois I, Cloutier D, *et al.* The prostanoid 15-deoxy-(delta)12,14-prostaglandin-j2 reduces lung inflammation and protects mice against lethal influenza infection. *J Infect Dis* 2012; 205: 621-30.
9. Aldridge JR, Jr., Moseley CE, Boltz DA, *et al.* TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 5306-11.
10. Moseley CE, Webster RG, Aldridge JR. Peroxisome proliferator-activated receptor and AMP-activated protein kinase agonists protect against lethal influenza virus challenge in mice. *Influenza Other Respi Viruses* 2010; 4: 307-11.



Rôle de l'épididyme dans le contrôle de la fertilité mâle

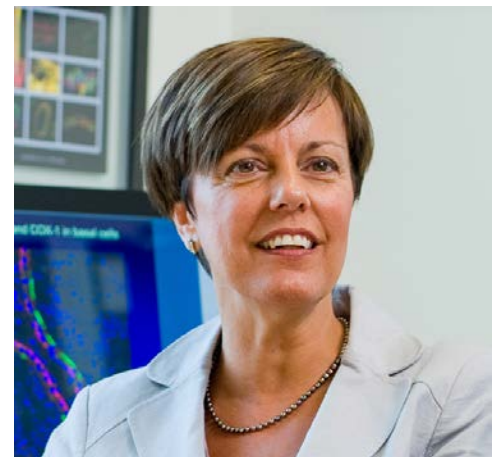
Role of the epididymis in the control of male fertility

Sylvie Breton et Nicolas Da Silva

Center for Systems Biology, Program in Membrane Biology/Nephrology Division, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

Correspondance:
Dr. Sylvie Breton
Program in Membrane Biology
Massachusetts General Hospital
Simches Building
185 Cambridge St, Suite 8.204
Boston, MA 02114
USA

Tél: 617-726-5785
Courriel: Breton.sylvie@mgh.harvard.edu



Sylvie Breton

Article reçu le : 5 avril 2012
Article accepté le : 20 juin 2012



Résumé

Les spermatozoïdes sont immatures à leur sortie des testicules, et c'est dans l'épididyme qu'ils acquièrent leur pouvoir fertilisant. L'épididyme est formé d'un long tubule dont la lumière est tapissée d'un épithélium pseudo-stratifié composé de plusieurs types cellulaires et enveloppé d'un réseau de cellules dendritiques. Les cellules épithéliales et dendritiques établissent un milieu luminal favorisant la maturation, la concentration, la protection, la préservation et le stockage des spermatozoïdes. Cette revue fait état de nos connaissances actuelles sur le rôle clef joué par l'épididyme dans le maintien et la régulation de la fertilité mâle.

Summary

The testis produce immature spermatozoa, and it is in the epididymis that they acquire their fertilizing capacity. The epididymis is formed by a long convoluted tubule whose lumen is lined by a pseudo-stratified epithelium. A dense network of dendritic cells is also present on the basolateral side of the epithelium. Epithelial cells and dendritic cells contribute to forming the blood-epididymis barrier, which establishes a unique luminal environment conducive to the maturation, concentration, protection and storage of spermatozoa. This review article discusses selected aspects of transepithelial transport mechanisms and immunological processes in the epididymis, which all contribute to the establishment of male fertility.



Introduction

L'infertilité est un problème mondial croissant qui affecte maintenant de 10 à 20% des couples qui souhaitent fonder une famille [1-3]. Chez près de la moitié de ces couples, l'infertilité est causée par des problèmes d'origine masculine. L'établissement de la fertilité chez les hommes dépend de plusieurs facteurs, incluant la production de spermatozoïdes par les testicules et leur maturation dans le tractus reproducteur mâle. A leur sortie des testicules, les spermatozoïdes sont en effet

immatures, et c'est en aval, dans l'épididyme, qu'ils vont acquérir leur pouvoir de fécondation. L'épididyme, qui coiffe le testicule, est formé d'un long tubule dans lequel les spermatozoïdes sont transportés pendant une période qui varie de 5 à 20 jours. Chez les rongeurs, ils sont stockés dans la partie distale de l'épididyme pendant une période allant jusqu'à plusieurs mois sans être dégradés, et ils sont délivrés dans le canal déférent au moment de l'éjaculation (**Figure 1**).

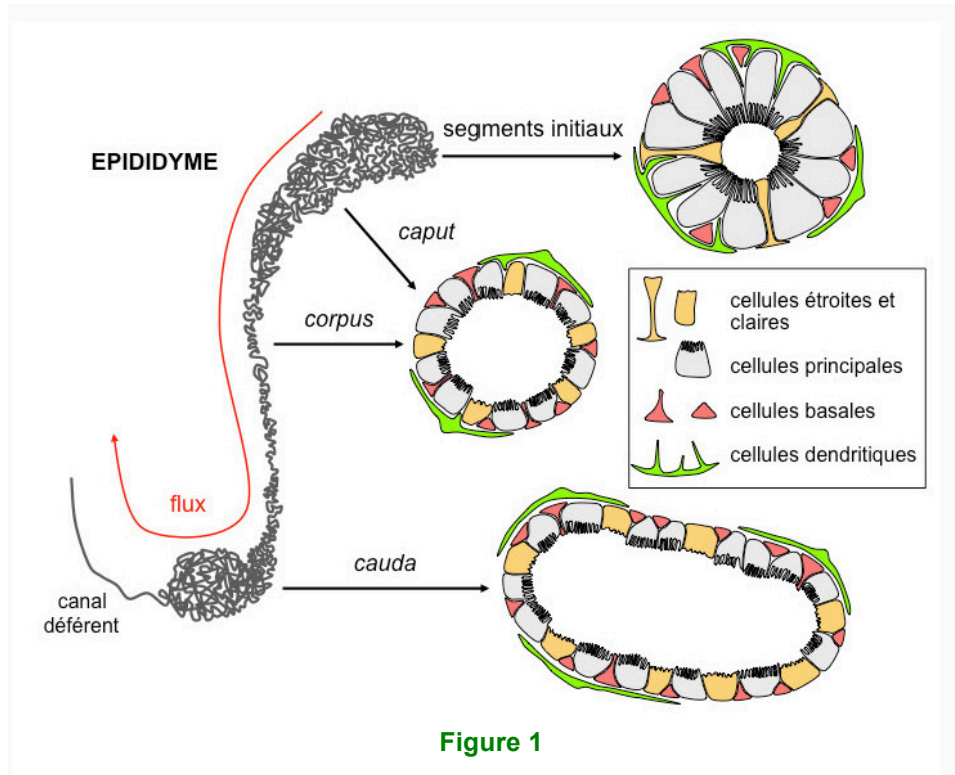


Schéma représentatif de l'épididyme de la souris et du rat, montrant les différents segments et illustrant les différents types de cellules épithéliales et les cellules dendritiques.



L'infertilité masculine est causée soit par une production déficiente de spermatozoïdes ou d'androgènes (problème testiculaire), soit par une maturation ou un transport inadéquats (problème d'origine post-testiculaire). Ces déficiences post-testiculaires induisent la production de spermatozoïdes qui ont une faible mobilité les empêchant d'aller à la rencontre de l'ovule, et/ou un pouvoir fécondant affaibli [4, 5]. Ces fonctions cruciales sont acquises dans la lumière du tubule épидидymaire [6-11]. L'épididyme est divisé en quatre régions distinctes qui ont chacune des morphologies et fonctions spécifiques: les segments initiaux (présents chez les rongeurs), caput, corpus et cauda (**Figure 1**).

Chez l'humain, les segments initiaux sont considérés absents, bien que la présence d'un segment comportant des caractéristiques morphologiques semblables à celles des segments initiaux de rongeurs ait été démontrée [7]. De plus, la cauda de l'épididyme humain est moins bien développée que dans l'épididyme de rongeurs, indiquant une fonction d'entreposage réduite chez l'homme [10, 12, 13]. La lumière épидидymaire est tapissée d'un épithélium pseudo-stratifié composé de quatre types cellulaires : les cellules

basales, étroites, claires et principales, dont la fonction est d'établir un milieu luminal optimal pour la maturation et conservation des spermatozoïdes [6-8, 14, 15]. De plus, notre laboratoire a récemment montré la présence de cellules de type dendritique formant un réseau intercellulaire qui enveloppe l'épithélium épидидymaire [16]. Une autre fonction importante de l'épididyme est de protéger les spermatozoïdes du système immunitaire de l'homme tout en se protégeant lui-même des pathogènes externes. Les cellules dendritiques de l'épididyme sont des candidates de choix pour ces fonctions immunologiques complémentaires. Cette revue décrit comment les cellules épithéliales et dendritiques de l'épididyme travaillent ensemble pour établir un milieu favorable à la maturation, protection, concentration, et conservation des spermatozoïdes, processus qui sont déterminants pour l'établissement de la fertilité masculine. Les facteurs impliqués dans la régulation de la barrière hémato-épидидymaire ne seront pas décrits ici, mais nous référons le lecteur à des revues publiées précédemment sur ce sujet [17, 18]. Il est important de noter que l'état actuel de nos connaissances a été acquis principalement grâce à la recherche faite sur



les animaux de laboratoire. Or il existe des différences significatives entre l'épididyme humain et celui des rongeurs, ce qui limite parfois l'application de ces connaissances à une meilleure compréhension de la fertilité humaine.

Processus acidifiants dans l'épididyme

Le liquide luminal de l'épididyme est maintenu à un pH acide de 6.6-6.8 et possède une faible concentration d'ions bicarbonate [19, 20]. Ces facteurs contribuent à maintenir les spermatozoïdes dans un état de dormance pendant leur séjour dans l'épididyme [21]. En revanche, le fluide sécrété par les vésicules séminales et le système reproducteur féminin contient une concentration élevée de bicarbonate, ce qui contribue à activer les spermatozoïdes, un processus nommé capacitation. En effet, une enzyme directement activée par le bicarbonate, l'adenylate cyclase soluble (sAC), est présente dans les spermatozoïdes [22]. Cette enzyme catalyse

la production d'AMP cyclique (cAMP), conduisant à la phosphorylation par la protéine kinase A de plusieurs protéines spermatiques essentielles à la capacitation [23].

L'importance de l'établissement d'un milieu acide dans la lumière épидидymaire a été clairement démontrée dans des modèles animaux. En effet, l'inactivation des gènes *c-ros* et *Foxi1* chez la souris conduit à l'infertilité mâle suite à l'établissement d'un pH trop alcalin dans le fluide luminal de l'épididyme [24-26]. Tandis que ces souris produisent un nombre suffisant de spermatozoïdes, ceux-ci ont une mobilité fonctionnelle et un pouvoir de fécondation affaiblis. Chez les hommes, des évidences secondaires indiquent le rôle d'un pH épидидymaire acide dans l'établissement de la fertilité. Par exemple, certains facteurs environnementaux, tels la fumée de cigarette et les métaux lourds qui inhibent les processus acidifiants luminaux de l'épididyme [27, 28], réduisent également la fertilité masculine [29, 30].



Sécrétion de protons par les cellules étroites et claires

Le facteur de transcription Foxi1 est exprimé spécifiquement par les cellules étroites et claires de l'épididyme où il contrôle l'expression de la pompe à protons, V-ATPase [25]. Cette enzyme utilise l'énergie de l'ATP pour sécréter des protons à travers la membrane plasmique de cellules spécialisées, telles les cellules claires de l'épididyme, qui contribuent à acidifier le liquide luminal épидидymaire [31, 32]. Ainsi, la V-ATPase est localisée dans le

pôle apical des cellules claires (**Figure 2**; couleur verte). La sécrétion de protons par les cellules claires est activée par une accumulation de la pompe V-ATPase dans la membrane plasmique, suite à la fusion de vésicules intracellulaires riches en V-ATPase avec la membrane apicale [8]. La sécrétion de protons par la V-ATPase dépend de plusieurs facteurs incluant le remodelage du cytosquelette [33, 34] et l'activation des voies de signalisation intracellulaires par la cAMP et le GMP cyclique (cGMP) [35, 36].

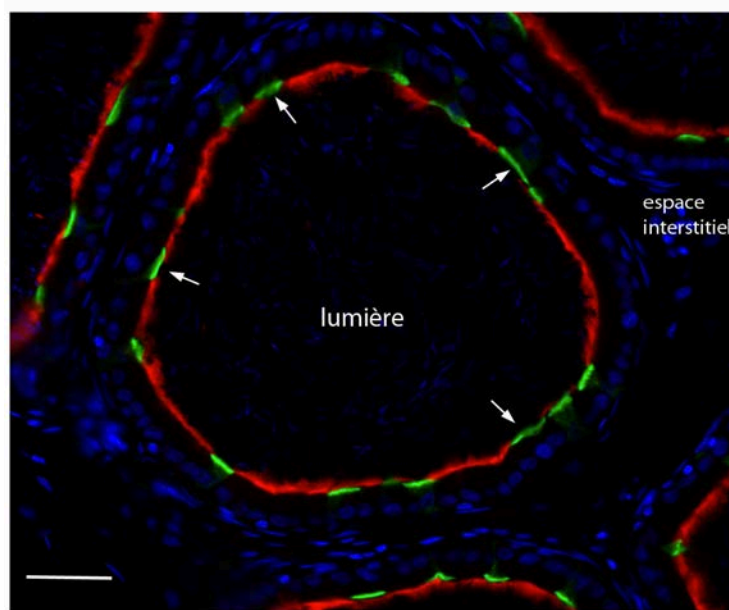


Figure 2

Double-marquage en immunofluorescence d'une coupe de la cauda de l'épididyme de rat.

Les cellules claires expriment la V-ATPase (couleur verte) dans leur pôle apicale (flèches), et les cellules principales expriment l'aquaporine 9 (couleur rouge) sur leur membrane apicale.

Les noyaux et spermatozoïdes sont colorés en bleu avec le marqueur de l'ADN, DAPI.

Barre = 50 μ m.



Ces processus de régulation dépendent d'une étroite collaboration entre les différents types cellulaires de l'épididyme. Une augmentation de la concentration de bicarbonate dans la lumière tubulaire active l'enzyme sAC qui est abondamment exprimée dans les cellules claires (**Figure 3**). La cAMP produite par sAC active à son tour la protéine kinase A induisant ainsi l'accumulation de la V-ATPase dans la membrane apicale par voie de recyclage des vésicules riches en V-ATPase, suivie d'une augmentation de la sécrétion de protons [37]. Il est intéressant de constater que sAC est en fait l'enzyme qui permet aux spermatozoïdes de s'activer au moment de l'éjaculation, mettant en lumière le rôle important des bicarbonates dans la régulation de la fertilité masculine. Dans la cauda de l'épididyme, les ions bicarbonate sont sécrétés dans le milieu luminal par les cellules principales lors de l'excitation sexuelle [38, 39]. Une augmentation transitoire de la concentration de bicarbonate dans la lumière épididymaire contribue à "pré-activer" les spermatozoïdes avant l'éjaculation. Il est toutefois essentiel que le milieu luminal réintègre ses paramètres de pH acide et de faible concentration de bicarbonate afin d'éviter que les spermatozoïdes n'épuisent leur

réserve d'énergie pendant leur séjour dans l'épididyme. L'activation des cellules claires consécutive à la sécrétion de bicarbonate par les cellules principales est donc un processus essentiel à la préservation et la survie des spermatozoïdes épididymaires. D'autre part, la signalisation par les voies du cGMP joue aussi un rôle important dans la régulation des cellules claires. Ce processus est le fruit d'une interaction étroite entre les spermatozoïdes, les cellules basales et les cellules claires [36] (**Figure 3**).

Bien que les cellules claires puissent être activées du côté apical par l'ANGII, ces cellules n'expriment aucun des récepteurs à l'ANGII [36]. Comment donc peuvent-elles être modulées par l'ANGII luminal? En cherchant la cible potentielle de l'ANGII, nous avons démontré une propriété nouvelle des cellules basales. Contrairement à ce que leur nom indique, ces cellules projettent de longues et étroites extensions cytoplasmiques vers la lumière de l'épididyme. Ces extensions peuvent traverser au besoin la barrière hémato-épididymaire formée par les cellules épithéliales. Le récepteur de l'ANGII de type II est exprimé par les cellules basales, leur permettant de détecter l'ANGII dans le milieu luminal. L'interaction de l'ANGII avec

son récepteur induit la production de monoxyde d'azote (NO) dans les cellules basales, qui diffuse ensuite dans le compartiment extracellulaire pour atteindre les cellules claires où il active la guanylate cyclase. La génération de cGMP conduit à l'accumulation de la V-ATPase sur la membrane apicale et activation de la sécrétion de protons par les cellules claires. En somme, l'ensemble de ces résultats a

mis en lumière un réseau de communication intercellulaire complexe impliquant les spermatozoïdes, les cellules basales et les cellules claires et permettant aux spermatozoïdes de "signaler leur présence" aux cellules claires, par l'intermédiaire des cellules basales, afin de maintenir le milieu acide favorable à leur conservation dans un état de quiescence.

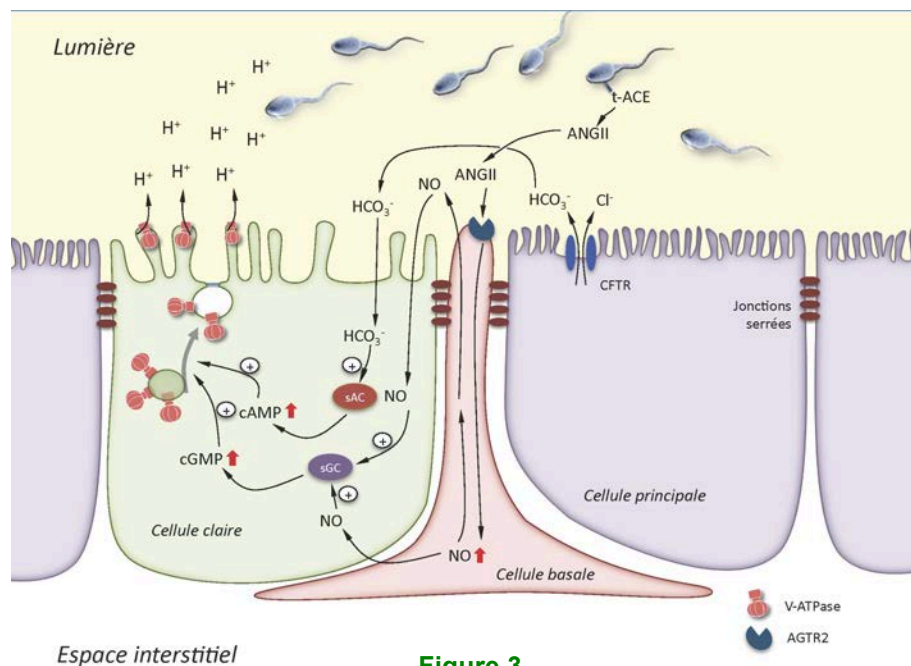


Figure 3

Schéma montrant les différents réseaux de communication entre les cellules principales, les cellules basales, les spermatozoïdes et les cellules claires. Ces différents mécanismes jouent un rôle important dans l'activation de la sécrétion de protons par la V-ATPase qui est exprimée dans les cellules claires. V-ATPase: pompe à protons de type vacuolaire, CFTR: *cystic fibrosis transmembrane conductance*

regulator, ANGII: angiotensine II, t-ACE: enzyme de conversion de l'angiotensine de type testiculaire, HCO_3^- : ion bicarbonate, Cl^- : ion chlore, NO: monoxyde d'azote, sGC: guanylate cyclase soluble, sAC: adenylylate cyclase soluble, cGMP: GMP cyclique, cAMP: AMP cyclique. D'après Shum et al. Cell, 2008, et Shum et al. Journal of Andrology 2011.



Transport d'eau

Une autre fonction importante de l'épididyme est reliée au transport transépithélial d'eau [42]. Dans les parties proximales de l'épididyme - les segments initiaux et la caput - la réabsorption d'eau permet d'éliminer le surplus des sécrétions testiculaires et de concentrer les spermatozoïdes. La réabsorption d'eau permet également d'établir un milieu hypertonique dans la lumière épидидymaire. Il est intéressant de constater que l'hypertonie épидидymaire varie beaucoup d'une espèce animale à l'autre (de 360 à 1500 mOsm) et atteint des niveaux plus élevés chez les espèces hibernantes. Ce facteur semble en effet contribuer à la conservation prolongée des spermatozoïdes pendant l'hibernation. Dans la partie distale - la cauda - où les spermatozoïdes sont conservés, une sécrétion d'eau permet de moduler la viscosité du milieu luminal épидидymaire [43]. Le transport d'eau est effectué par les cellules principales qui expriment des protéines transmembranaires spécialisées, les aquaporines [42]. Celles-ci forment une famille de 13 protéines (AQP0-12) dont certaines sont sélectives à l'eau (AQP0,1,2,4,5,6 et 8) tandis que les AQP3,7,9 et 10 sont également perméables à certaines substances neutres, tel le

glycérol. Les cellules principales de l'épididyme expriment fortement l'AQP9 dans leur membrane apicale (**Figure 2**; couleur rouge), et l'AQP7 dans leur membrane basolatérale [44]. Les AQP5 et 11 sont également présentes dans la membrane apicale de certaines cellules principales. Dans les régions proximales de l'épididyme, le transport d'eau de la lumière vers le côté sanguin suit les mouvements de sodium, d'une manière similaire à la réabsorption d'eau par les reins. Dans la région distale, la sécrétion d'eau dépend de l'activité de la protéine CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) qui est responsable de la sécrétion d'ions chlore et bicarbonate. Plus récemment, nous avons démontré qu'une interaction entre CFTR et AQP9 contribue à la perméabilité de l'AQP9 [45]. Certaines mutations du gène *cftr* causent la mucoviscidose (aussi connue sous le nom de fibrose kystique), qui est caractérisée par une atteinte des voies respiratoires, digestives et reproductrices. La majorité des hommes porteurs de ces mutations sont infertiles suite à un dysfonctionnement de l'épididyme et du canal déférent [43], et des recherches actives seront nécessaires pour mieux comprendre les conséquences de cette maladie sur les fonctions reproductrices post-testiculaires.



Avancées récentes sur l'immunophysiologie de l'épididyme

Mieux comprendre la nature des interactions complexes entre l'épididyme et le système immunitaire est nécessaire à plusieurs titres. D'une part, les infections et inflammations du système reproducteur mâle représentent un problème de santé publique majeur puisqu'elles affectent la fertilité au moins transitoirement, et souvent de façon permanente. Si l'on estime que de 5 à 10% des cas expliqués d'infertilité masculine ont une origine immunologique (infection ou réaction auto-immune), un problème immunitaire pourrait également être à l'origine de nombreux cas d'infertilité classés "idiopathiques" [46, 47]. D'autre part, du point de vue fondamental, bien que l'immunité de l'épididyme semble très différente de celle du testicule, la plupart des données scientifiques disponibles à l'heure actuelle concernant ce dernier organe. Or les spermatozoïdes doivent être protégés contre les agressions venant de l'environnement extérieur et également contre une attaque par le système immunitaire tout au long de leur séjour dans le système reproducteur.

De nombreuses affections ont un impact négatif sur la fertilité masculine même si elles ne touchent pas directement les organes reproducteurs; la fertilité reflète le bien-être global des individus. Les médiateurs de l'inflammation, les cytokines et les composés libérés par les bactéries pathogènes ont la capacité de perturber à la fois la spermatogenèse et la fonction endocrine du testicule. En ce qui concerne l'épididyme, la pathologie la plus courante est l'épididymite [48], qui est généralement causée par une infection bactérienne transmise sexuellement. Remarquablement, l'incidence de l'épididymite est largement supérieure à celle de l'orchite, son pendant dans le testicule. D'une manière générale, l'épididyme développe plus facilement des réactions inflammatoires que le testicule. Les deux organes n'étant séparés que par les courts canaux efférents et donc atteints par les mêmes pathogènes, l'origine de cette différence de susceptibilité est vraisemblablement de nature immunologique [49, 50]. Ces différences sont aussi mises en évidence par des modèles expérimentaux d'orchite et d'épididymite auto-immune et de vasectomie chez les rongeurs [51, 52]. Le système reproducteur a mis en place de puissants mécanismes effecteurs de la défense innée (par exemple en produisant



abondamment des peptides antimicrobiens) qui ne seront pas discutés dans cette revue. Contrairement au testicule dans lequel les allogreffes et les xénogreffes ne sont pas rejetées [53, 54], l'épididyme n'est généralement pas considéré comme un organe immunologiquement privilégié. Les spermatozoïdes sont auto-antigéniques, nombreux (chaque testicule humain produit 100 millions de spermatozoïdes chaque jour), et arrivent dans l'organisme longtemps après la mise en place de la tolérance immunitaire centrale [55]; leur survie dans le système reproducteur dépend donc d'un maintien constant de la tolérance périphérique. On pourrait considérer que la tolérance périphérique qui s'établit dans le testicule est suffisante pour assurer également la protection des spermatozoïdes tout au long de leur séjour dans l'environnement post-testiculaire. Cependant, les données publiées au cours des dernières années indiquent que l'épididyme est équipé pour jouer un rôle plus actif dans la maintenance immunologique de la fonction reproductrice,

au-delà d'un simple rôle d'accessoire du testicule.

L'épididyme comme le testicule établissent une barrière épithéliale qui permet de séparer physiquement les cellules reproductrices du compartiment sanguin et de créer un microenvironnement optimal pour leur développement et leur maturation [17]. Cependant, il est largement admis que la barrière hémato-épididymaire n'est pas aussi efficace que la barrière hémato-testiculaire d'un point de vue immunologique. Dans les tubes séminifères, les cellules de Sertoli établissent un réseau complexe de jonctions serrées qui permettent d'isoler totalement les cellules reproductrices du système immunitaire, alors que la muqueuse de l'épididyme est plus perméable et permet donc à certaines cellules immunitaires de coloniser l'épithélium [56, 57]. Ainsi, des lymphocytes et des macrophages (souvent décrits sous le nom de "cellules en halo") ont été identifiés dans l'épithélium épididymaire dès les années 1970 [58-60] (**Figure 4**).

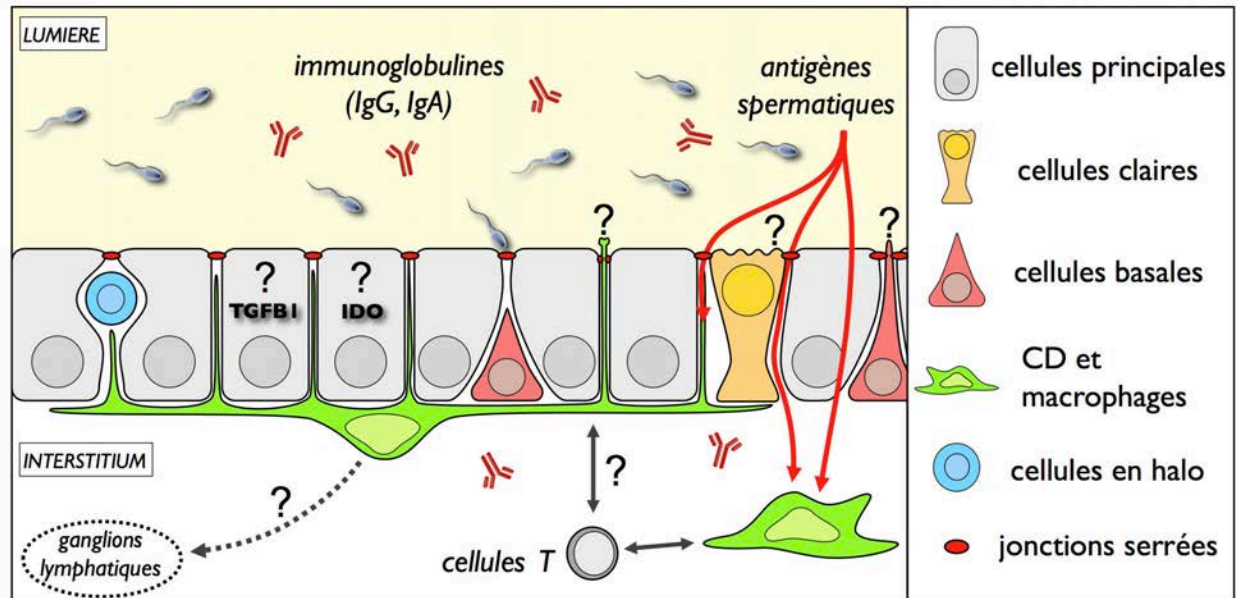


Figure 4

Éléments de la régulation immunitaire dans la muqueuse de l'épididyme.

De nombreux acteurs potentiellement impliqués dans l'immunité de l'épididyme ont été décrits, mais leur origine, leurs fonctions et leurs interactions sont encore mal connues. Des cellules immunitaires (lymphocytes, cellules présentatrices d'antigènes) sont présentes au sein de l'épithélium et dans l'interstitium. Des mécanismes de transport transépithélial peuvent transférer du matériel antigénique et des anticorps de part et d'autre de la barrière hémato-épididymaire, qui est plus perméable que la barrière hémato-testiculaire. Les cellules dendritiques (CD) et les cellules basales sont idéalement positionnées pour prélever du contenu luminal grâce à leurs projections transépithéliales. En conjonction avec les

cellules épithéliales, les cellules présentatrices d'antigènes peuvent interagir avec les cellules T, dans l'épididyme ou après avoir migré dans les ganglions lymphatiques, pour moduler les réponses immunitaires cellulaires. Enfin, l'épithélium exprime des molécules immunomodulatrices telles que IDO et TGFβ1, qui pourraient être elles aussi impliquées dans la régulation de la balance tolérance / défense au cours de la maturation des spermatozoïdes. Les mécanismes de défense innée ne sont pas représentés. CD: cellule dendritique; Ig: immunoglobuline; IDO: indoleamine 2,3-dioxygénase; TGFβ1 : *transforming growth factor beta1* D'après Hedger, Journal of Andrology, 2011.



Nous avons récemment montré que l'épididyme de souris contient un dense réseau de phagocytes mononucléaires, principalement des cellules dendritiques et des macrophages [16]. La distinction entre cellules dendritiques et macrophages dans les tissus non-lymphoïdes est sujette à controverse, mais il est généralement admis que les cellules dendritiques sont spécialisées dans la présentation des antigènes aux cellules T naïves pour déclencher une réponse immunitaire adaptative ou maintenir un état de tolérance, alors que les macrophages ont pour fonction principale d'éliminer par phagocytose les débris cellulaires et les pathogènes [61-65]. La base du tubule épидидymaire est peuplée sur toute sa longueur de nombreuses cellules d'aspect dendritique qui expriment CD11c (intégrine alpha X) et CX3CR1 (récepteur de la fractalkine), deux marqueurs fréquemment utilisés pour identifier les cellules dendritiques. Certaines de ces cellules avaient vraisemblablement été assimilées à des cellules basales exprimant des marqueurs macrophagiques [66-68], mais nos données récentes indiquent que les

cellules dendritiques, comme les macrophages, bien que présentes à la base de l'épithélium, sont morphologiquement et phénotypiquement distinctes des cellules basales proprement dites (Figure 4). L'analyse de suspension de cellules épидидymaires par cytométrie en flux a montré que l'épididyme contient en fait une population très hétérogène de phagocytes mononucléaires qui expriment de nombreux marqueurs retrouvés, dans d'autres organes, à la surface des macrophages et des cellules dendritiques (tels que CD11b, CD11c, CD103, F4/80 ou MHC class II). D'autre part, ces cellules dendritiques épидидymaires présentent efficacement l'antigène OVA aux lymphocytes T CD4+ et CD8+ *in vitro*. Si l'hétérogénéité des phagocytes mononucléaires de l'épididyme n'est pas surprenante en soi, leur abondance et leur apparence dans les segments proximaux de l'épididyme sont plus intrigantes. Dans le segment initial, les cellules dendritiques projettent de nombreuses et fines extensions entre les cellules épithéliales en direction du compartiment luminal (Figure 5).

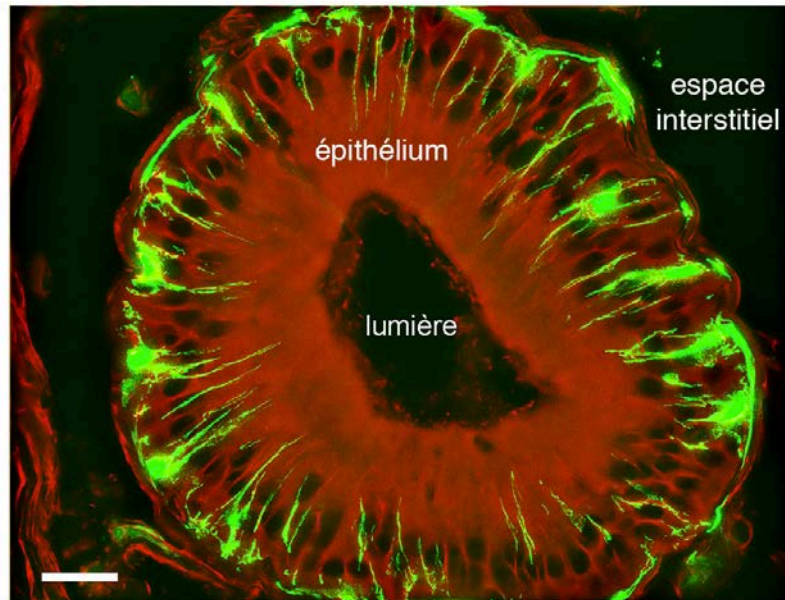


Figure 5

Section du tube épидидymaire dans le segment initial d'une souris CD11c-EYFP.

L'expression de la YFP (couleur verte), sous le contrôle du promoteur de CD11c, permet de visualiser les cellules dendritiques. Dans le segment initial, les cellules dendritiques sont localisées à la périphérie du tube et projettent

des extensions entre les cellules épithéliales, en direction de la lumière où circulent les spermatozoïdes. La couleur rouge a été obtenue avec du bleu de Evans. Barre = 10 µm.

La fonction de ces dendrites dans le segment initial reste à élucider, mais il est raisonnable de penser que les phagocytes mononucléaires cherchent à établir un contact avec le contenu de la lumière tubulaire. Notre hypothèse de travail, renforcée par le fait qu'une sous-population de cellules dendritiques exprime CD103, est que ces cellules interviennent dans le

maintien de la tolérance envers les spermatozoïdes. Cette possible fonction tolérogénique reste à démontrer, mais d'autres travaux récents indiquent que l'épididyme, au moins dans sa partie proximale, constitue un environnement immunosuppresseur. En effet, l'enzyme IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase), qui contrôle le catabolisme du tryptophane et apparaît



comme un régulateur essentiel de la réponse immunitaire [69], est abondamment exprimée dans les segments proximaux de l'épididyme [70-72]. La fonction précise de l'IDO épидидymaire reste également à déterminer, mais les souris dépourvues de IDO présentent un nombre élevé de spermatozoïdes anormaux, et les segments proximaux de leur épидидyme accumulent des marqueurs de l'inflammation. D'une manière générale, le profil d'expression des cytokines immunorégulatrices, des facteurs de croissance et les voies de signalisation de l'épididyme sont assez peu documentés [73]; des molécules telles que TGF β 1 (*transforming growth factor beta1*) pourraient toutefois être synthétisées dans l'épithélium épидидymaire [74].

En somme, les mécanismes qui régulent les réponses immunitaires dans l'épididyme sont encore mal connus et sûrement très complexes [52], mais il apparaît de plus en plus probable que les

nombreuses cellules (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes et cellules épithéliales), les acteurs de la réponse innée, les cytokines et les médiateurs de l'inflammation agissent de concert pour créer, au moins dans les segments proximaux de l'épididyme, un environnement immunosuppresseur et tolérogénique. Les phagocytes de l'épididyme proximal et l'abondante enzyme IDO sont également idéalement positionnés pour permettre un "contrôle de qualité" des spermatozoïdes, possiblement en éliminant des spermatozoïdes anormaux au cours de leur maturation, même si l'existence de ce contrôle est sujette à controverse [75]. Afin que la meilleure compréhension de l'immunophysiologie de l'épididyme puisse se traduire un jour par des applications cliniques (comme l'immunocontraception), il est essentiel de disséquer *in vivo* la fonction de tous les acteurs de l'immunité décrits dans cet organe, qui constitue un modèle original et passionnant d'immunologie mucosale.



Conclusion

L'état actuel de nos connaissances a mis en évidence un réseau de communication intercellulaire complexe dans le tractus reproducteur mâle. Les différentes cellules épithéliales formant la barrière hémato-épididymaire et les cellules dendritiques enveloppant le tubule épididymaire travaillent d'une façon concertée afin d'établir et de maintenir un milieu luminal optimal à la maturation, concentration, conservation et stockage des spermatozoïdes. Tandis que l'épididyme

joue un rôle primordial dans l'établissement et la régulation de la fertilité mâle, cet organe n'est étudié que dans peu de laboratoires à travers le monde. Il est nécessaire d'acquérir plus de données sur cet organe encore mal caractérisé afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables du maintien et de la préservation de la fertilité mâle, une fonction cruciale qui est menacée mondialement.



Références

1. Gurunath S, Pandian Z, Anderson RA, *et al.* Defining infertility--a systematic review of prevalence studies. *Hum Reprod Update* 2011; 17: 575-588.
2. Bushnik T, Cook JL, Yuzpe AA, *et al.* Estimating the prevalence of infertility in Canada. *Hum Reprod* 2012; 27: 738-746.
3. Skakkebaek NE, Jorgensen N, Main KM, *et al.* Is human fecundity declining? *Int J Androl* 2006; 29: 2-11.
4. Aitken RJ. Sperm function tests and fertility. *Int J Androl* 2006; 29: 69-75; discussion 105-108.
5. Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, *et al.* The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum Reprod* 2002; 17: 2904-2911.
6. Robaire B, Hinton BT, Orgebin-Crist MC. The epididymis. In: Neill JD (ed.) *Physiology of Reproduction*, vol. Third Edition. New York: Elsevier; 2006: 1071-1148.
7. Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 2009; 15: 213-227.
8. Shum WW, Ruan YC, Da Silva N, *et al.* Establishment of cell-cell cross talk in the epididymis: control of luminal acidification. *J Androl* 2011; 32: 576-586.
9. Yeung C-H, Cooper TG. Acquisition and development of sperm motility upon maturation in the epididymis. In: Robaire B, Hinton BT (eds.), *The Epididymis. From molecules to clinical practice*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002: 417-434.
10. Sullivan R, Legare C, Thabet M, *et al.* Gene expression in the epididymis of normal and vasectomized men: what can we learn about human sperm maturation? *J Androl* 2011; 32: 686-697.
11. Belleanne C, Thimon V, Sullivan R. Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell Tissue Res* 2012.
12. Turner TT. De Graaf's thread: the human epididymis. *J Androl* 2008; 29: 237-250.
13. Yeung CH, Cooper TG, Bergmann M, *et al.* Organization of tubules in the human caput epididymidis and the ultrastructure of their epithelia. *Am J Anat* 1991; 191: 261-279.
14. Da Silva N, Shum WWC, Breton S. Regulation of V-ATPase-dependent luminal acidification in the epididymis. *Asian J. Androl.* 2007; 9: 476-482.
15. Wong PYD, Gong XD, Leung GPH, *et al.* Formation of the epididymal fluid microenvironment. In: Robaire B, Hinton BT (eds.), *The Epididymis. From Molecules to Clinical Practice*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002: 119-130.
16. Da Silva N, Cortez-Retamozo V, Reinecker HC, *et al.* A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction* 2011; 141: 653-663.
17. Mital P, Hinton BT, Dufour JM. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol Reprod* 2011; 84: 851-858.
18. Cyr DG, Gregory M, Dube E, *et al.* Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. *Asian J Androl* 2007; 9: 463-475.
19. Levine N, Marsh DJ. Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats. *J. Physiol.* 1971; 213: 557-570.
20. Da Silva N, Shum WWC, El-Annan J, *et al.* Relocalization of the V-ATPase B2 subunit to the apical membrane of epididymal clear cells of mice deficient in the B1 subunit. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007; 293: C199-C210.
21. Pastor-Soler N, Pietrement C, Breton S. Role of acid/base transporters in the male reproductive tract and potential consequences of their malfunction. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20: 417-428.
22. Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, *et al.* Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* 2000; 289: 625-628.



23. Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, *et al.* Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65: 245-259.
24. Blomqvist SR, Vidarsson H, Soder O, *et al.* Epididymal expression of the forkhead transcription factor Foxi1 is required for male fertility. *EMBO J* 2006; 25: 4131-4141.
25. Vidarsson H, Westergren R, Heglin M, *et al.* The forkhead transcription factor Foxi1 is a master regulator of vacuolar H-ATPase proton pump subunits in the inner ear, kidney and epididymis. *PLoS One* 2009; 4: e4471.
26. Yeung C-H, Breton S, Stetiawan I, *et al.* Increase in luminal pH in the epididymis of the infertile c-ros knock-out mice: putative role of sodium-hydrogen exchangers and vacuolar H⁺-ATPase. *Mol Reprod and Development* 2004; in press.
27. Caflisch CR, DuBose TD, Jr. Cadmium-induced changes in luminal fluid pH in testis and epididymis of the rat in vivo. *J Toxicol Environ Health* 1991; 32: 49-57.
28. Herak-Kramberger CM, Sabolic I, Blanus M, *et al.* Cadmium inhibits vacuolar H⁺(+)ATPase-mediated acidification in the rat epididymis. *Biol Reprod* 2000; 63: 599-606.
29. Parizek J, Zahor Z. Effect of cadmium salts on testicular tissue. *Nature* 1956; 177: 1036-1037.
30. Tas S, Lauwerys R, Lison D. Occupational hazards for the male reproductive system. *Crit Rev Toxicol* 1996; 26: 261-307.
31. Breton S, Smith PJ, Lui B, *et al.* Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H⁺)-ATPase. *Nat Med* 1996; 2: 470-472.
32. Shum WW, Da Silva N, Brown D, *et al.* Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *J Exp Biol* 2009; 212: 1753-1761.
33. Beaulieu V, Da Silva N, Pastor-Soler N, *et al.* Modulation of the actin cytoskeleton via gelsolin regulates vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) recycling. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 8452-8463.
34. Shum WW, Da Silva N, Belleannee C, *et al.* Regulation of V-ATPase recycling via a RhoA and ROCKII dependent pathway in epididymal clear cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2010; submitted.
35. Pastor-Soler N, Beaulieu V, Litvin TN, *et al.* Bicarbonate regulated adenylyl cyclase (sAC) is a sensor that regulates pH-dependent V-ATPase recycling. *J Biol Chem* 2003; 278: 49523-49529.
36. Shum WW, Da Silva N, McKee M, *et al.* Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell* 2008; 135: 1108-1117.
37. Pastor-Soler N, Hallows KR, Smolak C, *et al.* Alkaline pH- and cAMP-induced V-ATPase membrane accumulation is mediated by protein kinase A in epididymal clear cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294: C488-C494.
38. Carlin RW, Lee JH, Marcus DC, *et al.* Adenosine stimulates anion secretion across cultured and native adult human vas deferens epithelia. *Biol Reprod* 2003; 68: 1027-1034.
39. Wong PY. Control of anion and fluid secretion by apical P2-purinoreceptors in the rat epididymis. *Br J Pharmacol* 1988; 95: 1315-1321.
40. Gatti JL, Druart X, Guerin Y, *et al.* A 105- to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of this ACE. *Biol Reprod* 1999; 60: 937-945.
41. Wong PY, Uchendu CN. The role of angiotensin-converting enzyme in the rat epididymis. *J Endocrinol* 1990; 125: 457-465.
42. Da Silva N, Pietrement C, Brown D, *et al.* Segmental and cellular expression of aquaporins in the male excurrent duct. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758: 1025-1033.
43. Wong PY. CFTR gene and male fertility. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 107-110.
44. Hermo L, Schellenberg M, Liu LY, *et al.* Membrane domain specificity in the spatial distribution of aquaporins 5, 7, 9, and 11 in efferent ducts and epididymis of rats. *J Histochem Cytochem* 2008; 56: 1121-1135.
45. Pietrement C, Da Silva N, Silberstein C, *et al.* Role of NHERF1, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, and cAMP in the regulation of aquaporin 9. *J Biol Chem* 2008; 283: 2986-2996.
46. Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, *et al.* EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol* 2005; 48: 703-711.



47. Schuppe HC, Meinhardt A, Allam JP, *et al.* Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? *Andrologia* 2008; 40: 84-91.
48. Trojian TH, Lishnak TS, Heiman D. Epididymitis and orchitis: an overview. *Am Fam Physician* 2009; 79: 583-587.
49. Hedger MP. Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. *J Androl* 2011; 32: 625-640.
50. Hedger MP, Hales DB. Immunophysiology of the male reproductive tract. In: Neill JD (ed.) *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, vol. 1, 3 ed: Elsevier Academic Press; 2006: 1195-1286.
51. Qu N, Terayama H, Naito M, *et al.* Caput epididymitis but not orchitis was induced by vasectomy in a murine model of experimental autoimmune orchitis. *Reproduction* 2008; 135: 859-866.
52. Wheeler K, Tardif S, Rival C, *et al.* Regulatory T cells control tolerogenic versus autoimmune response to sperm in vasectomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 7511-7516.
53. Fijak M, Bhushan S, Meinhardt A. Immunoprivileged sites: the testis. *Methods Mol Biol* 2011; 677: 459-470.
54. Meinhardt A, Hedger MP. Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Mol Cell Endocrinol* 2010.
55. Serre V, Robaire B. Interactions of the immune system and the epididymis. In: *The epididymis: from molecules to clinical practice: a comprehensive survey of efferent ducts, the epididymis and the vas deferens*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002: 219-231.
56. Cyr DG, Robaire B, Hermo L. Structure and turnover of junctional complexes between principal cells of the rat epididymis. *Microsc Res Tech* 1995; 30: 54-66.
57. Hinton BT, Palladino MA. Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microsc. Res. Tech.* 1995; 30: 67-81.
58. Dym M, Romrell LJ. Intraepithelial lymphocytes in the male reproductive tract of rats and rhesus monkeys. *J Reprod Fertil* 1975; 42: 1-7.
59. Flickinger CJ, Bush LA, Howards SS, *et al.* Distribution of leukocytes in the epithelium and interstitium of four regions of the Lewis rat epididymis. *Anat Rec* 1997; 248: 380-390.
60. Serre V, Robaire B. Distribution of immune cells in the epididymis of the aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content. *Biol Reprod* 1999; 61: 705-714.
61. Geissmann F, Gordon S, Hume DA, *et al.* Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 453-460.
62. Gordon S, Mantovani A. Diversity and plasticity of mononuclear phagocytes. *Eur J Immunol* 2011; 41: 2470-2472.
63. Hashimoto D, Miller J, Merad M. Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. *Immunity* 2011; 35: 323-335.
64. Hume DA. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol* 2008; 181: 5829-5835.
65. Steinman RM. Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science. *Immunity* 2008; 29: 319-324.
66. Mullen TE, Jr., Kiessling RL, Kiessling AA. Tissue-specific populations of leukocytes in semen-producing organs of the normal, hemicastrated, and vasectomized mouse. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003; 19: 235-243.
67. Seiler P, Cooper TG, Yeung CH, *et al.* Regional variation in macrophage antigen expression by murine epididymal basal cells and their regulation by testicular factors. *J Androl* 1999; 20: 738-746.
68. Yeung CH, Nashan D, Sorg C, *et al.* Basal cells of the human epididymis--antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. *Biol Reprod* 1994; 50: 917-926.
69. Medzhitov R, Shevach EM, Trinchieri G, *et al.* Highlights of 10 years of immunology in Nature Reviews Immunology. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 693-702.
70. Britan A, Maffre V, Tone S, *et al.* Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis. *Cell Tissue Res* 2006; 324: 301-310.
71. Drevet JR. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 250: 70-79.
72. Jrad-Lamine A, Henry-Berger J, Goubeyre P, *et al.* Deficient tryptophan



catabolism along the kynurenine pathway reveals that the epididymis is in a unique tolerogenic state. *J Biol Chem* 2011; 286: 8030-8042.

73. Tomsig JL, Turner TT. Growth factors and the epididymis. *J Androl* 2006; 27: 348-357.

74. Bomgardner D, Wehrenberg U, Rune GM. TGF-beta could be involved in paracrine actions in the epididymis of the marmoset

monkey (*Callithrix jacchus*). *J Androl* 1999; 20: 375-383.

75. Cooper TG, Yeung CH, Jones R, *et al.* Rebuttal of a role for the epididymis in sperm quality control by phagocytosis of defective sperm. *J Cell Sci* 2002; 115: 5-7.



La persistance du phénomène de la douleur en biomédecine :

Quel rôle joue l'identité du médecin ?

Persistence of pain in biomedicine: Does physician's identity play a role?

Sylvie Lafrenaye^{1*}, Philippe Goffaux¹

¹Université de Sherbrooke, Faculté de Médecine, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4.

Sylvie Lafrenaye MD, MSc, PhD *Auteur de correspondance*
Pédiatre-intensiviste, CHU Sherbrooke
Professeur, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé,
Département de pédiatrie
Université de Sherbrooke
3001, 12^e avenue Nord, Sherbrooke, Québec, Canada
J1H 5N4
Sylvie.Lafrenaye@USherbrooke.ca
819-346-1110 poste 74634

Philippe Goffaux PhD
Professeur, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé,
Département de neurochirurgie
Université de Sherbrooke
3001, 12^e avenue Nord, Sherbrooke, Québec, Canada
J1H 5N4
Philippe.Goffaux@USherbrooke.ca



Sylvie Lafrenaye

Article reçu le 18 octobre 2011
Article accepté le 8 juin 2012



Résumé

Malgré une surabondance de connaissances expérimentales et d'analgésiques pleinement efficaces, la douleur demeure encore hautement négligée en biomédecine. La prise en charge du patient souffrant implique quatre étapes: considérer la douleur de l'autre, l'évaluer, la soulager et valider le soulagement. La première étape, pourtant essentielle, demeure la grande négligée. Une revue de littérature apporte des éléments incomplets de réponse pour expliquer le sous-traitement de la douleur: les variabilités intrinsèques du patient, l'orientation biomédicale de la recherche, les barrières institutionnelles. Nous suggérons que la relation médicale (dyade soignant-soigné) est sous-étudiée alors qu'elle est centrale et déterminante pour le patient souffrant. Plus spécifiquement, le médecin

est souvent considéré comme étant un moule générique et uniquement dépositaire de connaissances factuelles. Pourtant, il est tout aussi unique que ses patients de par ses caractéristiques psycho-socio-spirituelles. Nous insistons sur la place de l'identité spirituelle du médecin (**qui suis-je**) en tant que base subjective fondamentale, afin d'être capable de considérer la subjectivité du vécu douloureux du patient souffrant. Puisque la chronicisation de la douleur entraîne des répercussions fort coûteuses sur le plan personnel et sur le système de santé, nous proposons que la considération de la souffrance subjective de l'autre par le médecin soit le moyen le plus sûr et le plus efficace afin de soulager le patient sans escalader les coûts de santé reliés aux répercussions multiples de la douleur chronique.



Summary

Despite much experimental knowledge and the existence of valuable analgesics, pain is still a neglected phenomenon in the biomedical field. The management of suffering, and pain in particular, typically involves four steps: the initial consideration of pain, the assessment of pain, pain relief, and the confirmation of therapeutic success. Although the first step is essential, it remains largely overlooked. Regrettably, a thorough review of the literature provides but an incomplete explanation for the continued under-treatment of pain. We argue that the medical relationship itself is an essential component to the resolution of under-treated pain, but remains inadequately studied. We also propose that

the physician is too often regarded as a generic provider of factual knowledge. Yet, the physician is as unique as his/her patients are. We believe it is essential to emphasize the physician's spiritual identity (**who am I**) when seeking to promote optimal patient-physician relationships and when seeking to resolve the plight brought forth by needless pain. Considering the financial and human cost of chronic pain, we propose that consideration for the pain of others, stemming from a careful consideration of one's own sensitivity/identity is the safest and most effective way to relieve pain and suffering, and to avoid escalating health costs.



Introduction

La douleur est souvent considérée comme étant le plus vieux problème médical [1]. Malgré une surabondance de connaissances expérimentales et d'analgésiques pleinement efficaces, la douleur demeure, malheureusement, un phénomène encore hautement négligé par l'ensemble du corps médical [2-5]. Du fait, Taylor estime à 80 % le nombre de personnes recevant une analgésie inadéquate de par le monde [6].

Nous avons revu la littérature à la recherche d'explication du phénomène de la persistance du phénomène du sous-traitement de la douleur. Selon nous, il est nécessaire d'analyser ce phénomène en le situant dans le contexte d'une biomédecine hautement technologique, à visée presque exclusivement curative - du moins dans l'imaginaire des utilisateurs. Une première surprise est la grande satisfaction des patients par rapport à la prise en charge de leur douleur, malgré une analgésie objectivement qualifiée d'insuffisante [7,8]. Cela peut rendre perplexe. Nous proposons que cette satisfaction (étonnante) des patients démontre surtout la croyance et le respect qu'ils entretiennent envers

l'institution biomédicale dans son ensemble, le besoin d'être soigné (besoin attentionnel, relationnel) et la peur de perdre les soins offerts, mais elle ne représente pas la qualité des soins analgésiques reçus [9]. Cette satisfaction *biaisée* pourrait être un premier élément explicatif du sous-traitement de la douleur (objectivement mesurée), élément encore mal apprécié et peu étudié, mais qui met en lumière la centralité du processus relationnel dans la considération de la douleur de l'autre.

Ajoutons à cela la révision des bases du soulagement de la douleur. Nous discernons 4 étapes essentielles pour sa prise en charge: **considérer** la douleur (entendre la plainte), **évaluer** en quantifiant l'intensité et les répercussions, **soulager** pharmacologiquement et psychologiquement, **valider** l'efficacité du soulagement selon le patient [10]. Les deux étapes intermédiaires sont celles qui ont reçu le plus d'attention de la part des chercheurs [11-13], mais nous constatons que cela est insuffisant. Les premières et quatrièmes étapes sont centrées sur *l'expérience subjective* du patient et sont par le fait même, plus difficiles à étudier, voire à objectiver [14,15]. Nous proposons de nous



attarder à la toute première étape : *considérer* la douleur, soit considérer « l'autre qui a mal ». À ce titre, plusieurs autres auteurs investissent depuis peu l'angle relationnel comme facteur explicatif du sous-traitement de la douleur [16-18]. Nous continuons dans cette lignée.

Dans cet article, nous explorerons en premier lieu les pistes explicatives de résolution de la douleur envisagées dans la littérature pour contrer le phénomène de la persistance de la douleur, soit i) du côté des variabilités individuelles du patient, ii) du

côté institutionnel et iii) du côté de la relation médicale et du médecin. Nous jugeons ce dernier aspect comme étant particulièrement important puisque la douleur implique nécessairement un facteur relationnel qui débute par la considération de l'expérience douloureuse de l'autre. Ainsi, trop longtemps, nous avons négligé la part du sujet-médecin dans le phénomène de la persistance du sous-traitement de la douleur. Cet article se veut une revue et une réflexion pour étudier plus à fond cet aspect du soin de la douleur.



Les pistes explicatives et de résolution proposées par la littérature

1) Les variabilités individuelles du patient

De grands efforts en recherche fondamentale sont déployés pour mieux expliquer les mécanismes neurophysiologiques de la douleur avec plus de 6000 articles publiés depuis 2000 [19]. Ces études s'intéressent principalement à la compréhension du phénomène biologique de la douleur plus qu'au sujet/patient souffrant.

Parmi les particularités propres au patient qui sont étudiées, on note l'anxiété [17], les attentes [20], l'évitement de la douleur [21], la recherche effrénée d'information [22], les pensées négatives [23], les mécanismes d'adaptation (*coping*) déficients [24] et l'indicibilité de la douleur [25,26].

De façon intéressante, la non-acceptation de la présence de douleur par le patient [27] est un facteur prédictif de persistance de la douleur. Mais peut-il en être autrement dans notre biomédecine qui clame les miracles curatifs? Autant le médecin que le patient

sont en attente du remède magique guérissant la douleur. Ainsi, la non-flexibilité psychologique [28] face à l'acceptation de la douleur semble intervenir davantage que la kinésiophobie [29] en tant que prédicteur de l'invalidité, de l'insatisfaction face à la vie, et de la dépression [30]. En contrepartie, les patients qui s'adaptent facilement (résilience) pourraient faire preuve d'une réponse positive aux suggestions analgésiques [31].

Parmi les autres variabilités personnelles rapportées pouvant expliquer le sous-traitement de la douleur, il faut noter plusieurs éléments sociologiques [32], tels les facteurs raciaux et d'ethnicité [33,34] et les facteurs culturels [35]. Ainsi, les variabilités individuelles sont telles qu'une seule étude ne peut toutes les réunir. Cependant, le médecin en pratique les croise quotidiennement et se doit de les incorporer à son analyse clinique. Évidemment, le tout se fait inconsciemment le plus souvent.

2) L'institutionnel (hôpitaux et écoles de médecine)

Devant la persistance du phénomène de la douleur et le peu de considération que ce symptôme reçoit, certains se sont tournés vers les réglementations et les politiques en



tant qu'élément nécessaire au soulagement de la douleur [36]. Nous assistons ainsi à la prolifération de consensus, de protocoles, et d'avis d'experts, mais ces derniers conduisent à des résultats variables, allant de peu utiles [37,38], à très efficaces [39,40].

D'autres voies, plus politiques que pratiques, abondent dans le même sens. Ainsi nous assistons aujourd'hui à la genèse de, soi-disant nouveaux concepts, tels: la douleur en tant que 5^e signe vital [41], la douleur en tant qu'entité médicale à part entière [42], la prise en charge de la douleur et l'amélioration de la qualité de vie [43], la douleur en tant qu'effet secondaire [44], la douleur proclamée problème de santé publique [45], et le soulagement de la douleur en tant que droit humain fondamental [35].

Alors que la recherche sur la douleur est principalement individualiste et biologique, les initiatives institutionnelles sont plus socialement centrées, mais encore une fois, les résultats cliniques pour le patient souffrant se font attendre.

3) La relation médicale

3.1) La dyade soignant-soigné

Une prémisse importante pour l'avancement des connaissances en matière de soins aux malades est certainement le souci du patient. Cependant, il est fort peu probable qu'une solution unique puisse répondre à toutes situations cliniques, puisque toute rencontre, toute dyade soignant-soigné, est unique.

Ainsi, en tout début de parcours, le patient souffrant rencontrera un médecin, qui aura un effet décisif sur lui et le devenir de sa douleur. Ce patient pourra être stigmatisé, normalisé, entendu, référé, négligé, soulagé. À ce titre, quatre types différents de relation patient-médecin ont été définis: paternel (le médecin décide des actions à prendre), informationnel (respecte fermement l'autonomie du patient), interprétatif (échange d'informations) et délibératif (discussion). Selon le type adopté par le médecin, les résultats cliniques sont fort différents [46]. D'un autre côté, les patients peuvent être actifs, collaborateurs, passifs. Ainsi, l'équation de l'interaction patient-médecin est hautement complexe et difficile à étudier, ce qui peut expliquer le peu de recherche sur le sujet. Et pourtant,



l'interaction patient-médecin pourrait être plus que déterminante dans le phénomène du sous-traitement de la douleur.

Ainsi, non seulement la variabilité du patient joue un rôle important dans la douleur chronique, mais le médecin présente aussi des variabilités qui influenceront l'accueil du patient et le traitement offert. Même s'il est le dépositaire de connaissances assez homogènes, l'utilisation de ces connaissances est inconstante selon la situation clinique. Par exemple, les jeunes enfants reçoivent moins d'analgésie (doses équianalgésiques) pour des pathologies comparables [47,48]. Les soignants traitent différemment la douleur selon le sexe, les femmes prescrivent davantage d'opioïdes que les hommes médecins et les femmes patientes en reçoivent davantage [49].

D'autres facteurs subjectifs et « presque invisibles » influencent le médecin face à des situations cliniques particulières. Ainsi, à la salle d'urgence, la peur de nourrir une narcomanie présumée [50], l'impossibilité de prouver objectivement la douleur en l'absence de lésion visible [51], et l'opiophobie [52] sont avancées pour expliquer la non-considération de la douleur.

En somme, toute rencontre médicale impliquant un soigné et un soignant conduit

inévitablement à une possibilité quasi-infinie de délibérations, de conduites et au final, de résultats cliniques (analgésiques) fort différents.

3.2) La réassurance et la communication

À l'autre extrême du patient en douleur aiguë à la salle d'urgence (avec un faciès grimaçant et une physiologie parlante), il y a le patient qui se plaint de « vagues » symptômes, telles la souffrance ou la douleur chronique sans cause somatique évidente. Ce manque de repères physiologiques nuit au patient : son langage non verbal est alors en désaccord avec son langage verbal. La considération de ses propos et de son *vécu expérientiel* devrait alors devenir le cœur de la rencontre médicale. Car plus une douleur perdure, plus les interprétations sur le sens de cette expérience non désirée prennent de l'importance dans la vie du patient.

Il n'est plus à défendre l'idée que les patients ont leurs propres croyances, interprétations et attitudes face aux symptômes présentés au médecin. Ainsi, il fut maintes fois suggéré (voire supplié) que prendre soin avec compétence des émotions du patient souffrant améliore sa condition clinique [53] et qu'une réassurance adéquate pourrait permettre à



la fois de réduire les interventions et de calmer le patient. Malheureusement, les résultats de recherche cliniques n'abondent pas en ce sens [54] puisque ces patients peuvent surtout désirer un soutien émotif et non pas une « fausse » réassurance ou des interventions somatiques (tests ou médications) [55,56]. D'ailleurs, la réassurance semble être utile surtout pour ceux qui sont peu anxieux [57].

Dans le même ordre d'idée, la normalisation (réassurance que tout est dans l'ordre normal des choses) est aussi une attitude médicale populaire, faisant partie de 78 % des consultations chez l'omnipraticien [54]. Mais cette réassurance n'est bénéfique que si elle est ancrée sur les préoccupations physiques et psychologiques du patient [58].

Trop souvent, les médecins méprisent ces repères psychologiques offerts par les patients. Selon Salmon, les interventions somatiques sont une façon pour le médecin d'éviter à avoir à offrir un engagement émotif avec le patient [55]. De plus, notons que la douleur est perçue depuis quelques années comme étant un mode de communication [59,60].

En somme, il est dorénavant impossible de vouloir comprendre la douleur en la séparant de sa composante relationnelle. Soulager la douleur est un non-sens, il s'agit de soulager le patient souffrant. Et justement, cette composante relationnelle implique inévitablement un soignant, le médecin.



Notre piste de solution : explorer le « soignant »

Ce qui précède se voulait une analyse servant à démontrer l'importance de l'attitude du soignant dans la considération du vécu douloureux du patient. Comme d'autres, nous pensons que l'attitude, la personnalité et la spiritualité du médecin dans la prise en charge des patients sont des facteurs importants [61,62].

Pour le médecin, comment est-il possible d'en venir à la considération de l'autre en tant que sujet unique, autonome et vivant une expérience subjective et invisible de douleur dans une biomédecine objective axée sur l'étiologique, le visible, le curatif et la performance? L'éducation médicale prise isolément seule ne semble pas y arriver [63].

Ainsi, pour venir à bout du sous-traitement de la douleur, nous suggérons qu'il faut s'adresser non pas uniquement aux connaissances factuelles du médecin, mais bien à sa subjectivité, s'adresser à QUI il est. Paul Ricœur, philosophe, divise l'identité de tout individu en QUE suis-je (moi social, extérieur) et QUI suis-je (moi intime, spirituel) [64], ce qui implique une pratique réflexive sur soi, au-delà de

l'expertise cognitive [36]. Ainsi, être capable de considérer la subjectivité du patient passe nécessairement par la reconnaissance de sa propre subjectivité en tant que médecin, ce qui va à l'encontre du paradigme de la pure objectivité biomédicale.

Qu'en est-il de cette reconnaissance de la subjectivité du soignant? L'objectif général de la formation médicale devrait coupler la croissance des connaissances factuelles à une réflexion personnelle afin de parvenir à un véritable professionnalisme médical [36,65]. À ce titre, la compétence émotionnelle (force, intelligence, résilience et régulation émotionnelle) et la capacité réflexive font partie de la compréhension de l'interaction patient-médecin. Mais, actuellement, la formation médicale (du moins en Amérique du Nord) s'attarde peu à l'émotionnel, au social et au spirituel de l'étudiant. De par sa charge émotionnelle négative, la douleur exprimée par le patient crée un impact négatif sur l'étudiant en formation (frustration, suspicion, dysphorie) et cet aspect est peu souvent relevé et épaulé par les superviseurs. L'empathie est depuis quelques années soulignée en tant que facteur à explorer pour mieux soigner la douleur [66-68], mais tristement, l'empathie diminue avec le niveau de formation.



Dans ce contexte particulier de la douleur, le rôle du médecin est complexe: transmettre de l'information tout en s'engageant affectivement avec un patient, alors que l'émotion négative est palpable [58,69]. De plus, le médecin devra percevoir et décoder à la fois les mots et les sous-entendus. Et cette perception ne peut être neutre: chaque soignant possède son schéma perceptuel propre. D'ailleurs, percevoir n'est pas un phénomène passif [70]: nous rejetons les données qui nous semblent discordantes, nous ignorons ou déformons les faits gênants qui se refusent à l'insertion dans notre schéma habituel d'interprétation. Personne ne voit un film de la même façon que son voisin ! Ainsi, nos connaissances médicales sont intégrées dans notre schéma de représentation afin de respecter le sens de notre vie, bâtie sur nos expériences cumulées. Et nous percevons l'expérience de douleur du patient selon ce même schéma.

Nous proposons que la spiritualité soit à la base de ce schéma perceptuel propre à chacun. Il ne faut pas confondre la spiritualité (intérieure) et la religion (extérieure: rites, prières, dogmes). Nous proposons que la spiritualité du soignant soit essentielle dans la considération de la douleur de l'autre. Le sens de notre vie est

façonné par notre spiritualité, aussi définie en tant que réalisation de soi ou encore « devenir qui l'on est ». La spiritualité est une expérience humaine de recherche de sens qui transite par le lien avec les autres, la nature et/ou un être supérieur [71]. Nos croyances, pensées, souhaits, espoirs sont en fait ce qui nous fait choisir ce que nous percevons. Voir, percevoir, entendre et comprendre la souffrance du patient touche inévitablement à notre spiritualité, à notre façon de concevoir la vie.

Et la vie vient avec son lot de souffrance, même si notre société postmoderne veut bien nous faire miroiter que cela ne devrait pas être le cas. Dans ce contexte, il est connu que les grandes souffrances peuvent entraîner une transformation positive si la personne saisit l'occasion pour prendre le temps de réfléchir sur sa vie [72,73]. Cela est vrai autant pour le patient que pour le médecin. À la différence que le médecin rencontre quotidiennement de la souffrance. Se permet-il une réflexion pour en apprendre [74,75]? Si oui, cela serait très utile afin de mieux comprendre l'expérience du patient qui souffre et pourrait même permettre aux médecins de considérer le patient en tant que source de formation et de sagesse [76].



Discussion

Malgré une biomédecine hautement technologique, il est déplorable de constater que la douleur demeure encore sous-traitée. En dépit d'une revue de littérature exhaustive, la réponse à cette sous-considération de la douleur demeure obscure. Nous proposons de chercher du côté du « médecin-individu ». Celui-ci présente inévitablement tout autant de variabilité que ses patients. Et c'est d'ailleurs sur ce médecin-individu que repose la responsabilité de remédier au soulagement du patient. Mais cette variabilité inévitable du soignant est mal vue en biomédecine curative: nous voulons des « clones » de médecins, tous compétents et performants, mais qui ignorent « qui » ils sont. Il n'y a qu'en médecine palliative que cet aspect semble s'inverser [77,78].

Il est connu que nous « construisons » nos vies [79,80]. La thérapie narrative est d'ailleurs basée sur ce fait [81]. Notre *identité narrative* se crée par les récits que

nous faisons de nos vies. À ce titre, le patient souffrant insère les paroles du médecin dans son récit, conférant ainsi un rôle central aux paroles et attitudes du médecin dans son identité même de malade. Mais « narrer » sa vie est autant nécessaire pour le soignant que pour le soigné [65]. Comment pouvons-nous prendre en compte l'expérience du patient si nous ne reconnaissons pas chez nous (médecins), nos propres expériences? Il est impossible de percevoir « l'invisible » chez l'autre si nous nous ne l'explorons pas pour nous-mêmes.

Afin de limiter les conséquences négatives de la biomédecine (austère et systématique) sur le patient souffrant, il est temps de différencier la recherche médicale qui a pour but de « guérir les maladies » de l'art de la médecine qui est de « soigner les malades » [82,83]. Il est temps de laisser plus d'espace au sujet souffrant plutôt qu'à la douleur [61]. Il est temps de laisser plus d'espace au sujet-médecin.



Conclusion

En biomédecine, le médecin semble être condamné à n'être qu'une ressource encyclopédique ne possédant pas d'identité bio-psycho-socio-spirituelle propre, mais cela ne saurait, ne pourrait et ne devrait pas être le cas. Puisque la douleur est d'abord et avant tout une expérience subjective, elle ne peut résonner qu'avec la subjectivité du médecin, qu'il doit donc nécessairement s'autoriser à percevoir et à exprimer. Pour réussir à contrer le phénomène de la persistance du sous-traitement de la douleur en notre ère technologique, nous devons accepter de transformer notre façon de nous percevoir, nous les soignants. Ce n'est qu'à ce titre que nous en viendrons à considérer la douleur de l'autre, à ne plus la négliger.

Cette reconnaissance du vécu douloureux de l'autre (voire son identité de malade) autorisera ultimement l'offre de soulagements précoces, agressifs, ciblés et adaptés au patient devant soi afin de diminuer la chronicisation de la douleur, chronicisation qui entraîne des coûts faramineux au système de santé. Afin de contrer cette flambée, les deux composantes de la dyade soigné-soignant devraient mériter l'attention des chercheurs.

Conflit d'intérêts: aucun pour les deux auteurs.



Références

- [1] Meldrum ML. A capsule history of pain management. *JAMA: Journal of the American Medical Association* 2003; 290:2470-5.
- [2] Boulanger A, Clark AJ, Squire P, Cui E, Horbay GL. Chronic pain in Canada: have we improved our management of chronic noncancer pain?. *Pain Research & Management* 2007;12:39-47.
- [3] Karling M, Renstrom M, Ljungman G. Acute and postoperative pain in children: a Swedish nationwide survey. *Acta Paediatrica* 2002;91:660-6.
- [4] Apfelbaum JL, Chen C, Mehta SS, Gan TJ. Postoperative pain experience: results from a national survey suggest postoperative pain continues to be undermanaged. *Anesthesia & Analgesia* 2003;97:534-40.
- [5] Todd KH, Sloan EP, Chen C, Eder S, Wamstad K. Survey of pain etiology, management practices and patient satisfaction in two urban emergency departments. *CJEM: The Journal of the Canadian Association of Emergency Physicians* 2002;4:252.
- [6] Taylor AL, Gostin LO, Pagonis KA. Ensuring effective pain treatment: a national and global perspective. *JAMA: Journal of the American Medical Association* 2008;299:89-91.
- [7] Hong SS, Murphy SO, Connolly PM. Parental satisfaction with nurses' communication and pain management in a pediatric unit. *Pediatr.Nurs.* 2008;34:289-93.
- [8] Blank FS, Mader TJ, Wolfe J, Keyes M, Kirschner R, Provost D. Adequacy of pain assessment and pain relief and correlation of patient satisfaction in 68 ED fast-track patients. *Journal of Emergency Nursing* 2001;27:327-34.
- [9] Karci A, Tasdogan A, Erkin Y, Sahinoz B, Kara H, Elar Z. Evaluation of quality in patient-controlled analgesia provided by an acute pain service. *European Surgical Research* 2003;35:363-71.
- [10] Morlion B, Walch H, Yihune G, Vielvoye-Kerkmeer A, de Jong Z, Castro-Lopes J, et al. The Pain Associates' International Network Initiative: A Novel Practical Approach to the Challenge of Chronic Pain Management in Europe. *Pain Practice* 2008;8:473-80.
- [11] Apolone G, Corli O, Caraceni A, Negri E, Deandrea S, Montanari M, Greco MT. Cancer Pain Outcome Research Study Group (CPOR SG) Investigators. Pattern and quality of care of cancer pain management. Results from the Cancer Pain Outcome Research Study Group. *Br.J.Cancer* 2009;100:1566-74.
- [12] Dionne RA, Bartoshuk L, Mogil J, Witter J. Individual responder analyses for pain: does one pain scale fit all? *Trends Pharmacol.Sci.* 2005;26:125-30.
- [13] Bijur PE, Berard A, Esses D, Nestor J, Schechter C, Gallagher EJ. Lack of influence of patient self-report of pain intensity on administration of opioids for suspected long-bone fractures. *Journal of Pain* 2006;7:438-44.
- [14] Cleeland CS. The measurement of pain from metastatic bone disease : Capturing the patient's experience (English). *Clin.Cancer Res.* 2006;12:2.
- [15] Grant E, Murray SA, Kendall M, Boyd K, Tilley S, Ryan D. Spiritual issues and needs: perspectives from patients with advanced cancer and nonmalignant disease. A qualitative study. *Palliative & Supportive Care* 2004;2:371-8.
- [16] Anema C, Johnson M, Zeller JM, Fogg L, Zetterlund J. Spiritual well-being in individuals with fibromyalgia syndrome: relationships with symptom pattern variability, uncertainty, and psychosocial adaptation. *Research & Theory for Nursing Practice* 2009;23:8-22.



- [17] McCracken LM, Keogh E. Acceptance, mindfulness, and values-based action may counteract fear and avoidance of emotions in chronic pain: an analysis of anxiety sensitivity. *Journal of Pain* 2009; 10:408-15.
- [18] Banja JD. Toward a more empathic relationship in pain medicine. *Pain Medicine* 2008; 9:1125-9.
- [19] Mogil JS, Simmonds K, Simmonds MJ. Pain research from 1975 to 2007: a categorical and bibliometric meta-trend analysis of every Research Paper published in the journal, *Pain*. *Pain* 2009;142:48-58.
- [20] Goffaux P, de Souza JB, Potvin S, Marchand S. Pain relief through expectation supersedes descending inhibitory deficits in fibromyalgia patients. *Pain* 2009; 145:18-23.
- [21] Vlaeyen JW, Linton SJ. Are we "fear-avoidant"? *Pain* 2006;124:240-1.
- [22] Henrotin YE, Cedraschi C, Duplan B, Bazin T, Duquesnoy B. Information and low back pain management: a systematic review. *Spine* 2006; 31:E326-34.
- [23] Barnes LL, Plotnikoff GA, Fox K, Pendleton S. Spirituality, religion, and pediatrics: intersecting worlds of healing. *Pediatrics* 2000;106:899-908.
- [24] Franck LS, Sheikh A, Oulton K. What helps when it hurts: children's views on pain relief. *Child: Care, Health & Development* 2008; 34:430-8.
- [25] Frank AW. Can we research suffering?. *Qual. Health Res.* 2001;11:353-62.
- [26] Gagnon, É. La communication, l'autre, l'indicible. *Anthropologie et sociétés.* 1999; 23:61-78.
- [27] Gauthier LR, Rodin G, Zimmermann C, Warr D, Moore M, Shepherd F, et al. Acceptance of pain: a study in patients with advanced cancer. *Pain* 2009;143:147-54.
- [28] Hayes SC, Luoma JB, Bond FW, Masuda A, Lillis J. Acceptance and commitment therapy: model, processes and outcomes. *Behaviour Research & Therapy* 2006;44:1-25.
- [29] Wicksell RK, Olsson GL, Melin L. The Chronic Pain Acceptance Questionnaire (CPAQ)-further validation including a confirmatory factor analysis and a comparison with the Tampa Scale of Kinesiophobia. *European Journal of Pain: Ejp* 2009;13:760-8.
- [30] Elander J, Robinson G, Mitchell K, Morris J. An assessment of the relative influence of pain coping, negative thoughts about pain, and pain acceptance on health-related quality of life among people with hemophilia. *Pain* 2009;145:169-75.
- [31] Kuehn BM. Pain studies illuminate the placebo effect. *JAMA: Journal of the American Medical Association* 2005;294:1750-1.
- [32] Poleshuck EB, Green CR. Socioeconomic disadvantage and pain. *Pain* 2008;136:235-8.
- [33] Lebovits A. The Ethical Implications of Racial Disparities in Pain: Are Some of Us More Equal? *Pain Medicine* 2005;6:3-4.
- [34] Miner J, Biros MH, Trainor A, Hubbard D, Beltram M. Patient and physician perceptions as risk factors for oligoanalgesia: a prospective observational study of the relief of pain in the emergency department. *Acad. Emerg. Med.* 2006;13:140-6.
- [35] Brennan F, Carr DB, Cousins M. Pain management: a fundamental human right. *Anesth. Analg.* 2007;105:205-21.
- [36] Murinson BB, Agarwal AK, Haythornthwaite JA. Cognitive expertise, emotional development, and reflective capacity: clinical skills for improved pain care. *Journal of Pain* 2008;9:975-83.



- [37] Victor TW, Alvarez NA, Gould E. Opioid prescribing practices in chronic pain management: guidelines do not sufficiently influence clinical practice. *Journal of Pain* 2009;10:1051-7.
- [38] Megens JH, Van Der Werff DB, Knape JT. Quality improvement: implementation of a pain management policy in a university pediatric hospital. *Paediatr. Anaesth.* 2008;18:620-7.
- [39] Falanga IJ, Lafrenaye S, Mayer SK, Tétrault J. Management of acute pain in children: Safety and efficacy of a nurse-controlled algorithm for pain relief. *Acute Pain* 2006;8:45-54.
- [40] Knab JH, Wallace MS, Wagner RL, Tsoukatos J, Weinger MB. The use of a computer-based decision support system facilitates primary care physicians' management of chronic pain. *Anesthesia & Analgesia* 2001;93:712-20.
- [41] Popenhagen MP, Kuntz KR(). Undertreatment of Pain and Fears of Addiction in Pediatric Chronic Pain Patients: How Do We Stop the Problem? *Journal for Specialists in Pediatric Nursing* 2006;11:61-7.
- [42] Siddall PJ, Cousins MJ. Persistent pain as a disease entity: implications for clinical management. *Anesthesia & Analgesia* 2004;99:510-20.
- [43] Katz N. The impact of pain management on quality of life. *Journal of Pain & Symptom Management* 2002;24:S38-47.
- [44] Chorney JM, McGrath P, Finley GA. Pain as the neglected adverse event. *CMAJ* 2010;182:732.
- [45] Bell K, Salmon A. Pain, physical dependence and pseudoaddiction: Redefining addiction for 'nice' people? *International Journal of Drug Policy* 2009;20:170-8.
- [46] Emanuel EJ, Emanuel LL. Four models of the physician-patient relationship. *JAMA*: 1992;267:2221.
- [47] Swor R, McEachin CM, Seguin D, Grall KH. Prehospital pain management in children suffering traumatic injury. *Prehospital Emerg Care* 2005;9:40-3.
- [48] Tanne JH. Children are often undertreated for pain. *BMJ: British Medical Journal* 2003;327:1185.
- [49] Safdar B, Heins A, Homel P, Miner J, Neighbor M, DeSandre P, et al. Impact of Physician and Patient Gender on Pain Management in the Emergency Department—A Multicenter Study. *Pain Medicine* 2009;10:364-72.
- [50] Elander J, Lusher J, Bevan D, Telfer P, Burton B. Understanding the causes of problematic pain management in sickle cell disease: Evidence that pseudoaddiction plays a more important role than genuine analgesic dependence (English). *J.Pain Symptom Manage.* 2004;27:156-69.
- [51] Wilsey BB, Fishman S, Rose JS, Papazian J. Pain management in the ED. *Am.J.Emerg.Med.* 2004;22:51-7.
- [52] Rhodin A. The rise of opiophobia: is history a barrier to prescribing? *Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy* 2006;20:31-2.
- [53] Di Blasi Z, Harkness E, Ernst E, Georgiou A, Kleijnen J. Influence of context effects on health outcomes: a systematic review. *Lancet* 2001;357:757-62.
- [54] Dowrick CF, Ring A, Humphris GM, Salmon P. Normalisation of unexplained symptoms by general practitioners: a functional typology. *British Journal of General Practice* 2004;54:165-70.
- [55] Salmon P, Ring A, Dowrick CF, Humphris GM. What do general practice patients want



when they present medically unexplained symptoms, and why do their doctors feel pressurized?. *J.Psychosom.Res.* 2005;59:255-60.

[56] McMurtry CM, McGrath PJ, Chambers CT. Reassurance can hurt: parental behavior and painful medical procedures. *J.Pediatr.* 2006;148:560-1.

[57] Linton SJ, McCracken LM, Vlaeyen JW. Reassurance: help or hinder in the treatment of pain. *Pain* 2008;134:5-8.

[58] Salmon P, Humphris GM, Ring A, Davies JC, Dowrick CF. Primary care consultations about medically unexplained symptoms: patient presentations and doctor responses that influence the probability of somatic intervention. *Psychosom.Med.* 2007;69:571-7.

[59] Sullivan MJ, Adams H, Sullivan ME. Communicative dimensions of pain catastrophizing: social cueing effects on pain behaviour and coping. *Pain* 2004;107:220-6.

[60] Fredriksson L, Eriksson K. The patient's narrative of suffering: A path to health? An interpretative research synthesis on narrative understanding. *Scand.J.Caring Sci.* 2001;15:3-11.

[61] Cassell EJ. The nature of suffering and the goals of medicine. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2004.

[62] Kleinman A. Catastrophe and caregiving: the failure of medicine as an art. *Lancet* 2008;371:22-3.

[63] Simpson K, Kautzman L, Dodd S. The effects of a pain management education program on the knowledge level and attitudes of clinical staff. *Pain Management Nursing* 2002;3:87-93.

[64] Ricœur P. Soi-même comme un autre. Paris: Éd. du Seuil; 1990.

[65] Kuczewski MG. The soul of medicine. *Perspectives in Biology & Medicine* 2007;50:410-20.

[66] Avenanti A, Minio-Paluello I, Bufalari I, Aglioti SM. The pain of a model in the personality of an onlooker: influence of state-reactivity and personality traits on embodied empathy for pain. *Neuroimage* 2009;44:275-83.

[67] Ochsner KN, Zaki J, Hanelin J, Ludlow DH, Knierim K, Ramachandran T, *et al.* Your pain or mine? Common and distinct neural systems supporting the perception of pain in self and other. *Social Cognitive & Affective Neuroscience* 2008;3:144-60.

[68] Tait RC. Empathy: necessary for effective pain management? *Current Pain & Headache Reports* 2008;12:108-12.

[69] Salmon P, Wissow L, Carroll J, Ring A, Humphris GM, Davies JC, *et al.* Doctors' attachment style and their inclination to propose somatic interventions for medically unexplained symptoms. *Gen.Hosp.Psychiatry* 2008;30:104-11.

[70] Douglas M. De la souillure : essai sur les notions de pollution et de tabou. Paris: F. Maspero; 1971.

[71] Pahlavan F, Mouchiroud C, Zenasni F, Panksepp J. Validation de l'adaptation française de l'échelle neuro-affective de personnalité. *Revue Européenne de Psychologie Appliquée* 2008;58:155-63.

[72] Delmar C, Boje T, Dylmer D, Forup L, Jakobsen C, Moller M, *et al.* Achieving harmony with oneself: life with a chronic illness. *Scand.J.Caring Sci.* 2005;19:204-12.

[73] Scorgie K, Sobsey D. Transformational Outcomes Associated With Parenting Children Who Have Disabilities. *Ment.Retard.* 2000;38:195.



[74] Colman W. On being, knowing and having a self. *J.Anal.Psychol.* 2008;53:351-66.

[75] Daniel SL. The patient as text: a model of clinical hermeneutics. *Theor.Med.* 1986;7:195-210.

[76] Undeland M, Malterud K. Diagnostic interaction: The patient as a source of knowledge? *Scand.J.Prim.Health Care* 2008;26:222-7.

[77] Bush T, Bruni N. Spiritual care as a dimension of holistic care: a relational interpretation. *Int.J.Palliat.Nurs.* 2008;14:539-45.

[78] Puchalski CM. Spirituality and the care of patients at the end-of-life: an essential

component of care. *Omega - Journal of Death & Dying* 2007;56:33-46.

[79] Ricœur P. Temps et récit. Paris: Editions du Seuil; 1983.

[80] Frank AW. The wounded storyteller: body, illness, and ethics. 1995:213.

[81] Frank AW. Asking the right question about pain: narrative and phronesis. *Literature & Medicine* 2004;23:209-25.

[82] Mallet D. La médecine entre science et existence. Ed. Vuilbert 2007. 246p.

[83] Chantler C. 'The second greatest benefit to mankind'?. *Clinical Medicine* 2002;2:544-53.



Revue

Étude de la régulation de l'expression des gènes par réaction de polymérisation en chaîne permise par un adaptateur

Study of the regulation of gene expression by ligation-mediated polymerase chain reaction

Josée Lamoureux, Martin Angers*, Stéphane Ouellet et Régén Drouin**

Service de génétique, Département de pédiatrie,
Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke,
Sherbrooke, Québec, Canada.

* Adresse actuelle : Agilent Technologies Canada
2250 Boul Alfred-Nobel, Saint-Laurent, Québec, H4S 2C9

** Adresse actuelle : **Novartis Pharmaceuticals Canada Inc.**
385 Boul Bouchard, Dorval, Québec, H9S 1A9

Adresse pour la correspondance :

Régén Drouin
Service de génétique, Département de Pédiatrie,
Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé,
Université de Sherbrooke
3001, 12^e avenue nord, Sherbrooke (Québec)
Canada, J1H 5N4
Téléphone: (819) 346-1110 poste 12520
Télécopieur: (819) 564-5217
Courriel: Regen.Drouin@USherbrooke.ca



Régén Drouin

Article reçu le : 22 Mai 2012

Article accepté le : 13 Juillet 2012



Résumé

L'expression des gènes est modulée par divers mécanismes de régulation. La cartographie des interactions entre l'ADN et les facteurs de transcription permet de comprendre la régulation de l'expression génique. L'étude de ces mécanismes est souvent effectuée avec du matériel nucléaire purifié; cependant, les conclusions peuvent être spéculatives et incomplètes. Il est aussi possible de cartographier les facteurs de régulation d'un gène par la technologie LMPCR (*Ligation-Mediated PCR*; Réaction de Polymérisation en Chaîne Permise par un Adaptateur). Utilisée avec les techniques *in vitro*, cette approche *in cellulo* approfondit nos connaissances des mécanismes de régulation d'expression des gènes.

Summary

Genes of the human genome are regulated by a series of complex mechanisms. Essential data are obtained by mapping transcription factors from a particular gene. The collected and processed data may bring about important clues to help understand the regulation of a particular gene and to establish fundamental principles of gene regulation. In most studies, substrates and materials used to study gene expression are obtained following nuclear purification. Although experiments on such material bring essential information, this information is generally incomplete and often, only speculative conclusions can be drawn from it. Transcription factors from a specific gene can be mapped inside human living cells with LMPCR (Ligation-Mediated Polymerase Chain Reaction) technology. This *in cellulo* approach combined with classical *in vitro* techniques contributes to the understanding of the mechanisms that control gene expression.



Introduction

Les mécanismes de régulation de l'expression des gènes sont au cœur de la biologie cellulaire et moléculaire. Le développement d'un organisme depuis sa fécondation jusqu'à l'âge adulte dépend de l'harmonisation de l'expression de ses gènes en réponse aux stimuli (*Figure 1A*). Au cours de l'embryogenèse, la multiplication et la spécialisation de cellules contenant la même information génétique formeront divers organes et tissus. Certains gènes ont une fonction de régulation dans le temps et dans les tissus appropriés [1-3]. Sans une régulation étroite de la

transcription, l'expression anarchique des gènes nuirait au métabolisme cellulaire normal, au développement et à la survie de l'organisme. Le processus de cancérogenèse incarne parfaitement les conséquences de l'expression inadéquate de certains gènes. À titre d'exemple, l'expression de l'oncogène *c-myc*, un facteur de transcription, est accrue suite à la translocation 8;14, car son expression est contrôlée par le promoteur du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines [4, 5]. Cet article s'attarde à situer la contribution de l'analyse intracellulaire de l'ADN dans l'étude des différents mécanismes de régulation de la transcription des gènes.



Les principes de la régulation de l'expression génique

Les premiers modèles

Bien avant que le génome humain ne soit cartographié, les scientifiques ont entrepris d'étudier les mécanismes de régulation de l'expression des gènes. Les premiers concepts ont été formulés par François Jacob et Jacques Monod, récipiendaires du Nobel de physiologie/médecine en 1965 [6-8]. Ils proposaient l'existence d'un *messenger* servant d'intermédiaire entre les gènes

et leurs effecteurs biochimiques, les protéines (**Figure 1A**). Comme le *messenger* est tributaire de l'expression d'un gène, il devait exister un mécanisme contrôlant la production du *messenger*. Ils postulèrent le concept de l'*opérateur*. Ce dernier, aujourd'hui appelé promoteur, devait contrôler l'expression d'un gène à la manière d'un interrupteur. Des *répresseurs* étaient liés sur l'*opérateur* et bloquaient l'expression d'un gène et la production du *messenger*. Les connaissances actuelles ont confirmé et consolidé ces premiers modèles [9, 10].

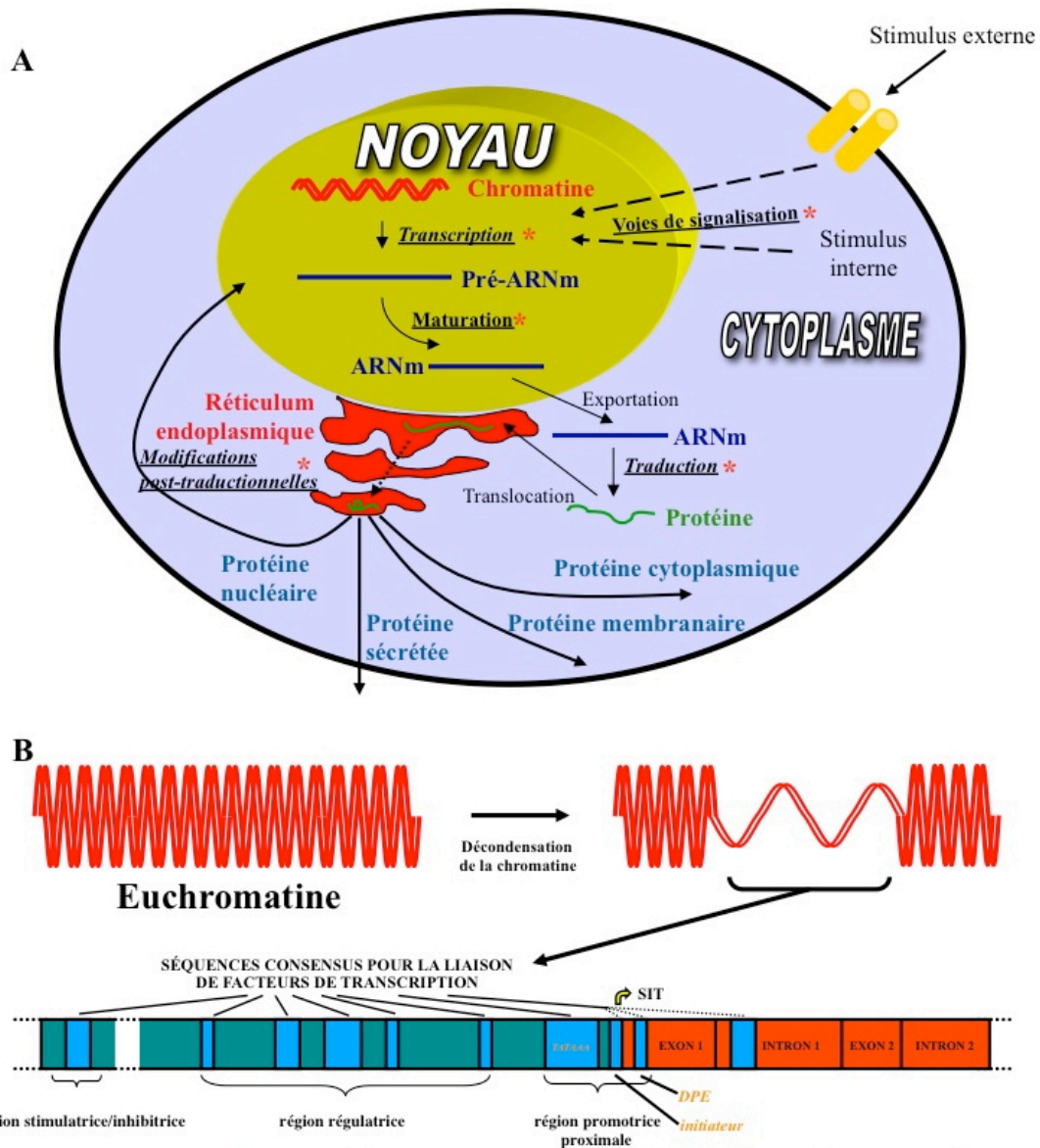


Figure 1

A) Principales étapes de production d'une protéine. Chaque étape (*) correspond à un point de contrôle de l'expression d'un gène.

B) Structure d'un gène classique. Les différents éléments de contrôle de l'initiation

de la transcription sont identifiés sur le promoteur (TATAAA : boîte TATA, SIT : site d'initiation de la transcription, DPE : Downstream core Promoter Element).



L'organisation de l'ADN permet la régulation des gènes

Dans le noyau, l'ADN est condensé sous forme de chromatine et organisé de manière séquentielle et ordonnée [11, 12]. L'organisation structurale de l'ADN constitue un mécanisme de répression de la transcription des gènes ([12]; *Figure 1B*). L'acétylation des histones et la méthylation des CpGs influencent aussi la structure de la chromatine [13-15]. Les facteurs de transcription se lient à des séquences particulières et régulatrices en amont des gènes (*Figure 1B*), modulant la transcription de ces derniers. Ils peuvent agir sur la condensation de la chromatine, l'initiation de la transcription et l'élongation du transcrit. Si certains facteurs de transcription comme Sp1 sont associés à l'activation d'une multitude de gènes [16]; d'autres sont limités à des gènes particuliers (p53; [17]). Cependant, certains facteurs protéiques interagissent avec l'ADN pour en bloquer l'accès et empêcher la transcription [18]. La concentration adéquate de facteurs de transcription est déterminante pour initier la transcription d'un gène [16, 18]. Plusieurs gènes adjacents sur un chromosome sont souvent co-exprimés, donnant lieu à une co-expression régionale [19, 20]. L'organisation nucléaire en domaines de transcription est caractérisée par la présence de deux gènes

participant au même phénotype mais localisés sur des chromosomes différents confinés dans un même domaine de transcription, soit très près l'un de l'autre dans le noyau interphasique [21-24]. Ces deux phénomènes faciliteraient l'expression simultanée de gènes participant au même phénotype.

La structure et l'expression d'un gène

Les gènes codants sont constitués de deux parties (*Figure 1B*): la **séquence transcrite** composée d'exons et d'introns, renfermant l'information pour produire une protéine, et la **séquence régulatrice** ou promotrice, située en amont de la séquence codante et contrôlant la production du messager. Certaines séquences introniques de gènes participent à la régulation de la transcription [25-27]. Le promoteur, qui peut s'étendre sur des milliers de paires de bases (pb), est divisé en trois parties distinctes: la **région promotrice proximale** s'étend des nucléotides -30 à +30 par rapport au site d'initiation de la transcription (SIT). Elle lie et positionne l'holoenzyme (ARN polymérase II et cofacteurs) au SIT. Cette région contient la séquence conservée TATAAA (boîte TATA). Le positionnement de l'holoenzyme au SIT peut se faire avec ou sans protéine TBP (*TATA box Binding Protein*). Les



séquences initiatrices (*initiator* : nucléotides -4 à +3) et DPE (*Downstream core Promoter Element* : nucléotides +30 à +36) permettent aussi le positionnement de l'holoenzyme au SIT [28-31]. Quant aux gènes ubiquitaires ou gènes d'entretien qui ne comprennent pas de boîte TATA ni séquence initiatrice, ils possèdent en revanche plusieurs SIT, un promoteur riche en GC et de multiples sites de liaison pour Sp1 positionnant l'holoenzyme au SIT. L'holoenzyme est capable d'initier la transcription *in vitro* mais des cofacteurs sont nécessaires pour initier la transcription *in cellulo*. L'initiation efficace de la transcription *in cellulo* nécessite une seconde région du promoteur située en amont de la région promotrice proximale et où se trouve la majorité des séquences reconnues par des facteurs de transcription (**séquences consensus**; **Figure 1B**). La **région stimulatrice/inhibitrice** est localisée quant à elle en amont du SIT. Elle participe à la régulation de la transcription [32, 33]. Sa fonction ne fait aucun doute mais ses mécanismes d'action demeurent encore imprécis [27, 34].

Suite à un stimulus, les facteurs de transcription se lient aux séquences régulatrices du promoteur pour activer l'expression d'un gène [32, 35, 36].

L'ouverture localisée de la chromatine permet alors à d'autres protéines activatrices d'accéder à leur séquence de reconnaissance. Ces protéines recrutent et stabilisent l'holoenzyme au SIT du promoteur pour une initiation efficace de la transcription. Les protéines régulatrices stabilisent la liaison de l'holoenzyme au SIT, augmentant le nombre d'initiations de transcription efficaces. Des gènes comme la β -globine nécessitent une restructuration plus étendue de la chromatine pour être activés [37]. Les séquences LCR (*locus control region*) situées aux extrémités des gènes rendent possible la restructuration de la chromatine sur de grandes distances [38, 39].

Certains facteurs favorisent la transcription, d'autres l'inhibent. L'action des répresseurs, tout comme la perte d'activateurs, peut mener à la re-condensation de la chromatine ou à une déstabilisation de la liaison de l'holoenzyme au SIT. Ces événements entraînent l'arrêt de la transcription. Certains facteurs ont besoin d'un cofacteur ou d'une modification post-transcriptionnelle pour être actifs [40]. D'autres, comme les récepteurs des glucocorticoïdes, nécessitent la liaison d'un ligand pour transactiver [41]. Certains



facteurs concentrent leur action à un type cellulaire particulier comme Pitx3, exprimé uniquement dans le système nerveux central [42].

La régulation de l'expression des gènes peut avoir lieu à différents niveaux (**Figure 1A**) : 1- Le signal externe peut être modulé lors de sa transmission au noyau. 2- La concentration de facteurs de transcription disponibles au SIT est critique. Les gènes nécessitant une translocation nucléaire du facteur NF-kB en sont un bon exemple [43]. 3- Le transcrit du gène, l'ARNm, peut être la cible d'une régulation lors de son épissage et de son exportation extranucléaire. Les éléments riches en AU (ARE) situés dans la région 3' non-traduite de plusieurs ARNm, sont responsables de l'instabilité des ARN et de leur courte demi-vie [44]. 4- La traduction de l'ARNm est également soumise à une régulation [45]. 5- Différentes modifications post-traductionnelles maintiennent la protéine active dans la cellule [46].

Les stratégies d'étude de la régulation de l'expression des gènes

L'analyse in vitro de l'ADN

Pour les besoins de cet article, *in cellulo* réfère à une cellule vivante et *in vitro* à de l'ADN purifié. Antérieurement, les méthodes étaient limitées à utiliser du matériel soustrait de son contexte cellulaire. Les techniques *in vitro* permettent d'identifier la protéine de liaison à une séquence spécifique, son domaine de liaison à l'ADN ainsi que la séquence consensus. Ces techniques mesurent l'effet de la liaison de la protéine sur la transcription d'un gène rapporteur, délimitent les régions stimulatrices et vérifient la présence de nucléosomes. La méthylation des CpGs et l'acétylation des histones peuvent également être étudiées [47-49]. *In cellulo*, l'ADN est sous forme de chromatine, il peut être méthylé et il peut adopter des structures secondaires particulières. De plus, l'ADN interagit avec des protéines impliquées dans la régulation de la transcription des gènes, la réparation, la réplication de l'ADN et l'attachement de l'ADN à la matrice nucléaire. Tous ces éléments sont souvent perdus suite à la purification ou au clonage de l'ADN [50].



Une séquence promotrice peut donc lier un facteur de transcription lors d'expériences *in vitro* et ne révéler aucune empreinte protéique *in cellulo* [51, 52]. Il est important d'élucider les mécanismes de régulation de la transcription des gènes avec des techniques utilisant des cellules vivantes en plus des techniques conventionnelles avec de l'ADN purifié.

Les principes de l'analyse intracellulaire de l'ADN

Parmi les outils d'analyse de l'ADN *in cellulo*, on utilise des agents de caractérisation causant des dommages à l'ADN intracellulaire. *In vitro*, chaque nucléotide possède une probabilité équivalente de dommage par un agent de caractérisation. Dans une cellule vivante, l'environnement nucléaire peut modifier l'accessibilité de certains nucléotides [53-56]. Des nucléotides d'un segment lié *in cellulo* par une protéine seront protégés de l'agent de caractérisation et vice-versa. Certains nucléotides localisés dans une structure particulière de la chromatine ou aux abords d'une interaction ADN-protéine peuvent avoir une réactivité plus grande *in cellulo* qu'*in vitro* lorsqu'ils sont exposés à un agent. En comparant du matériel cellulaire et purifié, les nucléotides peuvent

présenter une fréquence différente de dommages *in cellulo* versus *in vitro*. L'analyse intracellulaire de l'ADN compare le degré d'accessibilité d'un agent de caractérisation (**Figure 2B**) et visualise les interactions ADN-protéine et les structures secondaires à l'intérieur de la cellule.

Les agents de caractérisation

Pour qu'un agent puisse être utilisé comme agent de caractérisation, il doit produire des cassures monocaténaires à l'ADN. Un agent ne produisant pas directement de cassures peut être utilisé si les dommages sont entièrement convertibles en cassures monocaténaires. Trois agents sont utilisés dans les études d'interactions ADN-protéine *in cellulo* : le sulfate de diméthyle (DMS), les ultraviolets de type B ou C (UVB ou UVC) et la DNase I (**Tableau I** et **Figure 2A**). D'autres agents sont aussi utilisés pour cartographier des structures particulières: 1- Le KMnO_4 et la nucléase S1 sont sensibles à l'ADN monocaténaire [57, 58]; 2- l' OsO_4 détecte des structures rares de l'ADN comme l'ADN cruciforme [59] et 3- le bisulfite de sodium [60] et l'hydrazine [61] permet de cartographier les cytosines méthylées de l'ADN génomique purifié puisque leur méthylation est conservée lors de la purification de l'ADN.

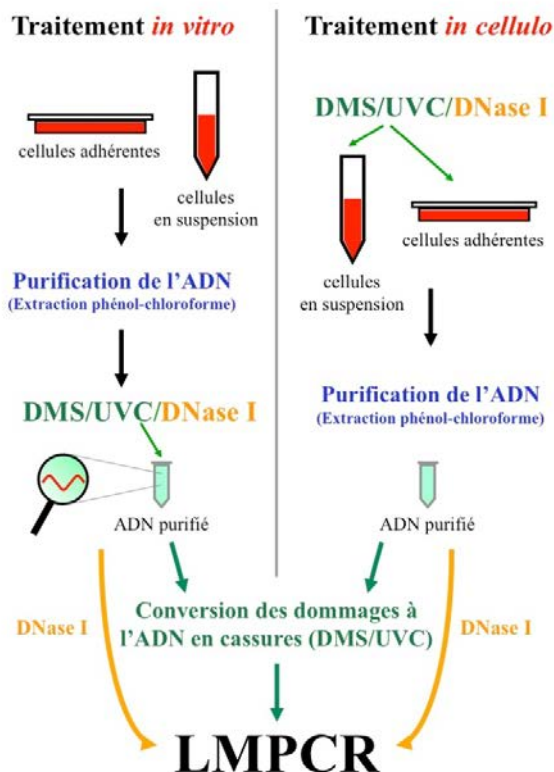


Figure 2A

Comparaison entre les traitements de l'ADN après sa purification (*in vitro*) et intracellulaire (*in cellulo*) avant la purification de l'ADN. Dans un traitement *in cellulo* (droite), les cellules sont exposées à l'agent de caractérisation (DMS, UVC ou DNase I). Dans un traitement *in vitro* (gauche), l'ADN purifié est exposé aux agents de caractérisation. La technologie LMPCR cartographie des cassures à l'ADN à une résolution au niveau du nucléotide.

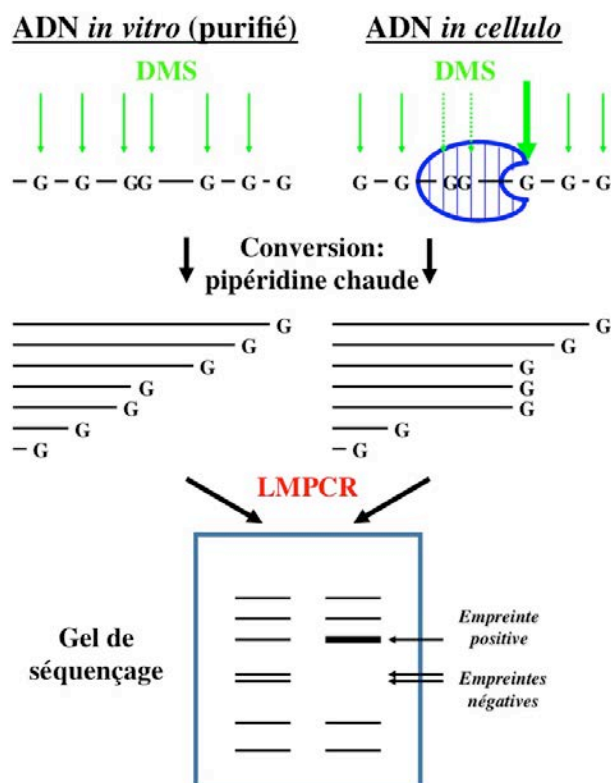


Figure 2B

Principes de la technologie LMPCR et du DMS. La conversion des guanines méthylées en cassures monocaténares produit des fragments de différentes longueurs. La liaison d'une protéine à une séquence d'ADN peut protéger cette dernière de l'action du DMS, diminuant la fréquence des guanines méthylées. D'autres guanines sont plus susceptibles d'être méthylées. L'intensité d'une bande *in cellulo* par rapport à celle *in vitro* sera plus (empreinte positive) ou moins intense (empreinte négative).



Agents de caractérisation	Action et conversion en cassures	Applications	Avantages	Limites
Diméthylsulfate (DMS)	<u>Action</u> Méthylation préférentielle de l'azote en position 7 des guanines <u>Conversion en cassures</u> Pipéridine (80°C)	-Localisation <i>in cellulo</i> des interactions ADN-protéine -Détection des structures spéciales de l'ADN	-Techniquement simple -Petite molécule très réactive -Pas de perméabilisation nécessaire.	-Requiert des guanines dans la séquence -Incapable de détecter toutes les interactions ADN-protéine
Irradiation UV (UVB ou UVC)	<u>Action</u> Deux types de dommages impliquant 2 pyrimidines adjacentes - dimères cyclobutyliques de pyrimidines (DCP) - photoproduits 6-4 (6-4PP) <u>Conversion en cassures</u> DCP: T ₄ endoV suivie de la photolyase 6-4 PP: photolyase et pipéridine (80°C)	-Localisation <i>in cellulo</i> des interactions ADN-protéine -Détection des structures spéciales de l'ADN -Détermination du positionnement des nucléosomes	-Techniquement simple -Traversent la membrane cytoplasmique sans la déstabiliser -Fixation des interactions ADN-protéine	-Requiert deux pyrimidines adjacentes dans la séquence -Parfois difficile de discerner une interaction ADN-protéine d'une structure spéciale de l'ADN
DNase I	<u>Action</u> Produit des cassures à l'ADN sans influence de la séquence <u>Conversion en cassures</u> Ne s'applique pas	-Localisation <i>in cellulo</i> des interactions ADN-protéine -Cartographie <i>in cellulo</i> les sites hypersensibles à la DNase I -Détermine le positionnement des nucléosomes	-Aucune restriction de séquence -Pas de conversion -Détection de la plupart des interactions ADN-protéine -Très sensible aux structures spéciales de l'ADN	-Techniquement plus complexe et moins reproductible -Grosse protéine nécessitant une perméabilisation membranaire

Tableau 1

Comparaison des agents de caractérisation utilisés avec la technique LMPCR pour l'analyse intracellulaire de l'ADN

Le séquençage génomique

Les cassures monocaténares induites par les agents de caractérisation sont analysées sur gel de polyacrylamide en utilisant la méthode de séquençage génomique mise au point par Church et Gilbert en 1984 [53]. Cette technique est suffisamment sensible pour détecter des différences d'intensité entre les bandes d'un gel de polyacrylamide, qui correspond à la fréquence de cassures monocaténares. Si

un nucléotide est protégé de l'action d'un agent par la présence d'une protéine, les fragments d'ADN correspondant à ce nucléotide seront moins nombreux que les fragments obtenus par le même traitement *in vitro*. Dans ce cas, on observe une empreinte négative. Inversement, une bande plus intense *in cellulo* qu'*in vitro* sera appelée empreinte positive (**Figure 2B**). Cette technique convient à l'étude de petits génomes comme celui de la levure. Cependant, son niveau de sensibilité ne



permet pas d'étudier des génomes plus volumineux comme ceux des mammifères. À la fin des années 80, plusieurs alternatives dérivant de la technique de séquençage génomique ont été développées dont la technique LMPCR [62].

La technique LMPCR

La LMPCR est une technique de séquençage génomique qui utilise la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour amplifier les fragments d'ADN présentant une cassure à une extrémité. L'utilisation d'amorces permet une sensibilité accrue surtout dans le cas de séquences uniques des génomes de mammifères. Suite à la dénaturation de l'ADN, une première amorce spécifique permet la polymérisation des fragments, interrompue lorsque la polymérase atteint une cassure produisant une molécule d'ADN bicaténaire avec une extrémité franche (**Figure 3**, étapes 1 à 3). Le choix d'une polymérase thermostable sans activité terminale transférase est importante à cette étape [63]. Comme les sites de cassures monocaténaires sont aléatoires, les fragments d'ADN polymérisés seront de tailles variables et les séquences terminales du côté de l'extrémité franche ne seront pas les mêmes. L'étape clé de la technologie

LMPCR est l'attachement d'un adaptateur à l'extrémité franche de toutes les molécules bicaténaires d'ADN (**Figure 3**, étape 4). De cette façon, les deux extrémités sont maintenant communes à tous les fragments. Une PCR conventionnelle est alors effectuée en utilisant de concert une seconde amorce spécifique et la plus longue amorce de l'adaptateur (**Figure 3**, étapes 5 et 6). Le nombre de molécules amplifiées correspond à la fréquence des cassures monocaténaires présentes au départ. Ces molécules sont finalement copiées par l'utilisation d'une dernière amorce conjuguée à un fluorochrome (**Figure 3**, étape 7). Un gel de polyacrylamide dénaturant permet de séparer les différents fragments selon leur taille et de les détecter par analyseur d'ADN (**Figure 3**, étape 8; [64]). Quatre échantillons préparés selon les réactions chimiques de Maxam et Gilbert [65] sont également traités par la LMPCR en parallèle avec les autres échantillons. Ils produiront une séquence, permettant de localiser les cassures des échantillons à analyser. Pour résumer, la technique LMPCR cartographie les cassures rares et en maintient la fréquence relative à travers toute la procédure. Elle peut ainsi être utilisée pour cartographier les interactions



ADN-protéine *in cellulo* [66, 67], les structures spéciales, les segments monocaténaire [68], le positionnement des nucléosomes [69], la méthylation des

cytosines [70], la distribution et la fréquence de dommages causés par un mutagène [71] et pour étudier la réparation au niveau de chaque nucléotide [72].

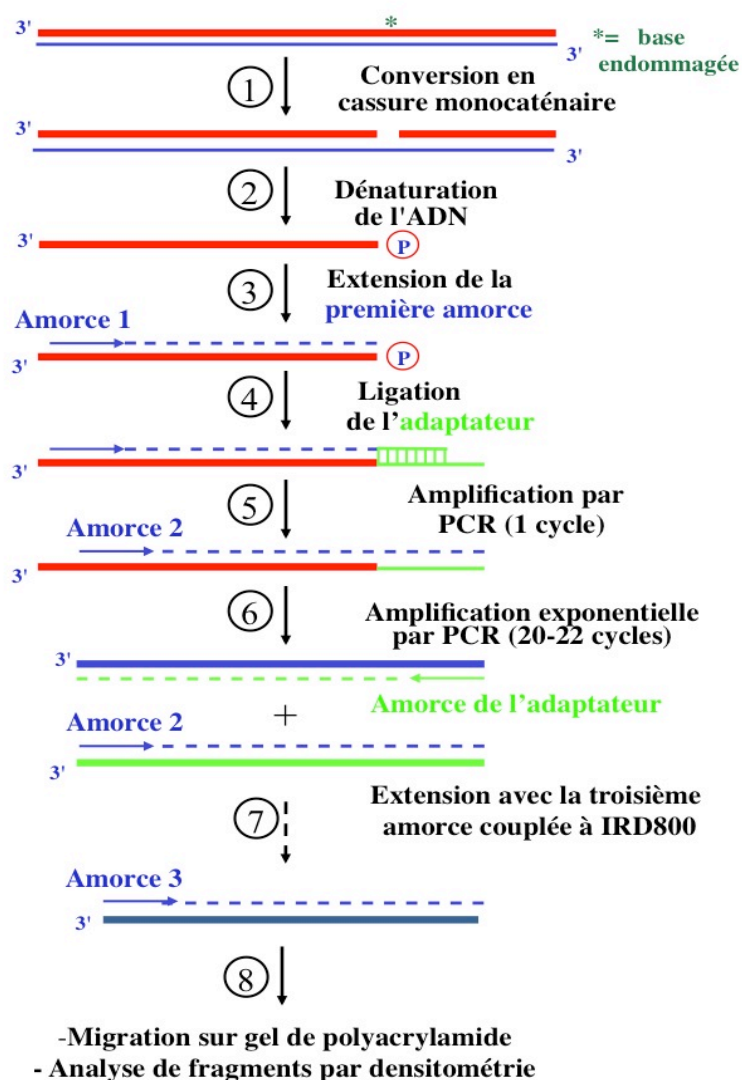


Figure 3

Principales étapes de la technologie LMPCR



Depuis sa mise au point en 1989 [73, 74], nous avons recensé plus de 600 publications où la technologie LMPCR a été employée. Elles portent sur la cartographie de dommages à l'ADN et la réparation de l'ADN et les interactions ADN-protéine au niveau des promoteurs de plusieurs gènes. Dans les paragraphes qui suivent, des exemples d'études des interactions ADN-protéine avec la technologie LMPCR seront présentés.

Le gène humain de la PhosphoGlycérate Kinase 1 (*PGK-1*) est localisé sur le chromosome X. *In cellulo*, des différences d'interactions ADN-protéine sont observées entre les promoteurs actif et inactif de *PGK-1* [69, 75]. Le promoteur actif est lié par plusieurs facteurs de transcription alors que le promoteur inactif ne montre pas de liaisons ADN-protéine. Suite à l'analyse intracellulaire à la DNase I, les auteurs ont observé des empreintes disposées régulièrement sur le promoteur inactif, confirmant la présence de nucléosomes [69]. Des résultats semblables ont été obtenus pour le gène *FMR-1* (*Fragile X Mental Retardation 1*) humain, associé au phénotype X-fragile [66]. Chez les individus atteints de la maladie, le gène *FMR-1* n'est pas transcrit. La mutation responsable du phénotype X-fragile est l'expansion massive

de triplets de CGG située dans l'exon 1 non-codant du gène *FMR-1*. Contrairement au gène actif, l'ensemble des CpGs du gène inactif sont méthylés [76], entraînant la formation d'hétérochromatine, empêchant sa transcription. *In cellulo*, quatre protéines sont présentes sur le promoteur du gène normal alors qu'elles sont absentes du promoteur des individus affectés [66, 77]. À partir des données *in cellulo*, une étude *in vitro* a pu identifier les protéines liant la séquence [78].

La transcription peut être induite par une nouvelle interaction ADN-protéine. Les gènes de l'oxide nitrique synthase [79] et de la tyrosine aminotransférase [80] en sont de bons exemples. Ces gènes sont inductibles et leur activation dépend de la liaison d'activateurs au promoteur. La perte d'une interaction ADN-protéine peut aussi activer la transcription *in cellulo*, comme pour le gène *cdc2* [81]. Le complexe p130-E2F-4 agit comme répresseur tout au long du cycle cellulaire. La perte de liaison du complexe en phase S permet la transcription du gène. L'analyse intracellulaire de ce type de système est comparée en utilisant des cellules stimulées ou non par un agent inducteur. L'action de l'agent peut être détectée par un changement dans le profil des empreintes ADN-protéine entre les



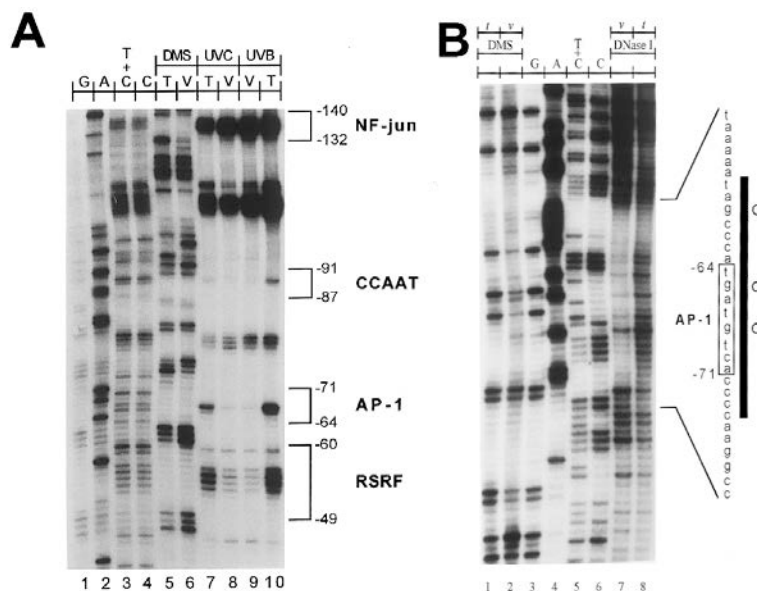
échantillons stimulés ou non.

Les interactions ADN-protéine peuvent être identiques sur des promoteurs de gènes actifs et inactifs, malgré une augmentation de la transcription. L'oncogène *c-jun* est fortement induit suite à une irradiation aux UV. L'analyse intracellulaire du promoteur effectuée avec le DMS, les UVC et la DNase I (**Figure 4**) n'a montré aucun changement dans le profil d'empreintes. Un modèle d'activation de *c-jun* propose que les facteurs de transcription sont liés au promoteur de façon constitutive avec un niveau de transcription basal [82].

L'irradiation des cellules entraîne l'action de cofacteurs agissant en *trans* avec les facteurs de transcription présents sur le promoteur. Ces facteurs ainsi activés assurent l'augmentation de la transcription du gène. Des résultats semblables ont été obtenus pour le promoteur du gène du récepteur humain des kinines 1 (*BRKD1*) par la stimulation avec l'interleukine-2 beta (*IL-2β*) [51]. Le profil des empreintes ADN-protéine de ce promoteur est identique entre les cellules contrôle et stimulées. Toutefois, d'autres mécanismes pourraient expliquer ce phénomène comme une séquence très éloignée du SIT et non-caractérisée.

Figure 4. Analyse du promoteur du gène *c-jun*.

A) L'ADN a été traité *in cellulo* (V) au DMS (puits 6), aux UVC (puits 8) et aux UVB (puits 9) puis purifié ou purifié puis traité *in vitro* (T) au DMS (puits 5), aux UVC (puits 7) et aux UVB (puits 10). **B)** L'ADN a été traité *in cellulo* (V) au DMS (puits 2) et à la DNase I (puits 7) puis purifié ou purifié puis traité *in vitro* (T) au DMS (puits 1) et à la DNase I (puits 8). Les puits 1 à 4 en **A)** et 3 à 6 en **B)** représentent la séquence après la méthode de Maxam et Gilbert et LMPCR. Les empreintes et séquences consensus sont délimitées par des boîtes. Les cercles vides en **B)** montrent les guanines protégées *in cellulo* de l'action du DMS. Le rectangle noir montre les séquences protégées *in cellulo* contre le clivage par la DNase I.





Une question de complémentarité

L'analyse intracellulaire de l'ADN jumelée à la technologie LMPCR est devenue un outil privilégié pour étudier la régulation de la transcription des gènes. Cet unique moyen de cartographie apporte des informations critiques dans la compréhension du mécanisme de régulation de la transcription d'un gène. La technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) [83-85], une technique *in cellulo* complémentaire à la technologie LMPCR, permet l'identification *in cellulo* des facteurs de transcription liés aux séquences d'ADN (**Tableau 2**). La technique LMPCR permet de situer très précisément les séquences d'ADN ayant une interaction avec un facteur de transcription. Les études *in vitro* sont très utiles pour étudier les mécanismes de régulation de l'expression des gènes. Cependant, la combinaison des analyses *in vitro* et *in cellulo* (LMPCR + ChIP) d'un promoteur offre une étude complète et plus approfondie. Des interactions ADN-protéine sont détectées *in vitro* alors qu'elles ne sont pas présentes *in cellulo* [52]. L'analyse complète et optimale des séquences

régulatrices d'un gène particulier devrait être initiée avec la technique LMPCR pour identifier les séquences d'ADN montrant la présence d'une liaison d'un facteur transcriptionnel ou d'une structure particulière de l'ADN. La technique ChIP et l'analyse informatique des séquences consensus permettront l'identification des facteurs de transcription impliqués. Par la suite, les techniques *in vitro* classiques comme les essais luciférase complèteront la caractérisation du promoteur et des mécanismes de régulation d'un gène donné. La bioinformatique ainsi que les banques de données telles que celles de *l'International Human Epigenome Consortium*, de *l'International Cancer Genomic Consortium* (ICGC) ou encore de ENCODE apportent notamment des informations sur les séquences fonctionnelles d'ADN du génome et sur les patrons de régulation épigénétiques.. De plus, une approche future basée sur le séquençage de nouvelle génération pouvant raffiner les connaissances obtenues jusqu'à présent avec la technique LMPCR doit être envisagée.



	LMPCR	CHIP
Applications	1. Localisation des interactions ADN-protéines 2. Cartographie des dommages à l'ADN 3. Cartographie de la réparation des dommages de l'ADN 4. État de méthylation de l'ADN 5. Séquençage de l'ADN	1. Détermination de la présence d'un facteur de transcription spécifique au niveau d'une séquence d'ADN 2. Distinction entre une interaction ADN-protéine et une interaction protéine-protéine ¹
Résolution	Au niveau nucléotidique	Séquences d'ADN de 50 à 100 pb
Sensibilité	Au moins 20 à 25% des cellules doivent lier le facteur de transcription	Au moins 10% des cellules doivent lier le facteur de transcription
Identification du facteur de transcription	Non	Oui
Localisation du site de liaison à l'ADN	Identification précise de la séquence d'interaction ADN-protéine	Limitée à une séquence d'ADN de 50 à 100 pb ²
Utilisation de cellules vivantes	Oui	Oui
Types de cellules	Tous	Tous
Traitements cellulaires possibles	Oui	Oui
Observation de structures secondaires particulières au niveau de la chromatine	Oui	Non

¹ possible si la protéine d'interaction est connue

² dans les cas d'interactions ADN-protéines **Tableau 2**

Comparaison des deux techniques d'analyse d'ADN *in cellulo*.

Conclusion

Il ne fait aucun doute que les modèles évoluent et se perfectionnent en parallèle du développement des techniques d'investigation. L'analyse intracellulaire de l'ADN permet de cibler les mécanismes de régulation de l'expression des gènes. Sa contribution majeure est d'identifier les séquences d'ADN qui lient un facteur de transcription. La compréhension des mécanismes de régulation de l'expression des gènes est l'une des premières étapes

de l'ère post-génomique. L'analyse intracellulaire de l'ADN constitue un outil essentiel pour améliorer notre compréhension de ces mécanismes. Le raffinement des techniques et la mise au point de nouvelles technologies permettant d'étudier les phénomènes biologiques dans leur « environnement naturel » devront se poursuivre, car les modèles découlant de ces études seront conformes à la réalité de la cellule vivante



Remerciements

Les auteurs remercient le Dr Yves Labelle pour ses critiques et ses suggestions. Régen Drouin a été détenteur de la chaire de recherche du Canada « Génétique, Mutagenèse et Cancer ». Les travaux rapportés dans cet article ont bénéficié du

soutien financier du Réseau Canadien de Maladies Génétiques (CGDN), du programme des chaires de recherche du Canada et des Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC).

Références

1. Xue L, Yi H, Huang Z, *et al.* Global gene expression during the human organogenesis: from transcription profiles to function predictions. *International journal of biological sciences* 2011; 7: 1068-76.
2. Yi H, Xue L, Guo MX, *et al.* Gene expression atlas for human embryogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2010; 24: 3341-50.
3. Zuniga A, Hodar C, Hanna P, *et al.* Genes encoding novel secreted and transmembrane proteins are temporally and spatially regulated during *Drosophila melanogaster* embryogenesis. *BMC biology* 2009; 7: 61.
4. Janz S. Myc translocations in B cell and plasma cell neoplasms. *DNA repair* 2006; 5: 1213-24.
5. Rabbitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994; 372: 143-9.
6. Jacob F, Perrin D, Sanchez C, *et al.* [The operon: a group of genes with expression coordinated by an operator]. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* 1960; 250: 1727-1729.
7. Jacob F, Ullman A, Monod J. [the Promotor, a Genetic Element Necessary to the Expression of an Operon]. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* 1964; 258: 3125-8.
8. Jacob F, Perrin D, Sanchez C, Monod J. [Operon: a group of genes with the expression coordinated by an operator]. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* 1960; 250: 1727-9.
9. Ma J. Transcriptional activators and activation mechanisms. *Protein & cell* 2011; 2: 879-88.
10. Larson DR. What do expression dynamics tell us about the mechanism of transcription? *Current opinion in genetics & development* 2011; 21: 591-9.
11. Alabert C, Groth A. Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nature reviews Molecular cell biology* 2012; 13: 153-67.
12. Johnson W, Jameson J. Transcriptional control of gene expression. In: Jameson J, ed. *Principles of molecular medicine*. Totowa, NJ: Humana Press, 1998: 25-41.
13. Davie JR, Chadee DN. Regulation and



regulatory parameters of histone modifications. *Journal of cellular biochemistry Supplement* 1998; 30-31: 203-13.

14. Kingston RE, Bunker CA, Imbalzano AN. Repression and activation by multiprotein complexes that alter chromatin structure. *Genes & development* 1996; 10: 905-20.

15. Sandaltzopoulos R, Blank T, Becker PB. Transcriptional repression by nucleosomes but not H1 in reconstituted preblastoderm *Drosophila* chromatin. *The EMBO journal* 1994; 13: 373-9.

16. Li L, Davie JR. The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Annals of anatomy* 2010; 192: 275-83.

17. Rashi-Elkeles S, Elkon R, Shavit S, *et al.* Transcriptional modulation induced by ionizing radiation: p53 remains a central player. *Molecular oncology* 2011; 5: 336-48.

18. Sekiya T, Zaret KS. Repression by Groucho/TLE/Grg proteins: genomic site recruitment generates compacted chromatin in vitro and impairs activator binding in vivo. *Molecular cell* 2007; 28: 291-303.

19. Cohen BA, Mitra RD, Hughes JD, Church GM. A computational analysis of whole-genome expression data reveals chromosomal domains of gene expression. *Nature genetics* 2000; 26: 183-6.

20. Hu S, Cheng L, Wen B. Large chromatin domains in pluripotent and differentiated cells. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 2012; 44: 48-53.

21. Bex F, Gaynor RB. Regulation of gene expression by HTLV-I Tax protein. *Methods* 1998; 16: 83-94.

22. Geyer PK, Vitalini MW, Wallrath LL. Nuclear organization: taking a position on gene

expression. *Current opinion in cell biology* 2011; 23: 354-9.

23. Stein DC, Gunn JS, Piekarowicz A. Sequence similarities between the genes encoding the S.NgoI and HaeII restriction/modification systems. *Biological chemistry* 1998; 379: 575-8.

24. Stein JL, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS. Control of cell cycle regulated histone genes during proliferation and differentiation. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 1996; 20 Suppl 3: S84-90.

25. Smith AN, Barth ML, McDowell TL, *et al.* A regulatory element in intron 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *The Journal of biological chemistry* 1996; 271: 9947-54.

26. Suen TC, Goss PE. Identification of a novel transcriptional repressor element located in the first intron of the human BRCA1 gene. *Oncogene* 2001; 20: 440-50.

27. Li J, Gilmour DS. Promoter proximal pausing and the control of gene expression. *Current opinion in genetics & development* 2011; 21: 231-5.

28. Burke TW, Kadonaga JT. *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes & development* 1996; 10: 711-24.

29. Smale S. Core promoter architecture for eukaryotic protein-coding genes. In: Conaway R, Conaway J, eds. *Transcription mechanisms and regulation*. New York: Raven Press, 1994: 63-81.

30. Jiang C, Pugh BF. Nucleosome positioning



and gene regulation: advances through genomics. *Nature reviews Genetics* 2009; 10: 161-72.

31. Baumann M, Pontiller J, Ernst W. Structure and basal transcription complex of RNA polymerase II core promoters in the mammalian genome: an overview. *Molecular biotechnology* 2010; 45: 241-7.

32. Evans NC, Swanson CI, Barolo S. Sparkling insights into enhancer structure, function, and evolution. *Current topics in developmental biology* 2012; 98: 97-120.

33. Ogbourne S, Antalis TM. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *The Biochemical journal* 1998; 331 (Pt 1): 1-14.

34. Blackwood EM, Kadonaga JT. Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 1998; 281: 60-3.

35. Felsenfeld G, Boyes J, Chung J, *et al.* Chromatin structure and gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93: 9384-8.

36. George CL, Lightman SL, Biddie SC. Transcription factor interactions in genomic nuclear receptor function. *Epigenomics* 2011; 3: 471-85.

37. Li Q, Harju S, Peterson KR. Locus control regions: coming of age at a decade plus. *Trends in genetics : TIG* 1999; 15: 403-8.

38. Milot E, Strouboulis J, Trimborn T, *et al.* Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell* 1996; 87: 105-14.

39. Kukreti S, Kaur H, Kaushik M, *et al.* Structural polymorphism at LCR and its role in beta-globin gene regulation. *Biochimie* 2010; 92:

1199-206.

40. Curthoys NP, Gstraunthaler G. Mechanism of increased renal gene expression during metabolic acidosis. *American journal of physiology Renal physiology* 2001; 281: F381-90.

41. Wessely O, Deiner EM, Beug H, von Lindern M. The glucocorticoid receptor is a key regulator of the decision between self-renewal and differentiation in erythroid progenitors. *The EMBO journal* 1997; 16: 267-80.

42. Lebel M, Gauthier Y, Moreau A, Drouin J. Pitx3 activates mouse tyrosine hydroxylase promoter via a high-affinity binding site. *Journal of neurochemistry* 2001; 77: 558-67.

43. Wang D, Baldwin AS, Jr. Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *The Journal of biological chemistry* 1998; 273: 29411-6.

44. Chen CY, Shyu AB. Selective degradation of early-response-gene mRNAs: functional analyses of sequence features of the AU-rich elements. *Molecular and cellular biology* 1994; 14: 8471-82.

45. Menotti E, Henderson BR, Kuhn LC. Translational regulation of mRNAs with distinct IRE sequences by iron regulatory proteins 1 and 2. *The Journal of biological chemistry* 1998; 273: 1821-4.

46. Gottifredi V, Shieh S, Taya Y, Prives C. p53 accumulates but is functionally impaired when DNA synthesis is blocked. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98: 1036-41.

47. Kass SU, Landsberger N, Wolffe AP. DNA methylation directs a time-dependent repression



of transcription initiation. *Current biology : CB* 1997; 7: 157-65.

48. Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing—a three-way connection. *The EMBO journal* 1998; 17: 4905-8.

49. Steigerwald SD, Pfeifer GP, Riggs AD. Ligation-mediated PCR improves the sensitivity of methylation analysis by restriction enzymes and detection of specific DNA strand breaks. *Nucleic acids research* 1990; 18: 1435-9.

50. Drouin R, Therrien JP, Angers M, Ouellet S. In vivo DNA analysis. *Methods in molecular biology* 2001; 148: 175-219.

51. Angers M, Drouin R, Bachvarova M, et al. In vivo protein-DNA interactions at the kinin B(1) receptor gene promoter: no modification on interleukin-1 beta or lipopolysaccharide induction. *Journal of cellular biochemistry* 2000; 78: 278-96.

52. Chen CJ, Li LJ, Maruya A, Shively JE. In vitro and in vivo footprint analysis of the promoter of carcinoembryonic antigen in colon carcinoma cells: effects of interferon gamma treatment. *Cancer research* 1995; 55: 3873-82.

53. Church GM, Gilbert W. Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984; 81: 1991-5.

54. Ephrussi A, Church GM, Tonegawa S, Gilbert W. B lineage—specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo. *Science* 1985; 227: 134-40.

55. Giniger E, Varnum SM, Ptashne M. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* 1985; 40: 767-74.

56. Nick H, Gilbert W. Detection in vivo of protein-DNA interactions within the lac operon of

Escherichia coli. *Nature* 1985; 313: 795-8.

57. Bui CT, Rees K, Cotton RG. Permanganate oxidation reactions of DNA: perspective in biological studies. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* 2003; 22: 1835-55.

58. Desai NA, Shankar V. Single-strand-specific nucleases. *FEMS microbiology reviews* 2003; 26: 457-91.

59. Palecek E, Boublikova P, Nejedly K. Probing of DNA structure with osmium tetroxide. Effect of ligands. *Biophysical chemistry* 1989; 34: 63-8.

60. Piperi C, Papavassiliou AG. Strategies for DNA methylation analysis in developmental studies. *Development, growth & differentiation* 2011; 53: 287-99.

61. Church GM, Gilbert W. The genomic sequencing technique. *Progress in clinical and biological research* 1985; 177: 17-21.

62. Cartwright IL, Kelly SE. Probing the nature of chromosomal DNA-protein contacts by in vivo footprinting. *BioTechniques* 1991; 11: 188-90, 92-4, 96 passim.

63. Angers M, Cloutier JF, Castonguay A, Drouin R. Optimal conditions to use Pfu exo(-) DNA polymerase for highly efficient ligation-mediated polymerase chain reaction protocols. *Nucleic acids research* 2001; 29: E83.

64. Drouin R, Bastien N, Millau JF, et al. In Cellulo DNA Analysis (LMPCR Footprinting). *Methods in molecular biology* 2009; 543: 293-336.

65. Maxam AM, Gilbert W. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods in enzymology* 1980; 65: 499-560.

66. Drouin R, Angers M, Dallaire N, et al. Structural and functional characterization of the



human FMR1 promoter reveals similarities with the hnRNP-A2 promoter region. *Human molecular genetics* 1997; 6: 2051-60.

67. Millau JF, Bastien N, Bouchard EF, Drouin R. p53 Pre- and post-binding event theories revisited: stresses reveal specific and dynamic p53-binding patterns on the p21 gene promoter. *Cancer research* 2009; 69: 8463-71.

68. Cloutier JF, Castonguay A, O'Connor TR, Drouin R. Alkylating agent and chromatin structure determine sequence context-dependent formation of alkylpurines. *Journal of molecular biology* 2001; 306: 169-88.

69. Pfeifer GP, Riggs AD. Chromatin differences between active and inactive X chromosomes revealed by genomic footprinting of permeabilized cells using DNase I and ligation-mediated PCR. *Genes & development* 1991; 5: 1102-13.

70. Hornstra IK, Nelson DL, Warren ST, Yang TP. High resolution methylation analysis of the FMR1 gene trinucleotide repeat region in fragile X syndrome. *Human molecular genetics* 1993; 2: 1659-65.

71. Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 1996; 274: 430-2.

72. Therrien JP, Loignon M, Drouin R, Drobetsky EA. Ablation of p21waf1cip1 expression enhances the capacity of p53-deficient human tumor cells to repair UVB-induced DNA damage. *Cancer research* 2001; 61: 3781-6.

73. Mueller PR, Wold B. In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. *Science* 1989; 246: 780-6.

74. Pfeifer GP, Steigerwald SD, Mueller PR, *et al.* Genomic sequencing and methylation

analysis by ligation mediated PCR. *Science* 1989; 246: 810-3.

75. Pfeifer GP, Tanguay RL, Steigerwald SD, Riggs AD. In vivo footprint and methylation analysis by PCR-aided genomic sequencing: comparison of active and inactive X chromosomal DNA at the CpG island and promoter of human PGK-1. *Genes & development* 1990; 4: 1277-87.

76. Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, *et al.* Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 66: 817-22.

77. Schwemmle S, de Graaff E, Deissler H, *et al.* Characterization of FMR1 promoter elements by in vivo-footprinting analysis. *American journal of human genetics* 1997; 60: 1354-62.

78. Kumari D, Usdin K. Interaction of the transcription factors USF1, USF2, and alpha - Pal/Nrf-1 with the FMR1 promoter. Implications for Fragile X mental retardation syndrome. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276: 4357-64.

79. Goldring CE, Reveneau S, Algarte M, Jeannin JF. In vivo footprinting of the mouse inducible nitric oxide synthase gene: inducible protein occupation of numerous sites including Oct and NF-IL6. *Nucleic acids research* 1996; 24: 1682-7.

80. Rigaud G, Roux J, Pictet R, Grange T. In vivo footprinting of rat TAT gene: dynamic interplay between the glucocorticoid receptor and a liver-specific factor. *Cell* 1991; 67: 977-86.

81. Tommasi S, Pfeifer GP. In vivo structure of the human cdc2 promoter: release of a p130-E2F-4 complex from sequences immediately upstream of the transcription initiation site coincides with induction of cdc2 expression. *Molecular and cellular biology* 1995; 15: 6901-13.



82. Rozek D, Pfeifer GP. In vivo protein-DNA interactions at the c-jun promoter: preformed complexes mediate the UV response. *Molecular and cellular biology* 1993; 13: 5490-9.

83. Crane-Robinson C, Wolffe AP. Immunological analysis of chromatin: FIS and CHIPS. *Trends in genetics : TIG* 1998; 14: 477-80.

84. de Wit E, de Laat W. A decade of 3C

technologies: insights into nuclear organization. *Genes & development* 2012; 26: 11-24.

85. Hao H. Genome-wide occupancy analysis by ChIP-chip and ChIP-Seq. *Advances in experimental medicine and biology* 2012; 723: 753-9.



Régulation génique en trois dimensions

Gene regulation in three dimensions

Christian Lanctôt^{1*}

¹Institut de biologie cellulaire et de pathologie
Première faculté de médecine, Université Charles à Prague

*Adresse de correspondance

Christian Lanctôt
UBBP
Première faculté de médecine
Université Charles à Prague
Albertov 4
128 00 Prague 2
CZ – République tchèque

Tél. +420 224 968 013
Télec. +420 224 917 418
christian.lanctot@lf1.cuni.cz



Christian Lanctôt

Article reçu le 29 Février 2012
Article accepté le 22 Mai 2012



Résumé

Le repliement tridimensionnel de la fibre de chromatine est responsable du positionnement différentiel des gènes non seulement à l'intérieur du noyau mais également les uns par rapport aux autres. La combinaison de techniques de microscopie à haute résolution et d'analyse génomique a permis de dégager les premières règles d'organisation spatiale de la chromatine. Cette organisation semble être dictée par la séquence primaire (densité génique), par la composition chimique des nucléosomes et par les nombreuses interactions entre chromatine et complexes moléculaires chargés de l'expression des gènes. Cette revue fait le point sur le rôle que joue la disposition spatiale de la chromatine dans la régulation génique.

Summary

The tridimensional folding of the chromatin fiber results in the differential positioning of genes not only inside the cell nucleus, but also relative to each other. A combination of high resolution microscopy techniques and genome-wide analyses has uncovered the first rules that govern the spatial organization of chromatin. This organization appears to be dictated by the primary sequence (gene density), the chemical nature of the nucleosomes and the many interactions that occur between chromatin and the molecular complexes involved in gene expression. Here we review the role that the 3D organization of chromatin plays in gene regulation.



Les cytologistes qui, à la fin du dix-neuvième siècle, ont découvert les chromosomes et proposé, les premiers, un lien entre cette découverte et l'hérédité, ne concevaient pas que ce lien pût être autre que la transmission, assurée par ces bâtonnets cellulaires, d'une structure tridimensionnelle spécifique à l'espèce. Pour Weismann, Boveri, Bateson, il allait de soi qu'il fallait chercher la clé de l'hérédité dans la disposition et la forme des chromosomes plutôt que dans leur composition chimique, qu'ils n'avaient d'ailleurs pas les moyens d'élucider. Il s'avéra qu'ils ne disposaient pas non plus des outils technologiques nécessaires à la poursuite d'une étude morphologique des chromosomes qui put véritablement aboutir. C'est en partie cette incapacité à déterminer la *structure* du matériel génétique qui poussa la génération suivante de chercheurs, Johannsen, Fisher, Morgan, pour ne citer que ceux-là, à introduire la notion abstraite de gène comme unité d'*information* et à reléguer aux oubliettes l'idée d'un génome structuré dans l'espace [1]. Sous la probable influence du structuralisme alors en vogue, cette idée refit surface à la fin des années 1970. Elle bénéficia grandement du développement de la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (*fluorescence in situ*

hybridization en anglais, acronyme FISH), qui permet de localiser avec précision des segments génomiques à l'intérieur du noyau cellulaire. Un premier résultat important fut rapidement obtenu grâce à cette technique : les fibres chromosomiques, loin d'être dispersées et enchevêtrées, forment des territoires distincts dans le noyau [2]. À partir du milieu des années 1990, la technique FISH fut employée dans une série d'études qui culmina avec la publication en 2005 de la topographie des 46 chromosomes dans le noyau de fibroblastes humains [3]. Depuis, d'importants travaux ont précisé les paramètres qui régissent la disposition du matériel génétique dans le noyau, ainsi que son impact sur la régulation génique. Cette revue se propose d'en résumer les grandes lignes, ainsi que de donner un aperçu des plus récentes avancées dans l'étude de la configuration spatiale du génome.



Positionnement radial et expression génique

Les premières analyses de l'arrangement tridimensionnel de la chromatine à l'intérieur du noyau ont porté sur le positionnement radial des territoires chromosomiques. Elles ont révélé que les chromosomes pour lesquels la densité génique est élevée sont fréquemment localisés au centre du noyau tandis que ceux à faible densité génique se retrouvent souvent à sa périphérie [4]. Cette observation, faite chez plusieurs espèces, vaut également pour des segments génomiques de l'ordre de 1 à 2 mégabases de longueur [5]. En fait, la densité génique environnante est un facteur déterminant dans le positionnement radial d'un gène donné. Comme la densité génique est corrélée positivement à un contenu élevé en G et C et à l'abondance de séquences répétées de type *Alu*, et comme ni l'un ni l'autre de ces paramètres ne sont constants le long du chromosome, on peut conclure que le positionnement radial des segments génomiques reflète le repliement complexe de la séquence linéaire du génome à l'intérieur du noyau cellulaire.

Si le positionnement radial est un fait établi, les résultats sont moins probants en ce qui a trait à l'influence réciproque entre

ce positionnement et l'activité génique. Plusieurs expériences ont montré que l'activité transcriptionnelle tend à être concentrée à l'intérieur du noyau, soit directement par marquage des ARN nouvellement synthétisés à l'aide d'analogues ribonucléotidiques, soit indirectement par localisation des modifications d'histones associées à la portion active de la chromatine (par exemple méthylation de la lysine 20 de l'histone H4) [6] ou à l'aide de sondes FISH dérivées des ARN messagers [7]. De même, plusieurs expériences ont montré la contrepartie, à savoir que les gènes inactifs se trouvaient préférentiellement à la périphérie du noyau [8]. Cette règle binaire centre-activité/périphérie-inactivité souffre cependant un certain nombre d'exceptions. Mentionnons le cas du gène *POU5F1*, inactivé lors de la perte de pluripotence de cellules souches embryonnaires tout en restant à l'intérieur du noyau [9], ainsi que celui du gène de la β -globine, activé au cours de la différenciation érythrocytaire alors qu'il se trouve à la périphérie [10]. Confrontés à ces résultats en apparence contradictoires, trois groupes de chercheurs ont entrepris de clarifier le lien entre localisation à la périphérie et activité transcriptionnelle dans les cellules vivantes



[11-13]. Pour ce faire, ils ont tous trois utilisé un schéma expérimental dans lequel le positionnement d'une séquence hétérologue d'opérateurs *laco* insérée dans le génome peut être fixé grâce à la fusion de son ligand spécifique, le répresseur *laci*, à une protéine de la périphérie nucléaire (lamine B1, LAP2 β ou émerine). L'expression de gènes avoisinants la séquence *laco* a été mesurée dans les cellules où le transgène était soit à l'intérieur du noyau, soit associé à la lamine nucléaire. Si l'une des études a effectivement conclu que le repositionnement des gènes à la lamine nucléaire s'accompagnait de leur répression transcriptionnelle [13], la seconde a pour sa part rapporté que les gènes repositionnés demeuraient activables [12] tandis que la troisième a observé des réponses variables d'un gène à l'autre [11]. Comme, somme toute, l'analyse au cas par cas n'a pas réussi à élucider le lien entre positionnement radial et régulation génique, le recours à des techniques biochimiques permettant une analyse à la grandeur du génome s'est imposé.

C'est précisément grâce à une technique ingénieuse, qui consiste à ancrer à la périphérie une adénine méthylase d'origine bactérienne et à isoler les fragments d'ADN méthylés par cette

enzyme (technique DamID), que van Steensel et ses collaborateurs ont pu identifier plus de 1300 segments génomiques associés à la lamine nucléaire dans les fibroblastes humains [14]. La caractérisation de ces LAD, pour *lamin-associated domains*, dont la longueur varie entre 0,1 et 10 mégabases et qui couvrent plus de 40% du génome, a confirmé que la localisation à la périphérie du noyau corrélait dans la grande majorité des cas avec densité génique faible, déplétion de l'ARN polymérase II et modifications d'histones associées à la chromatine inactive (par exemple méthylation de la lysine 27 de l'histone H3). Dans une étude subséquente, le même groupe a comparé la distribution des LAD dans trois types cellulaires : cellules souches embryonnaires ainsi que précurseurs neuronaux et astrocytes qui en sont dérivés [15]. Il ressort de cette comparaison que les distributions de LAD, qui contiennent de 13 à 18% des gènes et couvrent de 40 à 45% du génome selon le type cellulaire, se chevauchent largement. Malgré cela, des changements significatifs surviennent au cours de la différenciation cellulaire ; un total de 847 gènes se détachent de la lamine nucléaire au cours de la transition cellule souche/précurseur neuronal, par exemple.



La plupart sont bel et bien éventuellement activés et une large proportion code pour des facteurs essentiels à la neurogenèse. Le remodelage des interactions chromatine-lamine nucléaire apparaît donc être un élément crucial de la différenciation cellulaire.

Colocalisation des gènes et réseaux de régulation

Bien que certaines pistes moléculaires aient été identifiées, entre autres les interactions entre les répresseurs transcriptionnels GCL et BAF et certaines composantes de la lamine nucléaire telles LAP2 α [16], l'interprétation fonctionnelle du positionnement radial de la chromatine demeure incertaine. Il n'en est pas de même pour un second type d'organisation spatiale, à savoir la colocalisation dans le noyau de segments génomiques distants de plusieurs mégabases (Mb) ou parfois même situés sur différents chromosomes. En effet, dans ces cas, on présuppose simplement la nécessité pour les gènes colocalisés de partager des facteurs d'expression et de régulation, eux-mêmes concentrés en certains points du noyau. Une des plus belles illustrations de ce type de colocalisation est donnée par les complexes

homéotiques bithorax (BX-C) et Antennapedia (ANT-C) de *Drosophila melanogaster* [17]. Séparés par plus de 10 Mb sur le bras droit du chromosome 3, ces complexes « se touchent » plus fréquemment dans les noyaux de la tête de l'embryon, où ils sont inactifs, que dans ceux des parasegments postérieurs, où ils sont tous deux actifs. Cette colocalisation est détectée à des sites d'accumulation de protéines du groupe *polycomb*, celles-là même impliquées dans la répression transcriptionnelle des gènes homéotiques, et cette concentration dans l'espace, ainsi que le montrent les auteurs, assure une régulation plus robuste et mieux coordonnée de l'activité des gènes homéotiques.

L'idée d'une concentration spatiale des réactifs transcriptionnels qui, en favorisant et/ou en stabilisant les interactions moléculaires, irait de pair avec une expression génique plus robuste n'est pas nouvelle. Déjà le nucléole, site bien connu de transcription massive des ARN ribosomiaux, faisait (et continue de faire) figure de modèle. L'observation d'une distribution non uniforme des molécules actives d'ARN polymérase II a d'ailleurs conduit à la formulation du concept d'usines à transcription, c'est-à-dire de sites privilégiés pour la synthèse des ARN



messagers à l'intérieur du noyau [18]. Corollaire de ce concept : la fibre de chromatine devrait être repliée de telle façon que les gènes actifs soient regroupés dans les usines à transcription, ou à tout le moins à proximité de celles-ci. Certains auteurs sont allés jusqu'à proposer l'existence d'usines spécialisées dans la transcription de gènes impliqués dans un même processus biologique, usines et gènes formant ainsi un « interactome transcriptionnel » caractéristique d'un état cellulaire donné [19]. Des résultats sont venus étayer cette hypothèse, en particulier ceux récemment obtenus par analyse FISH montrant que les gènes activés au cours de la différenciation des globules rouges se rassemblent préférentiellement dans des usines qui contiennent le facteur de transcription érythrocytaire KLF1 [20]. Ceci étant dit, l'existence d'interactions spécifiques entre gènes ayant des profils d'expression et/ou des fonctions biologiques apparentés demeure controversée, d'autant que des expériences antérieures portant sur le gène de la β -globine ont montré que ce gène ne s'associait pas préférentiellement

avec des gènes exprimés comme lui dans les érythrocytes [21].

Le grand mérite de la technique FISH est de fournir une image, littéralement, du positionnement génique au niveau de la cellule individuelle. Elle présente cependant deux désavantages importants : un faible débit de criblage et une résolution moléculaire limitée (environ 500 nm, ce qui est 10 fois plus grand qu'un complexe moléculaire tel une usine à transcription). C'est pourquoi une panoplie de techniques ont été développées au cours des dernières années afin de cartographier à haute résolution l'ensemble des interactions qui ont lieu au sein de la fibre de chromatine [22]. Ces techniques, basées sur celle de *chromosome conformation capture* (3C), reposent sur 1) la fixation de la chromatine *in situ*; 2) la fragmentation de l'ADN ; et 3) étape cruciale, la ligation des extrémités d'ADN à très haute dilution afin de favoriser les réactions intramoléculaires au détriment des réactions intermoléculaires. De cette façon, la ligation de segments génomiques n'a lieu que s'ils se trouvaient près l'un de l'autre au moment de la fixation préalable (**Figure 1**).

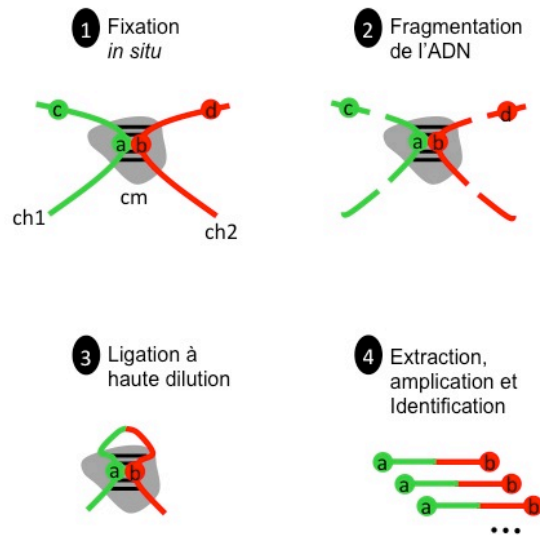


Figure 1
Principales étapes des techniques
biochimiques d'analyse d'interactions
chromatiniennes.

Dans cet exemple, deux segments génomiques (a,b) situés sur deux chromosomes différents (ch1, ch2) interagissent au sein d'un complexe moléculaire (cm). Les segments génomiques c et d, eux, ne forment pas de contacts.

La fixation de la chromatine *in situ* (étape 1) lie les segments a et b via le complexe moléculaire. Après fragmentation de l'ADN (étape 2), une ligation à très haute dilution génère des molécules d'ADN chimériques composées des segments génomiques qui interagissent (étape 3). Ces molécules sont extraites, amplifiées et identifiées (étape 4), soit sur micropuce ou par séquençage à haut débit.

Les fragments d'ADN chimériques servent donc de rapporteurs des interactions à longue distance au sein de la chromatine; ils peuvent être amplifiés, identifiés et quantifiés par hybridation sur micropuce (technique dite 4C) ou séquençage à haut débit. L'une des premières analyses systématiques d'interactions au sein de la fibre de chromatine a été faite sur le gène HOXB1 par Würtele et Chartrand [23]. Cette analyse a révélé que la vaste majorité des interactions impliquaient des séquences situées à ± 500 kb du gène HOXB1 et que le choix de ses partenaires était en apparence aléatoire. Une analyse faite sur une plus grande échelle, cette fois en

prenant le gène de la β -globine comme appât, a confirmé la prédominance des interactions intra-chromosomiques, mais a toutefois montré que les interactions, autant intra- qu'inter-chromosomiques, s'effectuaient entre gènes actifs d'un côté et gènes inactifs de l'autre [24]. Ainsi, le gène de la β -globine s'associe préférentiellement à des gènes actifs dans les érythrocytes et à des gènes comme lui inactifs dans le cerveau. Une telle partition de la chromatine en deux compartiments distincts a été observée plus généralement dans une étude ultérieure, au cours de laquelle ont été répertoriées 6,7 millions d'interactions entre segments distants de plus de 20 kb



[25]. Ces compartiments, baptisés sobrement A et B, ont des propriétés distinctes quant à la densité génique (élevée pour A, faible pour B), le niveau d'activité (élevé pour A, faible pour B), l'accessibilité (haute pour A, faible pour B), la compaction (moindre pour A que pour B) et le type de modifications des histones (caractéristiques de la chromatine active pour A). Le fait que peu d'interactions aient lieu entre ces deux compartiments indique qu'ils occupent des espaces distincts dans le noyau de la cellule et que, par conséquent, l'organisation spatiale de la chromatine n'est pas laissée au hasard même à ce haut niveau de résolution. Les auteurs proposent que chaque territoire chromosomique, à tout le moins sur une échelle de plusieurs mégabases, résulte de l'assemblage de globules de type A ou B, regroupés en globules toujours plus gros via un processus d'auto-organisation.

Récemment, Li et collaborateurs ont entrepris de caractériser l'ensemble des interactions qui ont lieu au sein des globules de type A, c'est-à-dire au sein de la chromatine active [26]. Pour ce faire, ces auteurs ont inséré dans le protocole de la technique 3C, avant la ligation à haute dilution des extrémités d'ADN, une étape d'immunoprécipitation visant à isoler les

complexes chromatinien qui contiennent la machinerie transcriptionnelle (anticorps dirigé contre la sous-unité principale de l'ARN polymérase II). Un total de 1 328 complexes contenant plus d'un gène ont pu être identifiés. Collectivement, ces complexes contiennent 11 723 gènes, soit une moyenne de 8,8 gènes par complexe. L'étude a montré que le niveau d'expression de ces gènes était supérieur à celui des gènes qui, tout en étant actifs, ne faisaient pas partie de tels complexes multigéniques. Il apparaît donc que l'agrégation spatiale des gènes favorise la transcription. Qu'en est-il toutefois de la régulation de ces gènes ? Les éléments régulateurs d'un gène peuvent-ils agir sur un autre gène lorsqu'ils le côtoient dans l'espace ? C'est à ces questions qu'ont voulu répondre Noordermeer et collaborateurs en étudiant l'action à distance du principal élément de régulation du gène de la β -globine humaine (élément LCR ou *locus control region*) [27]. Introduit par transgénèse sur le chromosome 8 de la souris, le LCR humain contacte plusieurs gènes, y compris plusieurs situés sur d'autres chromosomes. Cependant, un seul d'entre eux, le gène $\beta h1$ du complexe β -globine de souris sur le chromosome 7, voit son activité augmenter du fait de la proximité spatiale du LCR

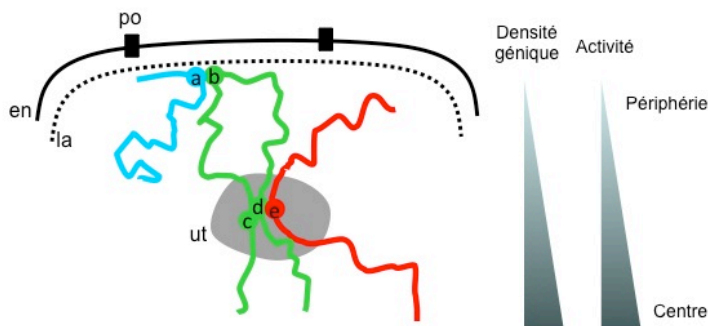


hétérologue. Comme les interactions entre le LCR humain et $\beta h1$ ne sont pas détectées dans toutes les cellules, les auteurs proposent que, bien que rarement fonctionnelles, les interactions spatiales entre segments génomiques peuvent être responsables de la variabilité d'expression d'un gène au sein d'une population cellulaire.

Conclusion et perspectives

Les recherches dans le domaine de l'architecture nucléaire démontrent clairement que, sans être déterministe, le repliement de la chromatine à l'intérieur du noyau adopte une certaine structure, en particulier une concentration spatiale des gènes exprimés d'un côté et des gènes inactifs de l'autre, ces derniers ayant tendance à être localisés davantage à la périphérie du noyau (**Figure 2**).

Figure 2



Configuration spatiale et activité de la chromatine dans le noyau cellulaire.

Certains segments génomiques (a-e) servent de points de contacts à l'intérieur d'un même chromosome (c et d) ou entre différents chromosomes (a et b, c/d et e).

Les gènes a et b, situés dans des régions de faible densité génique et apposés à la lamine nucléaire (la), forment un compartiment inactif. Les gènes c, d et e sont rassemblés dans une usine à transcription (ut) à l'intérieur du noyau. Du fait de cette double localisation, leur transcription atteint des niveaux élevés

À l'intérieur de chacun de ces domaines, et sur différentes échelles, les gènes établissent entre eux de nombreux contacts. Dans le cas de la chromatine active, ces interactions ont souvent lieu autour de complexes moléculaires tels les usines à transcription. Il reste maintenant à déterminer, grâce aux nouvelles techniques

d'analyse à grande échelle des interactions intergéniques, s'il existe des « interactomes » chromatinien caractéristiques de types cellulaires donnés. Les travaux décrits ici s'inscrivent dans le domaine plus large de l'épigénétique, c'est-à-dire le contrôle de l'expression des gènes qui ne repose pas sur la séquence d'ADN



mais plutôt sur l'environnement chromatinien. Les mécanismes épigénétiques les mieux caractérisés opèrent par l'entremise de modifications post-traductionnelles des molécules d'histone (méthylations, acétylations, phosphorylations, etc.). On parle souvent, pour désigner l'ensemble de ces

modifications, de « code histone ». Compte tenu de l'importance grandissante que prend le repliement tridimensionnel de la fibre de chromatine dans l'analyse de l'expression des gènes, il serait sans doute utile d'ajouter au code histone un code épigénétique structural qui l'englobe et le complète.

Remerciements

Je remercie l'Agence tchèque pour la science (GAČR) pour son soutien financier (subventions P302/11/1262 et P305/12/1246). Je suis reconnaissant à l'un

des évaluateurs de cet article d'avoir proposé l'expression « code épigénétique structural », que je lui ai empruntée afin de décrire l'ensemble des données décrites ici.

Références

1. Pichot A. *Histoire de la notion de gène*. Paris: Flammarion, 1999: 352 p.
2. Cremer T, Cremer C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature reviews* 2001; 2: 292-301.
3. Bolzer A, Kreth G, Solovei I, et al. Three-Dimensional Maps of All Chromosomes in Human Male Fibroblast Nuclei and Prometaphase Rosettes. *PLoS biology* 2005; 3: e157.
4. Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore WA. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *The Journal of cell biology* 1999; 145: 1119-31.
5. Shopland LS, Lynch CR, Peterson KA, et al. Folding and organization of a contiguous chromosome region according to the gene distribution pattern in primary genomic sequence. *The Journal of cell biology* 2006; 174: 27-38.
6. Skalnikova M, Bartova E, Ulman V, et al. Distinct patterns of histone methylation and acetylation in human interphase nuclei. *Physiol Res* 2007.
7. Kosak ST, Scalzo D, Alworth SV, et al. Coordinate gene regulation during hematopoiesis is related to genomic organization. *PLoS biology* 2007; 5: e309.
8. Lanctôt C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T. Dynamic genome architecture in



- the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nature reviews* 2007; 8: 104-15.
9. Wiblin AE, Cui W, Clark AJ, Bickmore WA. Distinctive nuclear organisation of centromeres and regions involved in pluripotency in human embryonic stem cells. *Journal of cell science* 2005; 118: 3861-8.
 10. Ragoczy T, Bender MA, Telling A, Byron R, Groudine M. The locus control region is required for association of the murine beta-globin locus with engaged transcription factories during erythroid maturation. *Genes & development* 2006; 20: 1447-57.
 11. Finlan LE, Sproul D, Thomson I, *et al.* Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells. *PLoS genetics* 2008; 4: e1000039.
 12. Kumaran RI, Spector DL. A genetic locus targeted to the nuclear periphery in living cells maintains its transcriptional competence. *The Journal of cell biology* 2008; 180: 51-65.
 13. Reddy KL, Zullo JM, Bertolino E, Singh H. Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature* 2008; 452: 243-7.
 14. Guelen L, Pagie L, Brassat E, *et al.* Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* 2008; 453: 948-51.
 15. Peric-Hupkes D, Meuleman W, Pagie L, *et al.* Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation. *Molecular cell* 2010; 38: 603-13.
 16. Shakhai S, Amariglio N, Rechavi G, Simon AJ. Gene silencing at the nuclear periphery. *The FEBS journal* 2007; 274: 1383-92.
 17. Bantignies F, Roure V, Comet I, *et al.* Polycomb-dependent regulatory contacts between distant Hox loci in *Drosophila*. *Cell* 2011; 144: 214-26.
 18. Jackson DA, Hassan AB, Errington RJ, Cook PR. Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *The EMBO journal* 1993; 12: 1059-65.
 19. Cook PR. A model for all genomes: the role of transcription factories. *Journal of molecular biology* 2010; 395: 1-10.
 20. Schoenfelder S, Sexton T, Chakalova L, *et al.* Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells. *Nature genetics* 2010; 42: 53-61.
 21. de Laat W. Long-range DNA contacts: romance in the nucleus? *Current opinion in cell biology* 2007; 19: 317-20.
 22. van Steensel B, Dekker J. Genomics tools for unraveling chromosome architecture. *Nature biotechnology* 2010; 28: 1089-95.
 23. Würtele H, Chartrand P. Genome-wide scanning of HoxB1-associated loci in mouse ES cells using an open-ended Chromosome Conformation Capture methodology. *Chromosome Res* 2006; 14: 477-95.
 24. Simonis M, Klous P, Splinter E, *et al.* Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). *Nature genetics* 2006; 38: 1348-54.
 25. Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, *et al.* Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science (New York, NY)* 2009; 326: 289-93.
 26. Li G, Ruan X, Auerbach RK, *et al.* Extensive promoter-centered chromatin interactions provide a topological basis for transcription regulation. *Cell* 2012; 148: 84-98.
 27. Noordermeer D, de Wit E, Klous P, *et al.* Variegated gene expression caused by cell-specific long-range DNA interactions. *Nature cell biology* 2011; 13: 944-51.



Rôle du TGF β dans le cancer chez l'humain : de la suppression tumorale vers le développement des métastases

The dual role of TGF β in human cancer: from tumor suppression to cancer metastasis

Jean-Charles Neel¹, Laure Humbert¹, Jean-Jacques Lebrun*

Division d'oncologie médicale, Département de médecine, Centre universitaire de santé McGill,
Montréal, Canada.

¹ Ces auteurs ont contribué de manière équivalente à ce manuscrit

*Correspondance: Jean-Jacques Lebrun
Hôpital Royal Victoria
687, avenue des Pins Ouest
Montréal (Québec) Canada H3A 1A1
Tél.: 514 934 1934, poste 34846
Fax : 514 982 0893
Courriel: jj.lebrun@mcgill.ca
URL: www.hcru.mcgill.ca



Jean-Jacques Lebrun

Article reçu le : 13 mars 2012
Article accepté le : 10 avril 2012



Résumé

Le TGF β appartient à une large famille de facteurs de croissance polypeptidiques qui régulent le programme de développement, la croissance, la différenciation et l'homéostasie de la plupart des types cellulaires et tissulaires. Le TGF β agit comme un suppresseur de tumeur en régulant la prolifération, la mort cellulaire et l'immortalisation. Des mutations dans les gènes codant les molécules de la voie de signalisation du TGF β sont fréquemment observées dans les cancers chez l'humain, reflétant un rôle important du TGF β dans la suppression tumorale. Cependant, le TGF β joue un double rôle dans le cancer. En effet, alors qu'il agit comme suppresseur de tumeur dans les cellules normales ou les stades précoces de carcinome, le TGF β agit comme un agent pro-métastatique dans les stades avancés de cancer, favorisant l'apparition de métastases. De ce fait, des stratégies thérapeutiques visant à inhiber ces effets pro-métastatiques du TGF β sont en cours de développement. Nous décrivons dans cet article ce paradoxe du TGF β ses mécanismes et son rôle pour la progression tumorale.

Summary

TGF β belongs to a large family of widespread and evolutionarily conserved polypeptide growth factors that contributes to the orchestration and modulation of the developmental program, growth and differentiation profile and functional homeostasis of almost all cell types and tissues. Mutations or deletions of TGF β signaling components are frequent in human cancers indicating a tumor suppressor role for this growth factor. However TGF β has a dual role in cancer. Indeed, while TGF β exerts growth inhibitory responses in early stage cancer by inhibiting growth, inducing apoptosis, and preventing immortalization, it acts as a pro-metastatic agent in advanced tumor stages by providing tumor cells with a favorable microenvironment and invasive properties. This has led to the development of therapeutic strategies aiming at inhibiting the pro-metastatic arm of the TGF β signaling pathway. In this review, we will describe the dual role of TGF β in cancer, its molecular mechanisms and its contribution to tumor progression.



I - Introduction

En 1978, un nouveau facteur de croissance transformant, le TGF β (*Transforming Growth Factor β*) est identifié ; sécrété par des cellules infectées par le virus du sarcome, il confère temporairement à des fibroblastes des caractéristiques de cellules transformées [1-3]. Dès lors, d'autres facteurs de croissance, appartenant à la même famille, ont été identifiés. Aujourd'hui, on compte plus de quarante membres dans cette famille, incluant entre autres les activines, les *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP), la protéine nodal, la myostatine et la substance inhibitrice müllérienne [4]. Il existe trois formes distinctes du TGF β (TGF β -1, -2, -3), codées par des gènes distincts, qui conservent toutefois 70% d'homologie entre elles [4-7]. La forme active du TGF β -1, qui est la plus étudiée et communément appelée TGF β , est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif latent constitué de deux molécules de TGF β liées par des interactions hydrophobes et un pont disulfure, ainsi que des protéines associées [8]. Le précurseur est sécrété dans la matrice extracellulaire (MEC) qui en assure le stockage, où il pourra être activé. L'activation du TGF β est régulée par de multiples processus. En

effet, la maturation du TGF β résulte de l'activité enzymatique de protéases (furines, plasmine, calpaïne, etc.), des traitements physico-chimiques (acidification, chaleur, dérivés réactifs de l'oxygène, etc.), ainsi que de la liaison du complexe latent au récepteur mannose-6-phosphate. Par ailleurs, l'activation du TGF β est aussi contrôlée par les glycosidases, la thrombospondine et certaines molécules thérapeutiques (anti-oestrogènes, acides rétinoïques, etc.) [9, 10] (**Figure 1**). Après la découverte de ses récepteurs de surface dans les années 1980 [11, 12], cette cytokine, exprimée de façon ubiquitaire, a été montrée comme étant en cause dans le programme de développement, la croissance, la différenciation et l'homéostasie de la plupart des types cellulaires et tissulaires [5, 13]. Le TGF β régule la division cellulaire asymétrique et le déterminisme lors de l'embryogénèse, la reproduction, les réponses immunitaires, la croissance cellulaire, l'apoptose, la formation osseuse, l'organisation et la réparation des tissus et l'érythropoïèse au cours de la vie adulte [14]. Les pertes de fonction des voies de signalisation du TGF β conduisent à des pathologies hyperprolifératives, au développement de cancers ainsi qu'à des maladies



inflammatoires et auto-immunes, alors que les gains de fonction favorisent l'immunosuppression et le développement de métastases [6, 15]. Le TGF β exerce donc un double rôle lors du développement

tumoral : initialement, il agit comme suppresseur de tumeur ; cependant, ces effets sont perdus au cours de la progression tumorale [16-20].

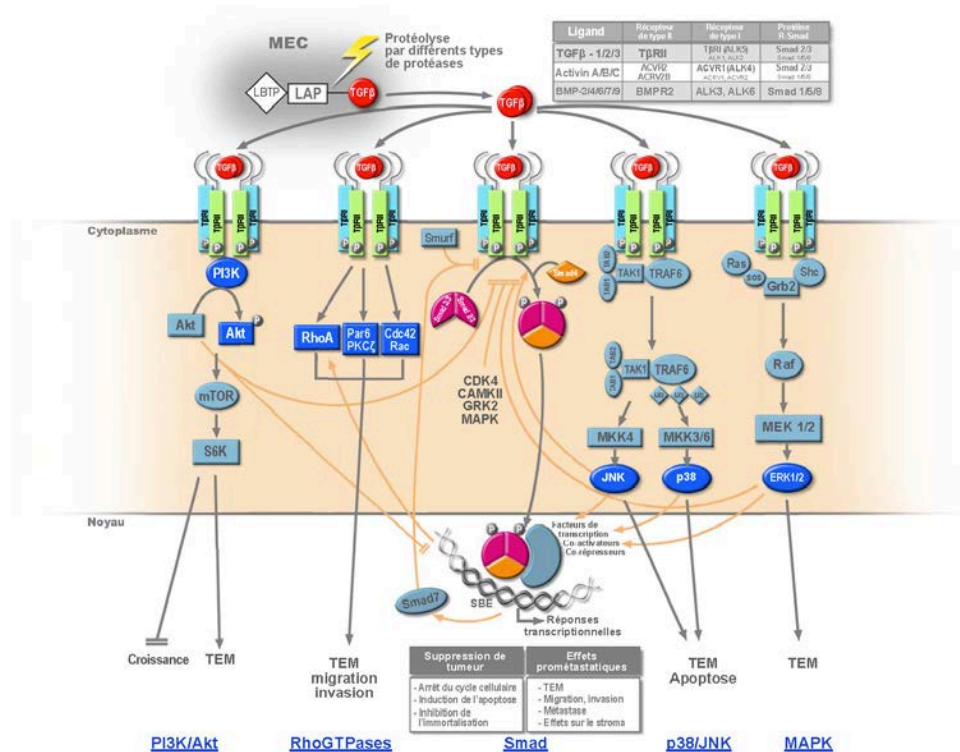


Figure 1
Les voies de signalisation du TGF β

Le ligand TGF β actif est un dimère synthétisé sous forme d'un précurseur stocké dans la MEC. La transmission du signal débute par l'interaction du ligand avec un complexe de deux récepteurs transmembranaires de type sérine/thréonine kinases. Le TGF β se lie d'abord au récepteur de type II (TβRII) constitutivement autophosphorylé, qui recrute le récepteur de type I (TβRI) et le transphosphoryle. Ensuite, le TβRI phosphoryle des protéines Smad2 et Smad3 qui s'associent à

la protéine Smad4. Cet hétérocomplexe est redirigé dans le noyau où il se lie à l'ADN. En plus d'activer la voie de signalisation des protéines Smad, le TGF β est aussi capable de transmettre ses signaux via la voie des kinases activées en réponse au stress (p38 et JNK), la voie des RhoGTPases, la voie MAPK impliquant ERK et la voie PI3K/mTOR. Toutes ces voies de signalisation sont interconnectées (flèches oranges).



II- Les voies de signalisation du $TGF\beta$

Comme il est indiqué dans la **Figure 1**, la transmission du signal par le $TGF\beta$ débute par l'interaction du ligand avec un complexe de deux récepteurs spécifiques qui sont des protéines transmembranaires de type sérine/thréonine kinases [5, 21, 22]. Le $TGF\beta$ se lie d'abord au récepteur de type II ($T\beta RII$) constitutivement autophosphorylé, qui recrute ensuite le récepteur de type I ($T\beta RI$) dans le complexe. Le $T\beta RII$ transphosphoryle alors le $T\beta RI$ dans sa région juxta-membranaire, une région riche en résidus glycine et sérine [21, 22]. Le $T\beta RI$ recrute et phosphoryle ensuite des protéines intracellulaires, appelées Smad2 et Smad3 (R-Smad). Une fois phosphorylées, les protéines Smad2 et Smad3 se détachent du récepteur pour s'associer, dans le cytoplasme, à une autre protéine Smad, appelée Smad4 [23-26]. Cet hétérocomplexe de protéines Smad est ensuite redirigé dans le noyau où il se liera à l'ADN avec une très faible affinité [27]. Pour former un complexe de haute affinité avec l'ADN, les protéines Smad s'associent généralement à des facteurs de transcription et des coactivateurs ou corépresseurs de la transcription, déterminant ainsi la spécificité cellulaire et

tissulaire des fonctions du $TGF\beta$ [28-30]. Par ailleurs, il existe des signalisations croisées entre les différentes voies du $TGF\beta$ et d'autres voies de signalisation : par exemple, l'activation des protéines Smad peut également activer le récepteur à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) et induire la TEM [31]. Comme indiqué sur la **Figure 1**, en dehors des protéines Smad, d'autres voies de signalisation en aval des récepteurs du $TGF\beta$ ont aussi été mises en évidence. La voie MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) active les protéines ERK1 et ERK2 par une cascade faisant intervenir les protéines Shc, Raf et MEK, et mène à l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) [32-34]. La voie des kinases activées en réponse au stress (p38 et JNK [*Jun N-terminal Kinase*]) fait intervenir l'ubiquitination de la protéine TRAF6 et l'activation des protéines MKK, entraînant l'apoptose et la TEM [34-40]. La voie des RhoGTPases joue un rôle dans l'organisation du cytosquelette dans la motilité cellulaire et l'induction de la TEM, donc dans la migration et l'invasion à l'aide, entre autres, des protéines RhoA, Cdc42 et Rac [41, 42]. Enfin, la voie Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)/Akt fait intervenir la protéine mTOR pour inhiber la croissance cellulaire [43] et induire la TEM [44, 45]. Ces voies indépendantes des protéines Smad sont



donc en cause dans le double rôle du TGF β , puisqu'elles agissent en grande partie pour induire des effets pro-métastatiques du TGF β . Les voies du TGF β induisent l'expression de la protéine Smad7 qui inhibe de manière rétroactive la transmission du signal. Cependant, le rôle de Smad7 est encore incertain : tandis que la surexpression de Smad7 dans des cellules de mélanomes inhibe *in vivo* les métastases vers les os [46], son expression est corrélée à la taille de la tumeur dans le cancer du côlon [47] et dans le cancer du sein [48], suggérant que Smad7 puisse exercer une régulation positive sur le développement tumoral, selon le contexte.

III- Le TGF β et la suppression tumorale

Le TGF β inhibe la croissance de multiples types cellulaires, comme les cellules épithéliales, endothéliales, myéloïdes et lymphoïdes, et a été défini comme un suppresseur de tumeur [4, 19, 49]. Ces effets s'expliquent par l'inhibition du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose et l'inhibition de l'immortalisation cellulaire (**Figure 2**).

Inhibition du cycle cellulaire : La progression du cycle cellulaire nécessite l'activation des protéines kinases

dépendantes des cyclines (*Cyclin Dependent Kinases* ou CDK) par association à leurs sous unités régulatrices, les cyclines. Une fois activées, ces kinases induisent la transcription et l'expression des molécules régulatrices du cycle cellulaire (ADN polymérase, oncogènes, etc.). Le TGF β entraîne l'arrêt du cycle cellulaire, via l'induction de l'expression de petites molécules inhibitrices de ces CDK (CDKI). En effet, le TGF β induit principalement le *CDKI p15^{INK4B}* [[50]] mais aussi *p21^{CIP1}* [51]. L'augmentation d'expression de *p15^{INK4B}* entraîne sa liaison avec les kinases CDK4 et CDK6 bloquant leur association avec les cyclines et leur fonction, induisant ainsi un arrêt de la prolifération en phase G1 du cycle cellulaire. En outre, l'association de *p15^{INK4B}* avec les complexes cyclines D-CDK4/6 déloge *p21^{CIP1}* et *p27^{KIP1}* de ces complexes, leur permettant d'inactiver d'autres complexes cycline-CDK [52]. En parallèle, le TGF β est aussi capable d'inhiber l'expression de facteurs stimulant la croissance, comme l'oncogène c-MYC [53, 54] et les facteurs de transcription ID à motif hélice-boucle-hélice [55]. Les protéines c-MYC et ID présentent une expression accrue dans de nombreux types de cancer et régulent la croissance cellulaire, la différenciation et l'angiogenèse [55-57] ; leur répression par le TGF β

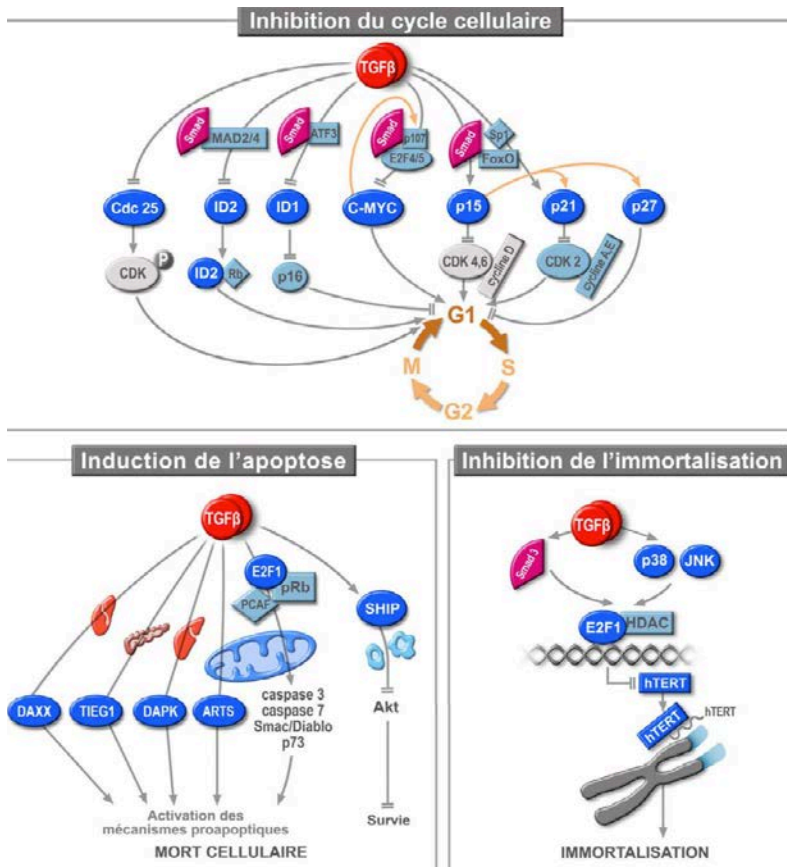


contribue donc fortement aux effets antiprolifératifs de ce facteur. Par ailleurs, dans les cellules épithéliales de la glande mammaire, le TGF β diminue aussi l'expression de la protéine tyrosine

phosphatase CDC25, empêchant ainsi la déphosphorylation d'un site inhibiteur sur CDK4 et CDK6, maintenant ainsi les cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire [58].

Figure 2.

Le TGF β et la suppression tumorale



(1) Le TGF β entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, via l'induction des inhibiteurs de CDK p15^{INK4B} et p21^{CIP1}. p15^{INK4B} déloge p21^{CIP1} et p27^{KIP1} des complexes CDK4-cycline, leur permettant ainsi d'inactiver les complexes CDK2-cycline (flèches oranges). Le TGF β inhibe aussi l'expression de mitogènes, comme l'oncogène c-MYC et les facteurs de transcription ID. c-MYC active les voies inhibitrices dans une boucle de rétroaction positive (flèche orange).

(2) Le TGF β augmente l'expression du facteur de transcription E2F1, entraînant la formation d'un complexe E2F1-pRb-P/CAF qui active de nombreux gènes pro-apoptotiques dans différents types de cellules normales et cancéreuses. Dans les cellules hématopoïétiques, le TGF β stimule l'expression de la phosphatase SHIP qui inhibe la voie de survie Akt et entraîne la mort cellulaire. Le TGF β induit aussi l'apoptose par les protéines Daxx et DAPK dans les cellules hépatiques, le facteur de transcription TIEG1 dans les cellules pancréatiques et la protéine mitochondriale ARTS impliqué dans l'induction de l'apoptose via les mitochondries.

(3) Enfin, le TGF β inhibe l'immortalisation cellulaire dans les cellules normales et cancéreuses en bloquant l'expression de la télomérase (hTERT).



Induction de l'apoptose : Le TGF β stimule l'apoptose dans des types cellulaires variés par des mécanismes moléculaires encore mal connus [59-61]. Plusieurs protéines, comme la protéine Daxx [62], le facteur de transcription TIEG1 (TGF β -*Inducible Early-response Gene*) [63], la protéine pro-apoptotique DAPK (*Death-Associated Protein Kinase*) [64] et la protéine mitochondriale ARTS (*Apoptosis-Related protein in the TGF β Signaling pathway*) [65] ont été impliquées dans des contextes cellulaires spécifiques. Dans les cellules hématopoïétiques, nous avons mis en évidence un mécanisme important par lequel le TGF β et les activines régulent la mort cellulaire : le TGF β , via les protéines Smad, stimule l'expression de la phosphatase lipidique SHIP (*Src Homology 2 domain-containing 5' Inositol Phosphatase*) dans les lymphocytes [66]. Ceci induit une diminution des taux de second messenger PIP3 (Phosphatidyl Inositol triPhosphate), conduisant ainsi à l'inactivation des voies de survie cellulaire en réponse à la kinase Akt et entraînant la mort des cellules immunitaires. Dans ce dernier cas, ceci contribue donc aussi à l'immunosuppression et à la progression tumorale (voir section Va). Récemment, nous avons aussi mis en évidence un mécanisme central d'induction de la mort

cellulaire par le TGF β dans différents tissus [67]. Nos études ont montré que le TGF β augmente l'expression du facteur de transcription E2F1, entraînant la formation d'un complexe transcriptionnel actif E2F1-pRb-P/CAF sur les promoteurs de nombreux gènes pro-apoptotiques et induisant l'apoptose dans différents types de cellules normales et cancéreuses [67].

Inhibition de l'immortalisation cellulaire :

Dans les cellules normales, la sénescence puis la mort surviennent après un nombre de divisions cellulaires limitées, au cours desquelles les télomères raccourcissent progressivement. Les cellules cancéreuses ne subissent pas ce phénomène : elles sont immortalisées par la réactivation de l'activité d'une enzyme appelée télomérase. Cette enzyme est une reverse transcriptase, formée d'une composante ARN, hTER, et d'une composante protéique, hTERT, et ajoute des séquences répétitives d'ADN au bout des chromosomes limitant ainsi leur raccourcissement. Le TGF β inhibe l'expression de la protéine hTERT dans les cellules normales et cancéreuses^{32,57,58}. Les résultats de notre laboratoire indiquent que ces effets inhibiteurs du TGF β sur l'inhibition de l'expression de hTERT sont relayés via



Smad3, le facteur de transcription E2F1 et des activités histones déacétylases [38].

C'est donc par ces trois grandes voies de signalisation combinées (inhibition du cycle cellulaire, induction de l'apoptose et inhibition de l'immortalisation) que le TGF β agit comme un puissant suppresseur de tumeurs dans de nombreux tissus.

IV- Altérations des voies de signalisation du TGF β dans le cancer chez l'humain

Différentes altérations génétiques ou épigénétiques des molécules de la voie de signalisation du TGF β ou de molécules qui interagissent avec cette voie altèrent les fonctions de suppression de tumeurs et favorisent le développement tumoral. Les effets de suppression de tumeurs du TGF β sont certainement le mieux illustrés par la pléiade de mutations inactivantes identifiées dans les différents gènes impliqués dans la signalisation par le TGF β et fréquemment rencontrées dans les cancers chez l'humain (**Tableau 1**) [4, 6, 19].

Mutations dans les gènes codant les récepteurs du TGF β : Des mutations dans les deux allèles du T β RII donnant une protéine tronquée, ou à l'activité kinase inactivée, ont été identifiées dans de nombreux cancers, en particulier dans le cancer colorectal, ovarien et gastrique [68, 69]. Ces mutations sont beaucoup plus fréquentes dans les tumeurs à instabilité de microsatellites, due à des mutations dans les gènes de réparation des mésappariements. Le T β RI présente fréquemment des mutations de décalage du cadre de lecture ou non-sens, par exemple dans les cancers de l'ovaire et du sein. L'expression des récepteurs peut être diminuée par des altérations épigénétiques, comme l'hyperméthylation de leur promoteur ou l'altération de facteurs de transcription qui régulent leur expression [70]. L'expression du T β RII dans des cellules de cancer du sein freine l'apparition de tumeurs [71], alors que la mutation ou la surexpression d'un dominant négatif du T β RII inactive ses effets de suppression tumorale et augmente la tumorigénicité [72-74]. Une plus faible expression du T β RII est corrélée à des stades avancés [70]. Ces observations suggèrent que les récepteurs au TGF β agissent comme des suppresseurs de tumeur dans les stades précoces du développement tumoral.



Molécules	Cancers affectés
	Expression accrue : sein (68 %), poumon (48 %), pancréas (47 %), oesophage (37 %), estomac (23 %), colon, prostate.
	Mutations/délétions : colon (28 %), ovaire (25 %), tête et cou (21 %), estomac (15 %), sein (12 %), poumon, endomètre, foie, col de l'utérus, voies biliaires, gliomes.
	Mutations/délétions : ovaire (30 %), tête et cou (17 %), PH 53 %, vessie (PH 31 %), prostate (25 %), sein (6 %), voies biliaires.
	Mutations/délétions : colon (8 %), col de l'utérus (8 %), foie, poumon.
	Mutations/délétions : leucémie lymphoblastique de type T, estomac.
	Mutations/délétions : pancréas (50 %, PH 90 %, délétion 30 %), colon (PH 60 %), estomac (PH 60 %), poumon (PH 56 %), sein (12 %, PH 30 %), tête et cou (PH 40 %), prostate (PH 30 %), voies biliaires (16 %), col de l'utérus (4 %), vessie, oesophage, rein, foie, ovaire

Tableau 1. Les mutations des gènes de la voie de signalisation du TGFβ

Des gènes de la voie de signalisation sont fréquemment mutés ou délétés dans différents cancers chez l'humain. Les taux de mutations des différentes molécules de la voie de

signalisation sont indiqués entre parenthèses ainsi que le cancer associé. Les cas de pertes d'hétérozygotie (PH) associés au cancer sont aussi spécifiés.



Mutations dans les gènes codant les protéines Smad : Des mutations affectent très souvent le domaine carboxy-terminal des protéines Smad2 et Smad4 [75], altérant la formation de complexes et l'activation de la transcription [76]. La protéine Smad4, la plus affectée, est considérée comme un suppresseur de tumeur; son gène est notamment muté ou délété dans 50% des cancers pancréatiques où il a été initialement caractérisé, mais aussi dans un grand nombre d'autres types de cancers [77]. Le gène codant la protéine Smad2 est muté dans les cancers colorectaux, hépatiques et pulmonaires [69, 78], tandis que celui de Smad3 est perdu dans les cancers gastriques et certaines leucémies [79]. À l'inverse, les répresseurs transcriptionnels Ski et SnoN, qui ciblent et répriment l'expression des protéines Smad, sont souvent amplifiés dans ces cancers, mettant en évidence leur rôle d'oncogènes [80].

Mutations/altérations d'autres molécules de signalisation du TGF β : Des mutations de la protéine p53 altèrent la coopération entre les protéines p53 et Smad normalement requise pour les effets cytostatiques du TGF β dans des cellules de cancer du poumon et favorisent l'induction de la TEM, l'invasion cellulaire et la formation de métastases *in vivo* [81].

L'activation oncogénique de la voie Ras-RAF-MAPK induit la transition de la suppression tumorale par le TGF β vers l'induction de la progression tumorale de carcinome hépatocellulaire en favorisant la phosphorylation de la région linker de Smad3 qui empêche son activation par le T β RI [82]. Par ailleurs, des altérations épigénétiques peuvent aussi favoriser cette transition. Ainsi, l'hypométhylation du gène *PDGF β* (*Platelet-Derived Growth Factor β*) permet au TGF β de favoriser la prolifération de cellules de glioblastome [83]. La diminution d'expression de la protéine DAB2 (*Disabled homolog 2*) favorise la progression tumorale de cellules de cancer de la tête et du cou et de cellules squameuses vulvaires [84]. La surexpression de la protéine Six1 (*Sine oculis homeobox homolog 2*) dans des cellules de cancer du sein permet l'induction de la TEM par le TGF β favorisant ainsi le développement de métastases [85].

Ces altérations des gènes codant les protéines relayant les effets du TGF β affectent les fonctions de suppresseur de tumeur tout en favorisant l'apparition et le développement des métastases, expliquant ainsi le double rôle du TGF β .



V- Le TGF β est un agent pro-métastatique

Les effets de suppresseur de tumeurs du TGF β sont très souvent perdus au cours de la progression tumorale. Ainsi, dans ce contexte, d'autres réponses cellulaires indépendantes de l'inhibition de la croissance et favorisant la progression tumorale et le développement de métastases prévalent [6, 15, 86]. Les effets du TGF β dans le processus métastatique ont été le mieux caractérisés dans le cancer du sein, le cancer féminin le plus répandu en Amérique du Nord. En 2012 seulement, parmi les 1 638 910 nouveaux cas de cancer aux États-Unis et 177 800 au Canada, on estime à 229 060 et 23 600, respectivement, le nombre de nouveaux cas de cancer du (www.cancer.org, www.cancer.ca). Parmi les 577 190 morts dues au cancer aux États-Unis et 75 000 au Canada, on estime la mortalité due au cancer du sein à 39 920 et 5 200 morts aux États-Unis et au Canada, respectivement. Il existe différents types de classification pour les cancers du sein, qui dépendent de la taille de la tumeur, de la présence de cellules tumorales en dehors du site primaire (positivité dans les ganglions lymphatiques, apparition de métastases sur des sites distants), ainsi que de la rapidité à

laquelle les cellules cancéreuses se multiplient par rapport aux cellules normales (paramètre établi à partir de biopsies) [87]. Alors que les taux de rémission et de survie au-delà de 5 ans sont élevés dans les tumeurs primaires localisées, ils chutent fortement dans les tumeurs métastatiques, qui se sont propagées et établies sur des sites secondaires distants. Ces dernières, pour qui la croissance ne dépend pas des hormones ni de l'abondance des récepteurs HER2, sont donc souvent résistantes aux thérapies hormonales (tamoxifène et inhibiteurs d'activité aromatasase) ou ciblant HER2 (Trastuzumab ou Herceptin) et sont responsables de la plupart des décès dus au cancer du sein [88]. Le TGF β est un acteur prépondérant dans les processus d'invasion cellulaire et le développement métastatique des cellules du cancer du sein, et c'est dans ce contexte que des thérapies spécifiques, ciblant les effets pro-métastatiques du TGF β , paraissent attractives et prometteuses. Comme le montre la **Figure 3**, ces effets du TGF β sur la progression tumorale sont de deux types : a) sur les cellules avoisinantes de la tumeur et le stroma, b) sur les cellules cancéreuses elles-mêmes. En effet, les cellules tumorales synthétisent et sécrètent d'importantes quantités de TGF β [89] qui modifient le stroma et la MEC, stimulent



l'angiogenèse, la différenciation des myofibroblastes et entraînent une immunosuppression locale et systémique, contribuant à la progression tumorale. Dans les cellules cancéreuses, le TGF β inhibe l'adhésion cellulaire, induit la transition

épithélio-mésenchymateuse (TEM), stimule le potentiel migratoire et invasif des cellules et induit le chimiotactisme vers les organes distants, favorisant ainsi le développement de métastases.

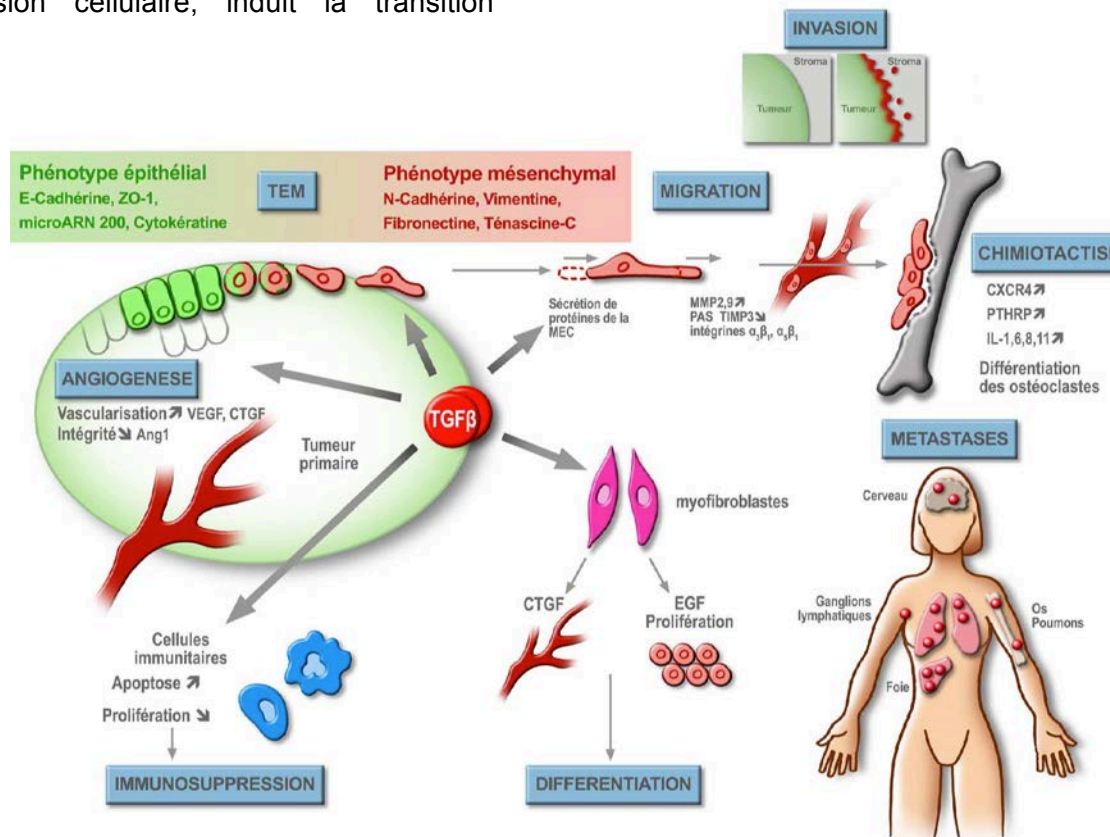


Figure 3. Les effets pro-métastatiques du TGF β

Les cellules tumorales sécrètent d'importantes quantités de TGF β qui stimulent l'angiogenèse tumorale en induisant l'expression des facteurs VEGF et CTGF et en inhibant l'expression de l'angiopoïétine-1. Le TGF β induit l'apoptose et une diminution de prolifération dans les lymphocytes B et T agissant ainsi comme immunosuppresseur. Le TGF β favorise la maturation des myofibroblastes qui sécrètent des facteurs prolifératifs et angiogéniques, favorisant ainsi la progression de la tumeur. Dans les cellules cancéreuses, le TGF β favorise

la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Le TGF β stimule le potentiel migratoire et invasif des cellules cancéreuses. Le TGF β favorise aussi la formation de métastases osseuses. La synthèse et sécrétion d'interleukines en réponse au TGF β favorise la prolifération des cellules tumorales et induit la différenciation des ostéoclastes et la résorption osseuse. Le TGF β est capable de promouvoir le développement des métastases vers les os, mais également vers les ganglions lymphatiques, les poumons, le foie et le cerveau



a- Les effets paracrines du TGF β créent un microenvironnement favorable au développement des métastases

L'immunosuppression: Le TGF β agit comme un agent anti-inflammatoire dans les tissus sains et dans les cancers de stade précoce, permettant une tolérance immunitaire [[90]]. En induisant l'apoptose dans les lymphocytes B et T, le TGF β agit aussi comme un puissant immunosuppresseur [91], empêchant l'infiltration des cellules immunitaires dans la tumeur et permettant ainsi à la tumeur de se soustraire à l'immunosurveillance de l'hôte [4, 92].

L'angiogenèse : L'angiogenèse permet l'apport de nutriments et d'oxygène aux cellules tumorales par le système vasculaire et leur donne également accès au système sanguin, favorisant l'émergence de métastases. Le TGF β est un puissant inducteur de l'angiogenèse [93] : l'augmentation de l'expression du TGF β est corrélée à une augmentation de densité de microvaisseaux et à un mauvais pronostic

dans différents types de cancer [[94, 95]]. Le TGF β induit l'expression des facteurs angiogéniques VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*) dans les cellules épithéliales et les fibroblastes [96, 97], alors qu'il inhibe l'expression de l'angiopoïétine-1 dans les fibroblastes, contribuant à la perméabilité des vaisseaux associés à la tumeur [98]. En outre, le recrutement de cellules endothéliales par la tumeur nécessite une dissolution de vaisseaux matures aux abords de la tumeur facilitée par l'augmentation de la sécrétion et l'activité de métalloprotéinases par le TGF β [99].

La génération de myofibroblastes : Les myofibroblastes, dont la maturation est favorisée par le TGF β sont des cellules mésenchymateuses avec des caractéristiques de fibroblastes et de cellules musculaires lisses [100]. Ils favorisent la progression tumorale grâce à la sécrétion de facteurs prolifératifs et angiogéniques.

Grâce à ces effets sur le microenvironnement tumoral, le TGF β favorise la croissance et le développement



de la tumeur, permettant aux cellules tumorales de progresser vers le stade métastatique. Ceci ne peut être permis que si les cellules tumorales acquièrent des caractéristiques leur permettant de se détacher de la tumeur primaire, d'envahir l'environnement péri-tumoral et de coloniser d'autres organes.

b- Le TGF β favorise la progression tumorale en agissant directement sur les cellules cancéreuses

Le TGF β produit par la tumeur agit sur les cellules tumorales elles-mêmes, en stimulant leurs propriétés migratoires et invasives ainsi qu'en régissant la TEM et le chimiotactisme vers les organes distants (**Figure 3**).

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) : Il s'agit d'une transdifférenciation de cellules épithéliales hautement organisées en réseaux en une population désorganisée et mobile de cellules mésenchymateuses, qui confère aux cellules cancéreuses des propriétés migratrices et invasives [101, 102]. La TEM a lieu naturellement au cours du développement des organismes

multicellulaires, où elle régit la morphogenèse dans différents territoires embryonnaires. Elle induit la dissolution des jonctions étanches entre les cellules épithéliales et le substrat ainsi que des jonctions adhérentes basolatérales, entraînant la perte de polarité des cellules épithéliales caractérisée, entre autres, par la perte d'E-cadhérine et la relocalisation de β -caténine dans le noyau où elle induit l'expression des protéines c-MYC, cycline D1 et MMP7. Le cytosquelette d'actine est aussi délocalisé des sites d'adhérence corticale et réorganisé en fibres de stress ancrées aux complexes d'adhésion focale qui contribuent à la formation de filopodes et à la migration cellulaire. La sécrétion accrue de protéases extracellulaires, couplée à une diminution des protéines de la MEC, contribue quant à elle à la digestion de la dite matrice et au phénotype invasif. Enfin, l'expression de marqueurs épithéliaux (E-cadhérine, ZO-1, occludine, claudine, cytokératines 8, 18 et 19, desmoplakine, etc.) est remplacée par celle de marqueurs mésenchymateux (vimentine, N-cadhérine, fibronectine, ténascine-C, vitronectine, etc.). Cette régulation génétique de la TEM est sous le contrôle de facteurs de transcription en doigts de zinc Snail et Slug, le facteur à motif boucle-hélice-boucle basique *Twist*,



les protéines à homéodomaine ZEB-1 et ZEB-2 et le facteur *forkhead* FoxC3 [4], qui sont tous régulés par le TGF β [103]. En induisant la TEM, le TGF β confère aux cellules tumorales un phénotype mésenchymateux leur permettant de modifier les communications intercellulaires et leurs propriétés migratoires et invasives.

L'adhésion cellulaire : La TEM induite par le TGF β entraîne des changements dans l'expression des molécules d'adhésion diminuant profondément l'adhésion entre cellules, et, entre les cellules et le substrat. Les cellules cancéreuses sont alors dissociées de la tumeur primaire et peuvent ainsi se disséminer. Par exemple, dans la peau, les mélanocytes sont sous le contrôle étroit des kératinocytes par l'intermédiaire, entre autres, de la E-cadhérine dont l'expression est diminuée par le TGF β [104]. Dans les mélanomes, la TEM altère cette communication et le contrôle de la croissance des mélanocytes par les kératinocytes est perdu. La TEM permet alors aux cellules de mélanomes d'adhérer et de communiquer avec les fibroblastes du stroma et les cellules endothéliales, et favorise ainsi leur dissémination dans le derme. Dans les ostéosarcomes, le TGF β diminue l'adhésion entre les cellules et le

substrat laminine en diminuant l'expression de son récepteur, l'intégrine $\alpha_3\beta_1$, sans modifier l'expression des récepteurs du collagène et de la fibronectine, les intégrines $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_5\beta_1$, respectivement [105]. Le changement d'expression du répertoire d'intégrines par le TGF β permet au TGF β de modifier profondément l'adhésion des cellules.

La migration cellulaire : Il est généralement admis que la TEM a lieu avant que les caractéristiques migratoires et invasives ne soient acquises [106]. La surexpression d'un dominant négatif du T β RII empêche l'induction de la TEM par le TGF β et la migration cellulaire, alors que la surexpression du T β RI constitutivement activé restaure la motilité cellulaire [20]. Tandis que l'induction de la TEM par le TGF β est souvent associée à l'induction du potentiel migratoire, ces deux phénomènes peuvent être dissociés : des tumeurs co-exprimant du TGF β recombinant et un dominant négatif du T β RII ne subissent pas la TEM et forment pourtant des métastases plus agressives que les tumeurs n'exprimant que le TGF β recombinant [106]. Par ailleurs, avant de se déplacer, les cellules produisent des lamellipodes à l'avant, tout en rétractant la partie arrière ; ces étapes sont



coordonnées par la famille des RhoGTPases qui sont activées par le TGF β [107]. Par un mécanisme dépendant des protéines Smad, le TGF β induit également l'expression du microARN miR-181 [108] qui, selon nos observations, joue un rôle dans l'induction de la migration par le TGF β et l'activine A dans un modèle de cancer du sein [109].

L'invasion cellulaire : En plus de stimuler le potentiel migratoire des cellules tumorales, le TGF β régule également leur capacité à remodeler la MEC en augmentant l'expression de métalloprotéinases [110] et la génération de plasmine, qui augmentent la biodisponibilité du TGF β stocké dans la MEC. En parallèle, les niveaux accrus de TGF β stimulent la synthèse de protéines de la MEC à l'arrière des cellules invasives. Ces phénomènes permettant aux cellules cancéreuses de traverser la barrière de la MEC menant à des sites secondaires métastatiques. Le microARN miR-181, induit par le TGF β , cible l'inhibiteur de métalloprotéinases TIMP3 et augmente les propriétés invasives des cellules [111]. Lors d'une étude récente de notre laboratoire, nous avons pu mettre en évidence un mécanisme important par lequel le TGF β induit la migration et

l'invasion cellulaires [[112]] : nous avons identifié l'inhibiteur de CDK p21^{KIP1} comme un élément régulateur central des voies de signalisation TGF β amenant à l'invasion des cellules de cancer du sein *in vitro* et *in vivo*. En effet, nos résultats indiquent qu'en réponse au TGF β , p21^{KIP1} permet le recrutement du régulateur transcriptionnel P/CAF, induisant l'acétylation des protéines Smads et leur liaison à l'ADN, activant ainsi la transcription de multiples gènes cibles pro-métastatiques. En outre, nos travaux montrent qu'une forte expression de p21^{KIP1} est corrélée avec un faible pronostic de survie ainsi qu'avec un risque accru d'apparition de métastases distantes [112].

La contribution aux métastases et la chimioattraction : Comme indiqué sur la **Figure 3**, les cellules tumorales qui ont envahi la matrice pénètrent dans le système sanguin par un mécanisme appelé, intravasation. Les cellules vont se disséminer, en utilisant le flot sanguin pour ensuite éventuellement ressortir des vaisseaux (extravasation) et venir former de nouvelles colonies tumorales dans un microenvironnement distant et propice à la colonisation. Ces étapes sont également régulées par le TGF β , qui favorise la croissance des tumeurs secondaires [4] et détermine également leur spécificité



tissulaire [113-116]. Par exemple, l'association du ligand SDF-1 (*Stroma-Derived Factor-1*) exprimé par les cellules osseuses à son récepteur CXCR4 (*C-X-C Chemokine Receptor type 4*), dont l'expression par les cellules tumorales est induite par le TGF β [117], permet une chimiotaxie des cellules tumorales du sein vers les os [4, 118]. De plus, le TGF β sécrété par les cellules cancéreuses recrutées, induit une forte expression des interleukines IL-1 et IL-6 [119, 120], favorisant ainsi la différenciation de cellules progénitrices en ostéoclastes [121], qui sont les principaux acteurs dans la résorption minérale entraînant des lésions osseuses. Le TGF β stimule aussi la sécrétion de l'IL-11 et de la protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP) par les cellules cancéreuses augmentant ainsi l'expression de RANKL (*Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand*) à la surface des ostéoblastes. Cette augmentation d'expression de RANKL déclenche la différenciation des cellules progénitrices en ostéoclastes, entraînant alors une déminéralisation osseuse [122, 123]. En plus de favoriser les lésions osseuses, le TGF β facilite l'extravasation du système sanguin vers le parenchyme des poumons

[114] et induit l'expression des gènes de la cyclooxygénase-2 (COX2), du récepteur à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) et de l'angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) qui contribuent au développement des métastases pulmonaires [124]. Certains gènes comme COX2 et EGFR ont depuis été associés au processus métastatique vers le cerveau [125]. L'expression du gène de l' α 2,6-sialyltransférase (ST6GALNAC5), normalement limitée au cerveau, confère aux cellules du cancer du sein une adhérence accrue à l'endothélium cérébral tandis qu'ANGPTL4 affecte les jonctions endothéliales [125].

VI- Opportunités thérapeutiques

Les effets pro-métastatiques du TGF β en font une cible thérapeutique intéressante, puisque bloquer ses voies de signalisation interfère avec des mécanismes essentiels au processus métastatique. Comme la production de TGF β est augmentée dans de nombreux types de cancer et est corrélée avec le stade tumoral [[89, 126]], de nombreux types d'inhibiteurs ciblant la voie de signalisation de TGF β à différents niveaux sont en cours de développement (**Figure 4**) [89, 126-131].

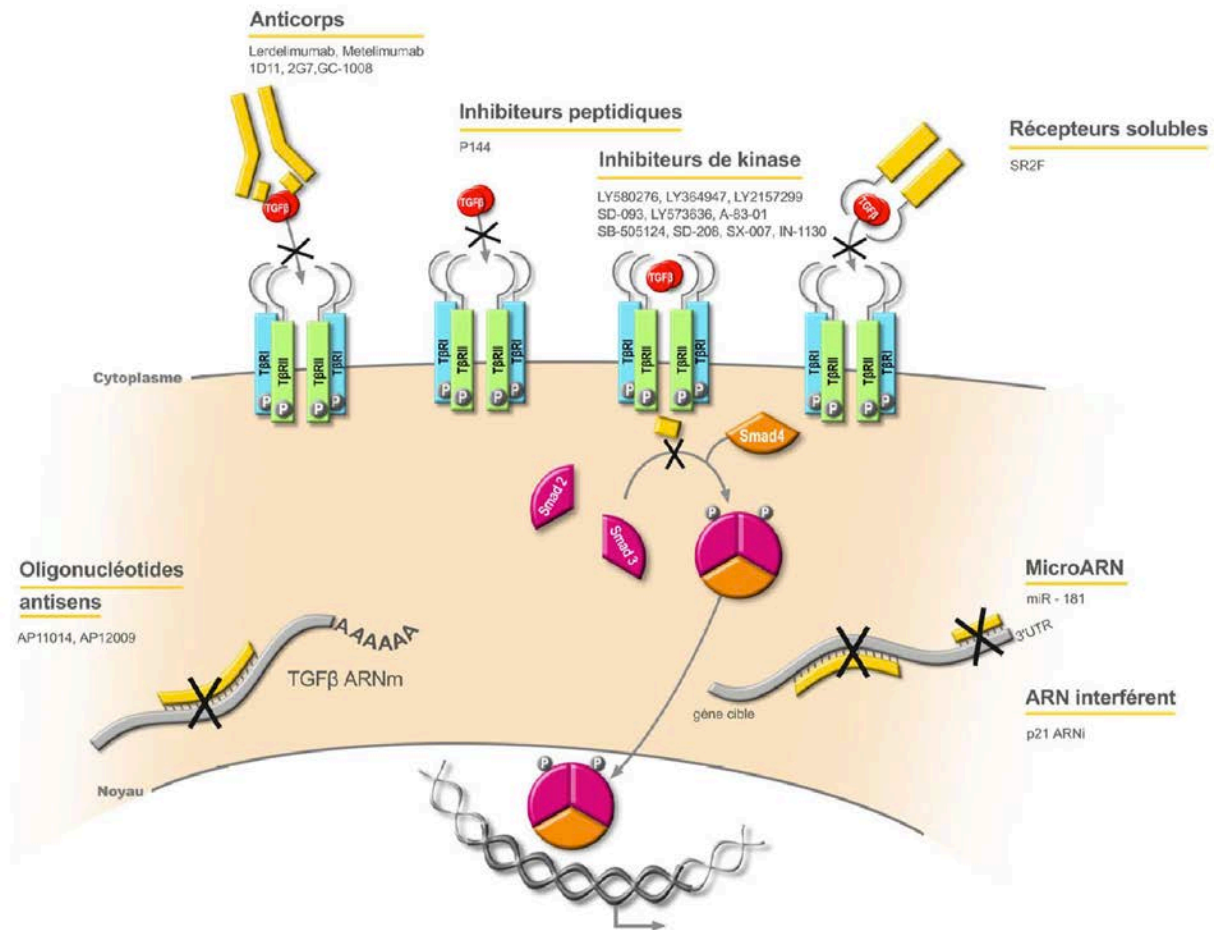


Figure 4. Les inhibiteurs de la voie de signalisation du TGFβ

Les effets pro-métastatiques du TGF β en font une cible thérapeutique intéressante. À cette fin, différentes stratégies sont en cours de développement : les anticorps bloquants et les récepteurs solubles se lient au ligand et empêchent sa liaison au T β RII, les inhibiteurs peptidiques agissent comme des inhibiteurs compétitifs au niveau de la liaison du ligand au récepteur, les inhibiteurs de kinases bloquent l'activité kinase induite par la fixation du ligand

au récepteur et empêchent la transduction du signal aux protéines cytosoliques. D'autres inhibiteurs intracellulaires sont également en voie de développement comme l'oligonucléotide antisens ciblant l'ARNm du TGF β ligand qui empêche la synthèse du ligand, des ARNi ciblant des ARNm de la réponse transcriptionnelle du TGF β ou des miARN en aval de la voie de signalisation du TGF β



Cependant, les thérapies développées manquent parfois de spécificité vis-à-vis des cellules cancéreuses et présentent de nombreux effets secondaires. Les recherches visant à bloquer spécifiquement les activités pro-tumorales du TGF β sans affecter les effets de suppression tumorale semblent plus prometteuses. Par exemple, les ARN interférents constituent une approche intéressante puisqu'ils permettraient de cibler spécifiquement des molécules de la voie de signalisation du TGF β . Ainsi, notre laboratoire a montré que bloquer l'expression de p21^{CIP1} par un ARN interférent réduit de manière importante l'invasion locale de cellules de cancer du sein, sans affecter les effets de suppresseur de tumeurs du TGF β [132]. Par ailleurs, le développement de telles thérapies devra être ciblé et spécifiquement adapté à des tissus et des types de cancer particuliers. En effet, les activités régulatrices du TGF β dans le développement des métastases, particulièrement bien caractérisées dans le cancer du sein, sont beaucoup moins bien définies dans d'autres types de cancer, voire différentes, comme dans les mélanomes. Les mélanomes sont la cause principale de mortalité due au cancer chez les jeunes entre 25 et 30 ans [133]. Alors que certaines études suggèrent que le

TGF β favoriserait le potentiel métastatique des cellules de mélanomes [46, 134], d'autres observations, ainsi que des études récentes de notre laboratoire, indiquent que le TGF β inhiberait leurs capacités invasives [135]. Dans ce contexte particulier, des stratégies visant à reproduire les effets du TGF β pourraient être alors envisagées. Par ailleurs, de nouvelles techniques plus efficaces et spécifiques d'administration de médicaments qui pourraient être utilisées dans les thérapies ciblant les voies du TGF β doivent être développées pour une meilleure efficacité. À cet égard, nous avons récemment mis au point une nouvelle méthode ultrasensible et spécifique d'introduction d'un gène étranger dans des cellules cancéreuses en couplant l'utilisation d'un laser femtoseconde à des nanoparticules d'or [136, 137]. Cette technique présente un intérêt particulier dû à son efficacité de transfection bien supérieure aux techniques actuellement employées, ainsi qu'à sa spécificité potentielle vis-à-vis des cellules cancéreuses [136].

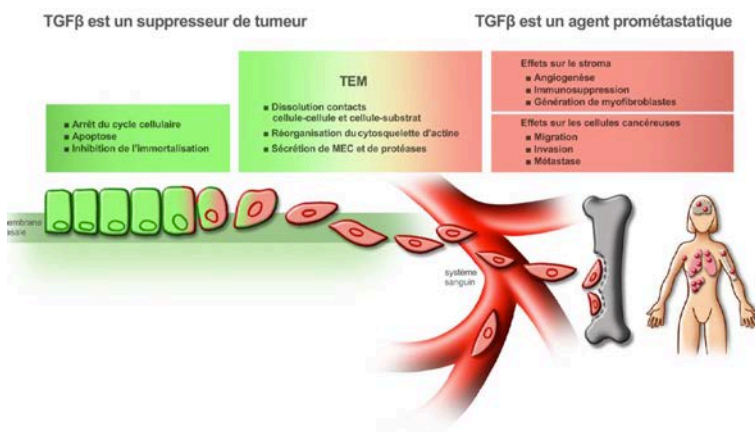


VII- Conclusion

Le TGF β est un acteur majeur dans la formation et la progression des cancers chez l'humain. Agissant comme un suppresseur de tumeur dans les cellules normales et les carcinomes précoces, le TGF β est capable d'induire la progression métastatique des cellules tumorales dans les stades plus avancés et invasifs de cancers (**Figure 5**). Ces effets pro-tumoraux du TGF β en font donc une cible préférentielle pour le développement de nouvelles thérapies spécifiques contre les cancers métastatiques. Bien qu'il existe actuellement plusieurs inhibiteurs en phase

d'essais cliniques, il est encore difficile de prédire ou de déterminer si ces stratégies seront efficaces à long terme, et si elles seront capables de spécifiquement bloquer les effets pro-métastatiques du TGF β sans en affecter les effets de suppresseur de tumeur. Sachant que les mécanismes intracellulaires et les voies de signalisation spécifiques des effets pro-métastatiques du TGF β restent encore mal définis, des recherches approfondies ayant pour but de mieux caractériser le détail des voies de signalisation TGF β au niveau moléculaire seront nécessaires pour permettre le développement d'outils thérapeutiques plus spécifiques.

Figure 5. L'apparent paradoxe du TGF β



Le TGF β agit comme un suppresseur de tumeur en entraînant l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et l'inhibition de l'immortalisation dans les cellules normales et les carcinomes précoces. Les effets suppresseurs de tumeur du TGF β sont perdus, favorisant la progression tumorale. Le TGF β induit alors la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Les effets pro-métastatiques du TGF β sont dus à ses actions sur le stroma et sur les cellules cancéreuses. Le TGF β favorise les métastases des cellules cancéreuses vers de nombreux sites secondaires.



Références

1. Todaro, G.J. and J.E. De Larco, *Growth factors produced by sarcoma virus-transformed cells*. Cancer Res, 1978. **38**(11 Pt 2): p. 4147-54.
2. de Larco, J.E. and G.J. Todaro, *Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(8): p. 4001-5.
3. Roberts, A.B., et al., *Purification and properties of a type beta transforming growth factor from bovine kidney*. Biochemistry, 1983. **22**(25): p. 5692-8.
4. Massague, J., *TGFbeta in Cancer*. Cell, 2008. **134**(2): p. 215-30.
5. Massague, J., *TGF-beta signal transduction*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 753-91.
6. Derynck, R., R.J. Akhurst, and A. Balmain, *TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression*. Nat Genet, 2001. **29**(2): p. 117-29.
7. Chin, D., et al., *What is transforming growth factor-beta (TGF-beta)?* Br J Plast Surg, 2004. **57**(3): p. 215-21.
8. Miyazono, K., H. Ichijo, and C.H. Heldin, *Transforming growth factor-beta: latent forms, binding proteins and receptors*. Growth Factors, 1993. **8**(1): p. 11-22.
9. Koli, K., et al., *Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta*. Microsc Res Tech, 2001. **52**(4): p. 354-62.
10. Khalil, N., *TGF-beta: from latent to active*. Microbes Infect, 1999. **1**(15): p. 1255-63.
11. Massague, J., et al., *Affinity labeling of a transforming growth factor receptor that does not interact with epidermal growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(22): p. 6822-6.
12. Massague, J. and B. Like, *Cellular receptors for type beta transforming growth factor. Ligand binding and affinity labeling in human and rodent cell lines*. J Biol Chem, 1985. **260**(5): p. 2636-45.
13. Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. Cell, 2003. **113**(6): p. 685-700.
14. Massague, J., *The transforming growth factor-beta family*. Annu Rev Cell Biol, 1990. **6**: p. 597-641.
15. Wakefield, L.M. and A.B. Roberts, *TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(1): p. 22-9.
16. Xu, J., S. Lamouille, and R. Derynck, *TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition*. Cell Res, 2009. **19**(2): p. 156-72.
17. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
18. Yingling, J.M., K.L. Blanchard, and J.S. Sawyer, *Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(12): p. 1011-22.
19. Siegel, P.M. and J. Massague, *Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(11): p. 807-21.
20. Dumont, N. and C.L. Arteaga, *Targeting the TGF beta signaling network in human neoplasia*. Cancer Cell, 2003. **3**(6): p. 531-6.
21. Lebrun, J.J., Y. Chen, and W.W. Vale, *Inhibin, activin and follistatin: Regulatory functions in system and cell biology*, T. Aono, Sugino, H., and Vale, W. W., Editor 1997: New York.
22. Lebrun, J.J., *Activin, TGF-beta and menin in pituitary tumorigenesis*. Adv Exp Med Biol, 2009. **668**: p. 69-78.
23. Jayaraman, L. and J. Massague, *Distinct oligomeric states of SMAD proteins in the transforming growth factor-beta pathway*. J Biol Chem, 2000. **275**(52): p. 40710-7.
24. Chacko, B.M., et al., *The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(3): p. 248-53.
25. Chacko, B.M., et al., *Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-beta signaling*. Mol Cell, 2004. **15**(5): p. 813-23.
26. Lebrun, J.J., et al., *Roles of pathway-specific and inhibitory Smads in activin receptor signaling*. Mol Endocrinol, 1999. **13**(1): p. 15-23.
27. Shi, Y., et al., *Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling*. Cell, 1998. **94**(5): p. 585-94.
28. Massague, J. and D. Wotton, *Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system*. Embo J, 2000. **19**(8): p. 1745-54.



29. Chen, X., et al., *Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor*. Nature, 1997. **389**(6646): p. 85-9.
30. Hata, A., et al., *OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP- Smad and Olf signaling pathways*. Cell, 2000. **100**(2): p. 229-40.
31. Kang, M., et al., *Positive regulation of additional sex comb-like 1 gene expression by the pluripotency factor SOX2*. Biochem Biophys Res Commun, 2012.
32. Davies, M., et al., *Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF-beta1 involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways*. J Cell Biochem, 2005. **95**(5): p. 918-31.
33. Lee, M.K., et al., *TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA*. The EMBO journal, 2007. **26**(17): p. 3957-67.
34. Yan, Z., S. Winawer, and E. Friedman, *Two different signal transduction pathways can be activated by transforming growth factor beta 1 in epithelial cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(18): p. 13231-7.
35. Bakin, A.V., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 15): p. 3193-206.
36. Hanafusa, H., et al., *Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression*. J Biol Chem, 1999. **274**(38): p. 27161-7.
37. Cocolakis, E., et al., *The p38 MAPK pathway is required for cell growth inhibition of human breast cancer cells in response to activin*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 18430-6.
38. Lacerte, A., et al., *Transforming growth factor-beta inhibits telomerase through SMAD3 and E2F transcription factors*. Cell Signal, 2008. **20**(1): p. 50-9.
39. de Guise, C., et al., *Activin inhibits the human Pit-1 gene promoter through the p38 kinase pathway in a Smad-independent manner*. Endocrinology, 2006. **147**(9): p. 4351-62.
40. Guo, J., et al., *TGFbeta-induced GRK2 expression attenuates AngII-regulated vascular smooth muscle cell proliferation and migration*. Cell Signal, 2009. **21**(6): p. 899-905.
41. Edlund, S., et al., *Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(3): p. 902-14.
42. Bhowmick, N.A., et al., *Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(1): p. 27-36.
43. Chen, R.H., et al., *Suppression of transforming growth factor-beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway*. Oncogene, 1998. **17**(15): p. 1959-68.
44. Peron, P., et al., *Potentiation of Smad transactivation by Jun proteins during a combined treatment with epidermal growth factor and transforming growth factor-beta in rat hepatocytes. role of phosphatidylinositol 3-kinase-induced AP-1 activation*. J Biol Chem, 2001. **276**(13): p. 10524-31.
45. Lamouille, S. and R. Derynck, *Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway*. J Cell Biol, 2007. **178**(3): p. 437-51.
46. Javelaud, D., et al., *Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells impairs bone metastasis*. Cancer Res, 2007. **67**(5): p. 2317-24.
47. Halder, S.K., et al., *Smad7 induces hepatic metastasis in colorectal cancer*. Br J Cancer, 2008. **99**(6): p. 957-65.
48. Theohari, I., et al., *Differential effect of the expression of TGF-beta pathway inhibitors, Smad-7 and Ski, on invasive breast carcinomas: relation to biologic behavior*. APMIS, 2012. **120**(2): p. 92-100.
49. Moses, H.L., E.Y. Yang, and J.A. Pietsenpol, *TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights*. Cell, 1990. **63**(2): p. 245-7.
50. Li, J.M., et al., *Transforming growth factor beta activates the promoter of cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4B through an Sp1 consensus site*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26750-3.
51. Datto, M.B., et al., *Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent*



- mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5545-9.
52. Reynisdottir, I., et al., *Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta*. Genes Dev, 1995. **9**(15): p. 1831-45.
53. Coffey, R.J., Jr., et al., *Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor beta*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(8): p. 3088-93.
54. Ho, J., et al., *The G protein-coupled receptor kinase-2 is a TGFbeta-inducible antagonist of TGFbeta signal transduction*. EMBO J, 2005. **24**(18): p. 3247-58.
55. Kang, Y., C.R. Chen, and J. Massague, *A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells*. Mol Cell, 2003. **11**(4): p. 915-26.
56. Norton, J.D., *ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis*. J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 22): p. 3897-905.
57. Lasorella, A., et al., *Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins*. Nature, 2000. **407**(6804): p. 592-8.
58. Iavarone, A. and J. Massague, *Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15*. Nature, 1997. **387**(6631): p. 417-22.
59. Rotello, R.J., et al., *Coordinated regulation of apoptosis and cell proliferation by transforming growth factor beta 1 in cultured uterine epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 3412-5.
60. Oberhammer, F.A., et al., *Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5408-12.
61. Chaouchi, N., et al., *Characterization of transforming growth factor-beta 1 induced apoptosis in normal human B cells and lymphoma B cell lines*. Oncogene, 1995. **11**(8): p. 1615-22.
62. Perlman, R., et al., *TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(8): p. 708-14.
63. Tachibana, I., et al., *Overexpression of the TGFbeta-regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells*. J Clin Invest, 1997. **99**(10): p. 2365-74.
64. Jang, C.W., et al., *TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(1): p. 51-8.
65. Larisch, S., et al., *A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(12): p. 915-21.
66. Valderrama-Carvajal, H., et al., *Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(12): p. 963-9.
67. Korah, J.F., N. Lacerte, A. Lebrun, JJ., *A transcriptionally active pRb-E2F1-P/CAF signaling pathway is central to TGFbeta-mediated apoptosis*. Oncogene, 2012. **in review**.
68. Levy, L. and C.S. Hill, *Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2006. **17**(1-2): p. 41-58.
69. Blobel, G.C., W.P. Schiemann, and H.F. Lodish, *Role of transforming growth factor beta in human disease*. N Engl J Med, 2000. **342**(18): p. 1350-8.
70. Kim, S.J., et al., *Molecular mechanisms of inactivation of TGF-beta receptors during carcinogenesis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2000. **11**(1-2): p. 159-68.
71. Sun, L., et al., *Expression of transforming growth factor beta type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(42): p. 26449-55.
72. Wang, J., et al., *Demonstration that mutation of the type II transforming growth factor beta receptor inactivates its tumor suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(37): p. 22044-9.
73. Go, C., P. Li, and X.J. Wang, *Blocking transforming growth factor beta signaling in transgenic epidermis accelerates chemical carcinogenesis: a mechanism associated with increased angiogenesis*. Cancer Res, 1999. **59**(12): p. 2861-8.



74. Bottinger, E.P., et al., *Transgenic mice overexpressing a dominant-negative mutant type II transforming growth factor beta receptor show enhanced tumorigenesis in the mammary gland and lung in response to the carcinogen 7,12-dimethylbenz-[a]-anthracene*. *Cancer Res*, 1997. **57**(24): p. 5564-70.
75. Maliekal, T.T., et al., *Loss of expression, and mutations of Smad 2 and Smad 4 in human cervical cancer*. *Oncogene*, 2003. **22**(31): p. 4889-97.
76. Hata, A., Y. Shi, and J. Massague, *TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads*. *Mol Med Today*, 1998. **4**(6): p. 257-62.
77. Hahn, S.A., et al., *DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1*. *Science*, 1996. **271**(5247): p. 350-3.
78. Sjoblom, T., et al., *The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers*. *Science*, 2006. **314**(5797): p. 268-74.
79. Wolfrain, L.A., et al., *Loss of Smad3 in acute T-cell lymphoblastic leukemia*. *The New England journal of medicine*, 2004. **351**(6): p. 552-9.
80. Zhu, Q., et al., *Dual role of SnoN in mammalian tumorigenesis*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(1): p. 324-39.
81. Adorno, M., et al., *A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis*. *Cell*, 2009. **137**(1): p. 87-98.
82. Nagata, H., et al., *Inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase switches Smad3 signaling from oncogenesis to tumor-suppression in rat hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 2009. **49**(6): p. 1944-53.
83. Bruna, A., et al., *High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene*. *Cancer Cell*, 2007. **11**(2): p. 147-60.
84. Hannigan, A., et al., *Epigenetic downregulation of human disabled homolog 2 switches TGF-beta from a tumor suppressor to a tumor promoter*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(8): p. 2842-57.
85. Micalizzi, D.S., et al., *The Six1 homeoprotein induces human mammary carcinoma cells to undergo epithelial-mesenchymal transition and metastasis in mice through increasing TGF-beta signaling*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(9): p. 2678-90.
86. Akhurst, R.J. and R. Derynck, *TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword*. *Trends Cell Biol*, 2001. **11**(11): p. S44-51.
87. Edge, S.B., DR. Compton CC. et al., *AJCC Staging Manual, 7th ed.*, ed. S.B. Edge, DR. Compton CC. et al. 2009, Philadelphia: Springer.
88. Arslan, C., K. Altundag, and O. Dizdar, *Emerging drugs in metastatic breast cancer: an update*. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2011. **16**(4): p. 647-67.
89. Derynck, R., et al., *Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors*. *Cancer Res*, 1987. **47**(3): p. 707-12.
90. Kulkarni, A.B., et al., *Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(2): p. 770-4.
91. Valderrama-Carvajal, H., et al., *Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP*. *Nature cell biology*, 2002. **4**(12): p. 963-9.
92. Ananiev, J., et al., *Relation between transforming growth factor-beta1 expression, its receptor and clinicopathological factors and survival in HER2-negative gastric cancers*. *Wien Klin Wochenschr*, 2011. **123**(21-22): p. 668-73.
93. Roberts, A.B., et al., *Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(12): p. 4167-71.
94. de Jong, J.S., et al., *Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II: Correlations with proliferation and angiogenesis*. *J Pathol*, 1998. **184**(1): p. 53-7.
95. Hasegawa, Y., et al., *Transforming growth factor-beta1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma*. *Cancer*, 2001. **91**(5): p. 964-71.
96. Pertovaara, L., et al., *Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic*



- and epithelial cells. *J Biol Chem*, 1994. **269**(9): p. 6271-4.
97. Shimo, T., et al., *Involvement of CTGF, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product, in tumor angiogenesis*. *Oncology*, 2001. **61**(4): p. 315-22.
98. Enholm, B., et al., *Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia*. *Oncogene*, 1997. **14**(20): p. 2475-83.
99. Hagedorn, H.G., B.E. Bachmeier, and A.G. Nerlich, *Synthesis and degradation of basement membranes and extracellular matrix and their regulation by TGF-beta in invasive carcinomas (Review)*. *Int J Oncol*, 2001. **18**(4): p. 669-81.
100. De Wever, O. and M. Mareel, *Role of tissue stroma in cancer cell invasion*. *J Pathol*, 2003. **200**(4): p. 429-47.
101. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies*. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. **15**(6): p. 740-6.
102. Derynck, R. and R.J. Akhurst, *Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(9): p. 1000-4.
103. Thuault, S., et al., *Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition*. *J Cell Biol*, 2006. **174**(2): p. 175-83.
104. Mikesch, L.M., et al., *Evaluation of molecular markers of mesenchymal phenotype in melanoma*. *Melanoma Res*, 2010. **20**(6): p. 485-95.
105. Heino, J., et al., *Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(1): p. 380-8.
106. Han, G., et al., *Distinct mechanisms of TGF-beta1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(7): p. 1714-23.
107. Tsapara, A., et al., *The RhoA activator GEF-H1/Lfc is a transforming growth factor-beta target gene and effector that regulates alpha-smooth muscle actin expression and cell migration*. *Mol Biol Cell*, 2010. **21**(6): p. 860-70.
108. Wang, Y., et al., *Transforming growth factor-beta regulates the sphere-initiating stem cell-like feature in breast cancer through miRNA-181 and ATM*. *Oncogene*, 2011. **30**(12): p. 1470-80.
109. Neel, J.C. and J.J. Lebrun, *Role of miR-181 in TGF-beta and Activin A-mediated cell migration*. In preparation, 2012.
110. Wiercinska, E., et al., *The TGF-beta/Smad pathway induces breast cancer cell invasion through the up-regulation of matrix metalloproteinase 2 and 9 in a spheroid invasion model system*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. **128**(3): p. 657-66.
111. Wang, B., et al., *TGFbeta-mediated upregulation of hepatic miR-181b promotes hepatocarcinogenesis by targeting TIMP3*. *Oncogene*, 2010. **29**(12): p. 1787-97.
112. Dai, M., et al., *A novel function for p21Cip1 and the transcriptional regulator P/CAF as critical regulators of TGFβ mediated breast cancer cell migration and invasion*. *Cell Res*, 2012. **in review**.
113. Kingsley, L.A., et al., *Molecular biology of bone metastasis*. *Mol Cancer Ther*, 2007. **6**(10): p. 2609-17.
114. Siegel, P.M., et al., *Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(14): p. 8430-5.
115. Yin, J.J., et al., *TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(2): p. 197-206.
116. Kominsky, S.L., et al., *TGF-beta promotes the establishment of renal cell carcinoma bone metastasis*. *J Bone Miner Res*, 2007. **22**(1): p. 37-44.
117. Bertran, E., et al., *Role of CXCR4/SDF-1 alpha in the migratory phenotype of hepatoma cells that have undergone epithelial-mesenchymal transition in response to the transforming growth factor-beta*. *Cell Signal*, 2009. **21**(11): p. 1595-606.
118. Wang, J., R. Loberg, and R.S. Taichman, *The pivotal role of CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis in bone metastasis*. *Cancer Metastasis Rev*, 2006. **25**(4): p. 573-87.
119. Franchimont, N., S. Rydziel, and E. Canalis, *Transforming growth factor-beta increases interleukin-6 transcripts in osteoblasts*. *Bone*, 2000. **26**(3): p. 249-53.



120. Wahl, S.M., et al., *Transforming growth factor-beta mediates IL-1-dependent induction of IL-1 receptor antagonist*. J Immunol, 1993. **150**(8 Pt 1): p. 3553-60.
121. Kwan Tat, S., et al., *IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(1): p. 49-60.
122. Suarez-Cuervo, C., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces interleukin-6 production via extracellular-regulated kinase 1 activation in breast cancer cells*. Breast Cancer Res Treat, 2003. **80**(1): p. 71-8.
123. Padua, D. and J. Massague, *Roles of TGFbeta in metastasis*. Cell Res, 2009. **19**(1): p. 89-102.
124. Padua, D., et al., *TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4*. Cell, 2008. **133**(1): p. 66-77.
125. Bos, P.D., et al., *Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain*. Nature, 2009. **459**(7249): p. 1005-9.
126. Dickson, R.B., et al., *Activation of growth factor secretion in tumorigenic states of breast cancer induced by 17 beta-estradiol or v-Ha-ras oncogene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(3): p. 837-41.
127. Grutter, C., et al., *A cytokine-neutralizing antibody as a structural mimetic of 2 receptor interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(51): p. 20251-6.
128. Benigni, A., et al., *Add-on anti-TGF-beta antibody to ACE inhibitor arrests progressive diabetic nephropathy in the rat*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(7): p. 1816-24.
129. Ananth, S., et al., *Transforming growth factor beta1 is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor and a critical growth factor for clear cell renal carcinoma*. Cancer Res, 1999. **59**(9): p. 2210-6.
130. Morris, J.C., *Phase I/II study of GC1008: A human anti-transforming growth factor-beta (TGFβ) monoclonal antibody (MAb) in patients with advanced malignant melanoma (MM) or renal cell carcinoma (RCC)* ASCO Annual Meeting J Clin Oncol, 2008. **26**: p. 9028.
131. Humbert, L., J.C. Neel, and J.J. Lebrun, *Targeting TGF-beta signaling in human cancer therapy*. Trends in Cell Mol Biol, 2010. **5**: p. 69-107.
132. Dai, M., et al., *p21 and p/CAF regulate TGFβ-induced cell migration and invasion in breast cancer*. Mol Cell Biol, 2012. **in revision**.
133. Houghton, A.N. and D. Polsky, *Focus on melanoma*. Cancer Cell, 2002. **2**(4): p. 275-8.
134. Javelaud, D., et al., *Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells inhibits their tumorigenicity in vitro and in vivo*. Oncogene, 2005. **24**(51): p. 7624-9.
135. Ramont, L., et al., *Transforming growth factor-beta1 inhibits tumor growth in a mouse melanoma model by down-regulating the plasminogen activation system*. Exp Cell Res, 2003. **291**(1): p. 1-10.
136. Baumgart, J., et al., *Off-resonance plasmonic enhanced femtosecond laser optoporation and transfection of cancer cells*. Biomaterials, 2012. **33**(7): p. 2345-2350.
137. Humbert, L.L., J.J., *TGF-beta inhibits human cutaneous melanoma cell migration and invasion through regulation of the plasminogen activator system*. J Biol Chem, 2012. **in review**.



La médecine personnalisée:

le rein d'abord et avant tout

Personalized medicine: the kidney first on the list

Gérard Eugène Plante

Département de Médecine (Néphrologie), Physiologie, Pharmacologie et Institut Universitaire de Gériatrie de Sherbrooke, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada J1H 5N4

Adresse de correspondance:

Dr Gérard Eugène Plante,

Professeur

Département de médecine (néphrologie), physiologie, pharmacologie et Institut
Sherbrooke

Faculté de médecine et des sciences de la santé

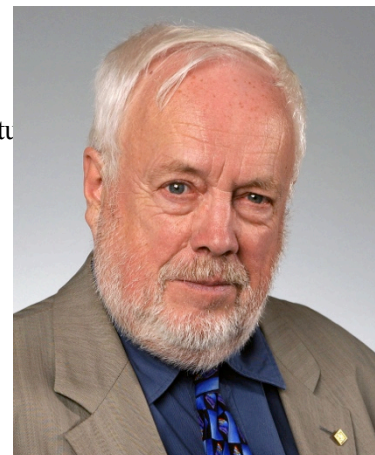
Université de Sherbrooke

3001, 12^e Avenue Nord

Sherbrooke (Québec) J1H 5N4

Tél: (438) 381-4463

Courriel: ge.plante@hotmail.com



Gérard Eugène Plante

Article reçu le : 17 novembre 2011

Article accepté le: 22 juin 2012



Résumé

Approche plus humaine de la pratique médicale, la **médecine personnalisée** occupe aujourd'hui une place grandissante autant dans l'étude des aspects physiopathologiques que dans son application. L'un des aspects spécifiques de cette nouvelle approche aborde ici le domaine de la progression de l'insuffisance rénale, un sujet malheureusement négligé. Bien que cet organe soit richement perfusé, on s'attarde peu à l'identification précoce des caractéristiques endothéliales/épithéliales de ses réseaux de microcirculation joints à son espace interstitiel particulier. Nous avons publié, il y a trente-trois ans, que l'arrêt de la progression de l'insuffisance rénale était associé au maintien de l'homéostasie des phosphates caractérisée par une excrétion urinaire élevée de cet anion. Trois ans plus tard, nous avons documenté ce phénomène en l'appliquant à un modèle animal (pré-hypertension), et l'avons identifié comme étant vraisemblablement lié à un mécanisme bradykinine-dépendant, sujet

encore malheureusement négligé. La calcification des tissus mous de l'organisme, y compris du système vasculaire, est reliée aux mécanismes précoces de l'atteinte de tous les organes-cibles, et est éventuellement contrôlable par l'intervention des modulateurs de la bradykinine. Le marqueur actuel de la progression de l'insuffisance rénale consiste à mesurer la filtration glomérulaire, l'une des quarante fonctions de cet organe, alors qu'elles sont déjà toutes détériorées à plus de 50 %, et qu'il est désormais trop tard pour une intervention efficace. Dans l'approche proposée ici, nous envisageons, premièrement, de rechercher les marqueurs précoces de la progression de l'insuffisance rénale, incluant les anomalies de l'homéostasie acido-basique (phosphates, sulfates) et azotée (ammoniaque, acide urique) et, deuxièmement, d'explorer les effets thérapeutiques éventuels du système bradykinine-dépendant qui vient de faire l'objet de récentes publications.



Summary

Personalized medicine is now occupying a major place in medical practice in both physio-pathological as well as humanistic approaches in medical practice. One specific aspect of this new approach is now dealing with the critical question of renal failure progression, a neglected subject in the domain of this highly perfused organ which possess a microcirculation network joining endothelial/epithelial structures close to its interstitial volumes. We did publish, thirty-three years ago, that the non-renal failure progression in human patients, who were maintaining phosphate homeostasis, is characterized by high capacity of urinary excretion of this anion. Three years later, we did document, in a pre-hypertensive experimental animal model, that such a phenomenon was related to a potential

bradykinin defect responsible for soft tissue abnormalities including the vascular system, an early target for organ damage, eventually susceptible to bradykinin modulation. The actual marker of renal failure progression is based almost exclusively on measurement of glomerular filtration, one of more than forty other functions of this organ, already more than 50% damaged too late for eventual positive intervention. In the actual situation, we propose first to identify and search early markers of renal failure progression including acid-base (phosphates, sulfates) and nitrogen (ammonia, uric acid) homeostasis abnormalities, and secondly, to explore eventual therapeutic bradykinin-dependent interventions which recently lead to interesting publications.



Introduction

La médecine personnalisée a pris récemment de l'ampleur dans plusieurs domaines. Son application s'est marquée non seulement dans l'évolution du diagnostic et du suivi génétique de la maladie, mais elle s'exerce aussi à des fins pratiques, économiques, et bientôt peut-être juridiques, dans les services de santé de nos populations grandissantes. Son essor est d'ailleurs à souhaiter dans d'autres domaines concernant l'élaboration de la physiopathologie des maladies. Ce type de médecine particulier a longtemps été négligé aux dépens du développement rapide, souvent précipité, d'approches thérapeutiques court-circuitant les étapes précoces de la maladie, difficilement identifiables sinon totalement obscures. Tel est le cas de l'hypertension artérielle, si répandue, dont l'approche n'a pas évolué au cours du dernier demi-siècle en dépit de son importance mondiale. A cet égard, nous pourrions avec assurance et de façon marquée, cibler le rein avant tout, dont l'étude de l'insuffisance, durant cette même période de notre histoire, est devenue depuis son identification des plus négligées. En effet, les problèmes d'insuffisance liés à cet organe vital occupent maintenant une

place importante à travers les traitements de remplacement tous azimuts actuellement en application, lesquels dépassent certains de nos efforts guerriers [1].

Problèmes

médicaux/sociologiques

Malgré son existence plus ou moins bien définie depuis quelques décades, la génétique, dont l'essor a été marqué au cours des dernières années, devient quand même un outil important dans le diagnostic d'un certain nombre de maladies, à tel point qu'elle permet d'en planifier maintenant de plus en plus l'impact sociologique et économique grandissant dans la plupart de nos sociétés. A cet égard, l'épigénétique devient une question centrale ciblant les interactions de plus en plus étroites, pour ne pas dire intimes, des facteurs environnementaux qui s'ajoutent aux répercussions de leurs effets possibles sur les marqueurs génétiques et dont nous ignorons encore certains des mécanismes [2,3]. Figurent à cet égard, les modifications possibles d'un certain nombre de poisons associés à différentes conditions morbides induites par l'évolution des espèces vivantes, y compris animales, récemment



identifiées. Mentionnons ici les anions phosphates et sulfates, l'acide urique et d'autres éléments y compris des traces de métaux jusque-là insoupçonnées. En ce qui concerne l'insuffisance rénale, la complexité de l'épigénétique englobe aussi les facteurs nutritionnels et comprend également la résistance à l'insuline, l'inflammation, le stress oxydatif de multiples origines, les médicaments ajoutés au cours des siècles à l'environnement et les toxines urémiques [4, 5]. Quelques aspects intéressants des événements reliés à l'épigénétique, avec leurs répercussions possibles sur l'importance accrue de la génétique en médecine, méritent d'être retenus. Sur le plan pratique, l'enseignement de la néphrologie personnalisée devra, dans l'avenir, permettre d'introduire l'étude des anomalies cliniques et biologiques précoces des dysfonctions rénales impliquées dans la progression de l'insuffisance rénale (PIR), autant celles qui sont déjà connues aujourd'hui, que celles qui seront identifiées dans le futur. Cette démarche médico-sociale concerne la valeur et l'importance éventuelles que peuvent lui accorder les autorités impliquées, au-delà de la génétique et de l'épigénétique elles-mêmes. Les étapes de ces démarches éventuelles apparaissent

dans le premier tableau, en annexe, et leur présentation vise justement à inciter les équipes médicales et paramédicales de première ligne à adopter à ce sujet une attitude préventive positive, ce qui est, en 2012, d'une importance capitale.

Survie des organes vitaux

Depuis la venue de l'eau, les espaces liquidiens des organismes vivants sur terre, végétaux et animaux, occupent une position centrale dans la compréhension de l'organisme et même de plus en plus dans les interventions thérapeutiques visant la protection des organes vitaux. Quelle que soit leur position dans l'ensemble de l'organisme, quelle que soit leur noblesse, ces espaces liquidiens assurent la survie des organes. Parmi eux, le rein occupe une position centrale, en particulier bien sûr, pour le néphrologue [6, 7]. L'étude de cet organe nous dirige sans hésiter vers les réseaux de microcirculation, depuis la pompe cardiaque, et comprend les volumes vasculaires, en étroite relation avec les espaces interstitiels (EIT) et les masses cellulaires, tous les deux de poids variables. Les réseaux de microcirculation comprennent une structure endothéliale de



propriétés structurales et physiologiques très variables contrôlant entre autres la composition des EIT voisins [8, 9]. Les volumes liquidiens extracellulaires, de dimensions très variables d'un organe à l'autre, forment les conditions de survie des structures endothéliales, assurant celle des organes vitaux, bien que des observations récentes aient soulevé quelques questions

fondamentales à ce sujet, localisant la survie des organes vitaux, du cœur en l'occurrence, dans l'EIT. Ces constatations de nature physiologique ont, en effet, soulevé l'importance capitale de la composition moléculaire des EIT [10, 11], de nature chimique, comme étant centrale dans la vie cellulaire, tel que discrètement suggéré dans la **Figure 1**.

ÉVOLUTION DES COMPARTIMENTS LIQUIDIENS

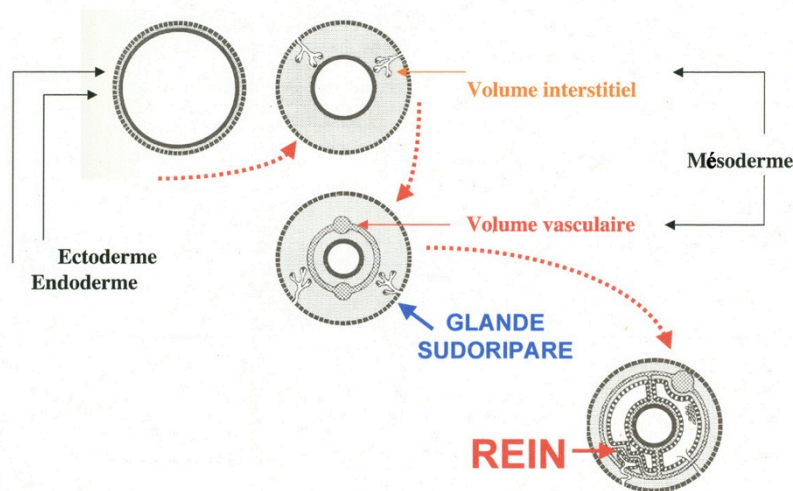


Figure 1

Lorsque l'on considère les espèces vivantes, du monde végétal au monde animal, l'évolution embryologique des étapes ectoderme / endoderme, est fort intéressante. Plus tard, dans cette évolution fascinante devenue maîtresse du système vasculaire, survient l'apparition du mésoderme, avant bien sûr, celle de la pompe cardiaque. Cette dernière étape est précédée

d'un volet circulatoire veineux/artériel contractile. Révélateur d'une avenue fort attrayante pour la recherche, il suggère la possibilité d'une intervention pharmacologique, y compris des quinine, probablement médiateurs interstitiels. Figure modifiée de Florey, E. General and Comparative Animal Physiology 1966, W.C. Saunders, 713p.



Longtemps, nous avons considéré les EIT comme étant homogènes, alors qu'une liste impressionnante de macromolécules, du collagène aux glycosaminoglycans, à la fibronectine y occupent une grande place en situation normale. La composition électrolytique des EIT est elle aussi hétérogène et contribue de façon significative à la distribution liquidienne, notamment des cations calcium et sodium, et les phosphates liés à l'acide hyaluronique [12, 13]. L'hétérogénéité de ces espaces joue un rôle physiologique capital en situation normale ainsi qu'en physiopathologie, entre autres en influençant les mouvements gazeux du sang vers les masses cellulaires, tels ceux de l'oxygène, du monoxyde et de l'hydroxyde de carbone et sans doute bientôt des molécules azotées. L'interaction possible entre les différentes fonctions des cellules endothéliales, incluant leur perméabilité inter-endothéliale, ainsi que l'orientation des protéines de transport luminal / antiluminal, peuvent être observées [14, 15]. Enfin, l'existence des fibres nerveuses autonomes bidirectionnelles dans les EIT a pris une importance significative dans certains phénomènes liés à l'algésie pathologique dans le diabète, et aussi plus récemment dans l'hypertension artérielle,

telle la raréfaction capillaire. Elle a peut-être également une implication dans la rigidité des artères de conductance en microcirculation [16], comme l'indique d'ailleurs l'observation clinique rapportée au niveau du pénis, un phénomène intéressant, occasionnellement identifié dans le questionnaire clinique. La **figure 1** résume et introduit quelques aspects importants des relations structures / fonctions des opérations qui se déroulent dans les EIT, y compris dans les glandes sudoripares et dans les reins, branchés sur le mésoderme.

Sur le plan de l'évolution, il est intéressant de noter l'apparition du mésoderme chez les espèces pluricellulaires et chez celles qui développent, à partir de lui, les volumes liquidiens organisés qui vont établir les connexions inter-organes permettant de relier les autres structures liées à l'ectoderme et à l'endoderme. Avec la naissance du mésoderme apparaîtra désormais, dans cette extraordinaire histoire, le développement tardif du système circulatoire, avec évidemment sa pompe cardiaque, après l'étape transitoire de la circulation veineuse / artérielle, jusque-là unique [17]. L'historique du mésoderme, représenté sommairement dans la Figure 1, introduit le chapitre complexe, mais d'importance centrale, des domaines de



l'ischémie-reperfusion, de la revascularisation et des possibilités de reconstruction des tissus parfois délétères, rencontrés dans le vieillissement. Enfin, s'y retrouvent surtout des mécanismes physiologiques et pharmacologiques nouvellement développés en recherche, y compris ceux qui touchent le système kalikréine-kinine dont l'existence, pour des raisons encore inexpliquées, est quasi universellement considérée comme mésodermique. Dans une étude extensive abordant la microcirculation de nombreux organes différents, depuis le rein jusqu'aux systèmes nerveux et osseux, il a été rapporté que les récepteurs de la bradykinine (BK) sont affectés dans plusieurs maladies vasculaires [18]. Assez rarement, des anomalies multiples reliées au système de la BK ont été rapportées dans plusieurs organes, suggérant des mécanismes de nature microcirculation / espace interstitiel commun.

Intégration des événements aux problèmes liés au rein

La PIR constitue à l'heure actuelle et deviendra dans les années qui viennent un sujet d'urgence médicale pour deux

raisons. Premièrement, à cause de l'incidence grandissante du problème revu précédemment, dans le contexte du rôle central de cet organe-cible dans plusieurs maladies vasculaires; deuxièmement, à cause de la pauvreté grandissante des marqueurs précoces, surtout parce que leur utilisation est tardive dans son évolution. Le degré de perfusion sanguine rénale est le plus élevé de tous les organes. Exprimé par le flot (absolu: ml/min) par poids de l'organe (relatif: ml/g tissu), il s'élève au-dessus de celui du cerveau et même de celui du myocarde, ce qui rend urgent la nécessité d'en quantifier précisément les répercussions précoces et de faire le suivi temporel des très nombreuses fonctions de cet organe. La mesure actuelle, assez grossière, de la seule fonction de filtration glomérulaire (GFR), aussi exprimée en terminologie différente (eGFR), est de plus en plus critiquée par plusieurs néphrologues de renom [19, 20]. La dissociation entre la fonction glomérulaire et les nombreuses fonctions tubulaires, longtemps négligées, entretient malheureusement l'idée de la valeur pathologique de l'eGFR dans la PIR. Une vision génétique complète, examinant les aspects circulatoires glomérulaires et tubulaires rénaux, devrait ressusciter les considérations mentionnées plus haut [21],



y compris dans l'enseignement futur de la physiologie rénale. L'estimation du flot sanguin, qui détermine plus de 75% des autres fonctions de cet organe situées dans la masse tubulaire microcirculatoire/épithéliale (VAS-EPI), devient sensible évidemment aux facteurs étiologiques visant ces éléments structuraux et fonctionnels. Le rôle majeur que joue l'interstitium rénal dans les processus d'interactions entre l'endothélium et l'épithélium de la zone tubulaire proximale, de même que les interventions possibles qui y sont reliées, sont à retenir. De plus, les modifications, toujours négligées, des limites d'expansion adaptative opérées par la capsule rénale, réduisant ainsi toute transformation pathologique de la VAS-EPI, vont bientôt faire ressurgir les problèmes liés au rein [22, 23], problèmes qui seront peut-être considérés comme événement majeur par la médecine de demain.

La **Figure 2** résume les particularités de la microcirculation rénale glomérulaire et péritubulaire géographiquement différente dans les sections parenchymateuses. Elles montrent de plus, de façon intéressante, des propriétés différentes de perméabilité endothéliale à l'albumine, lesquelles sont susceptibles de modifier plusieurs

événements épithéliaux. C'est le cas, entre autres, de l'internalisation des protéines de transport situées sur la bordure en brosse et/ou les membranes baso-latérales [13]. Toute modification induite par l'insertion dans différents segments de l'épithélium tubulaire de modulateurs du cytosquelette, de nombreuses autres substances, certaines d'origine nucléaire, peut se traduire par des conséquences graves sur les nombreuses fonctions rénales. S'ajoutent également à cet égard certains agents pharmacologiques, telle la colchicine, susceptibles de modifier l'action d'autres marqueurs diagnostiques ajoutés à la mesure, très faible, de l'eGFR, tel que proposé dans la Figure 2. Une autre anomalie perçue dans l'atteinte de la fonction rénale, mais peu popularisée dans l'évaluation de la progression de l'eGFR, l'albuminurie, dont les mécanismes ne sont toujours pas clairement établis, est aussi cliniquement prise en compte [23]. Considérée comme le résultat d'une atteinte exclusive endothélio-épithéliale glomérulaire, l'apparition urinaire de l'albumine est maintenant identifiée comme un défaut de récupération par l'épithélium tubulaire proximal. Ce phénomène est également illustré dans la **Figure 2**.



MICROCIRCULATION RÉNALE

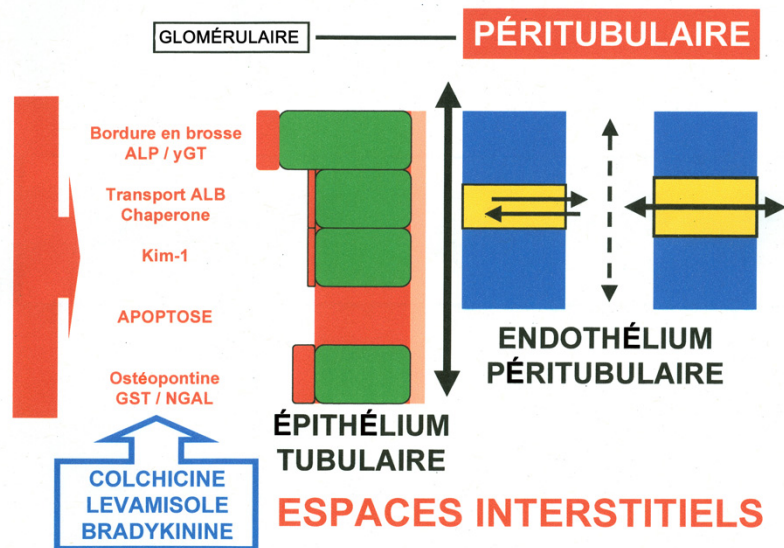


Figure 2

La microcirculation rénale, le plus riche organe perfusé, est maintenant considérée comme le centre de la progression de l'insuffisance de cet organe vital, en regard de bio-marqueurs qui manquent cruellement aux néphrologues et à beaucoup d'autres industriels de la santé. La subdivision de cette circulation glomérulaire (+/- 20%), et surtout péri-tubulaire (+/- 80%), fait l'objet à présent de points centraux dans le domaine des bio-marqueurs diagnostiques. Elle touche surtout les phénomènes liés aux membranes épithéliales de la bordure en brosse, jusqu'aux modifications structurales (transport de l'albumine, apoptose). Celles-ci sont représentées à gauche de cette figure en plusieurs étapes sous-divisées. Illustré sur la portion droite de cette figure, l'endothélium vasculaire constitue la plus grande surface du flot rénal. En physiologie, celui-ci regroupe de nombreux événements cytologiques propres à

cet organe auxquels s'ajoute la perméabilité capillaire, encore et toujours négligée. Sous la liste des phénomènes épithéliaux tubulaires s'ajoutent des observations concernant la sécrétion d'hydrogène via l'échangeur Na^+/H^+ de type 3 (NHE3), le transport des phosphates (NaPi2), reliés à l'activité de la phosphatase alcaline (ALP), ainsi qu'au phénomène chaperone-dépendant du transport des macromolécules. Dans la portion inférieure gauche de la figure sont aussi représentées des interventions pharmacologiques possibles, dont celle de la BK, sur les phénomènes épithéliaux. Encore négligés aujourd'hui, il n'est toujours pas fait mention des mécanismes impliqués dans la perception et la mesure des espaces interstitiels rénaux par la capsule rénale, mécanismes déjà observés il y a plus d'un demi-siècle dans l'hypertension artérielle.



Un premier événement digne d'intérêt, concernant trois dysfonctions tubulaires rénales précoces importantes, est la baisse significative de l'ammoniogénèse (NH_3) rénale qui peut contribuer à une diminution importante de la capacité d'élimination des acides fixes produits par le métabolisme intermédiaire, l'excrétion extra-rénale par les glandes sudoripares étant presque négligeable [24, 25, 26, 27]. Les répercussions précoces de cette anomalie rénale sur les tampons extracellulaires de l'organisme deviennent insidieusement importantes et sont de l'ordre de 100 à 150mEq quotidiennement. Ces effets contribuent au niveau de la masse musculo-squelettique à induire un énorme déficit du métabolisme phospho-calcique, point de départ de la décalcification osseuse [24] et de ses conséquences interstitielles vasculaires. Elles sont elles-mêmes documentées à travers les répercussions cellulaires des fonctions ostéo-blastiques, potentiellement ciblées pour des interventions pharmacologiques possibles. En plus de la réduction de l'excrétion de l'acide nette occasionnée par la baisse de la NH_3 , il est intéressant d'ajouter une autre modification précoce possible survenant dans la PIR. Elle est reliée à la baisse probable, non encore étudiée, de l'excrétion

de l'acidité titrable dont le véhicule est connexe à l'excrétion urinaire des phosphates, laquelle contribue normalement à la moitié de l'excrétion de l'acide nette.

Une seconde modification précoce de la PIR, également négligée dans la littérature, est liée à l'hyperphosphorémie relative, attribuée à une diminution significative de l'excrétion urinaire de cet anion important. A l'inverse, le ralentissement de la PIR, cliniquement identifié chez des humains, a été rapporté comme étant relié à un meilleur contrôle de la phosphorémie. Ce contrôle serait peut-être opéré par un mécanisme non entièrement établi qui pourrait être lui-même associé à une meilleure adaptation de la phosphaturie [28]. L'hypothèse de cette régulation envisagerait même l'intervention d'une internalisation possible d'un transporteur de la bordure en brosse de l'épithélium tubulaire proximal de l'anion phosphate (NaPi2) induite par une activation du cytosquelette [13]. Ce phénomène pourrait causer une résistance à l'hormone parathyroïdienne, événement évidemment inattendu dans l'évolution de l'insuffisance rénale. Comme l'a montré récemment une publication très intéressante résumée dans la **Figure 3**, le transporteur des phosphates est articulé à un autre transporteur important, l'échangeur Na^+/H^+ de type 3



(NHE3), impliqué dans la sécrétion de l'hydrogène. Ces événements impliquent aussi l'identification d'étapes cytosoliques nouvelles ouvrant la voie à des interventions

pharmacologiques possibles semblables à celle de la très ancienne colchicine, molécule égyptienne connue.

TERRIBLE BORDURE EN BROSSE

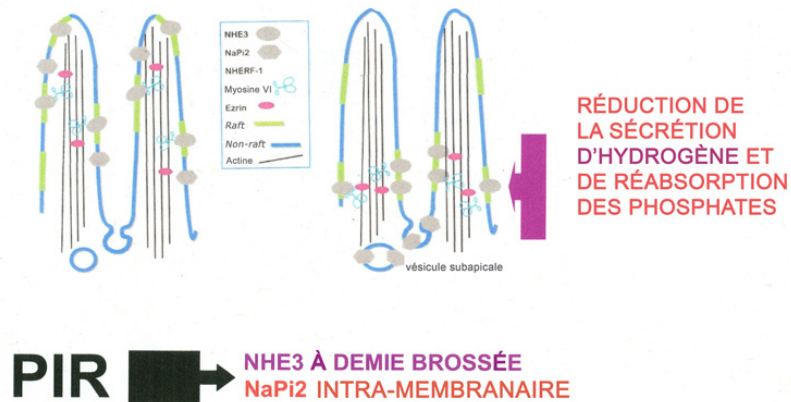


Figure 3.

La modulation éventuelle du transporteur des phosphates (NaPi2) au niveau de la bordure en brosse de l'épithélium tubulaire proximal, potentiellement internalisé par des phénomènes cytosoliques (colchicine-dépendants démontrés précédemment), peut contribuer à une résistance parathyroïdienne. Ce segment important du néphron par le déménagement

cellulaire de cette protéine membranaire explique l'hyperphosphorémie, et s'ajoute aux phénomènes délétères de la calcification tissulaire extra-squelettique associée aux nombreuses complications favorisant la progression de l'insuffisance rénale. Figure modifiée de McDonough AA Am J Physiol 298 :R851-R861.



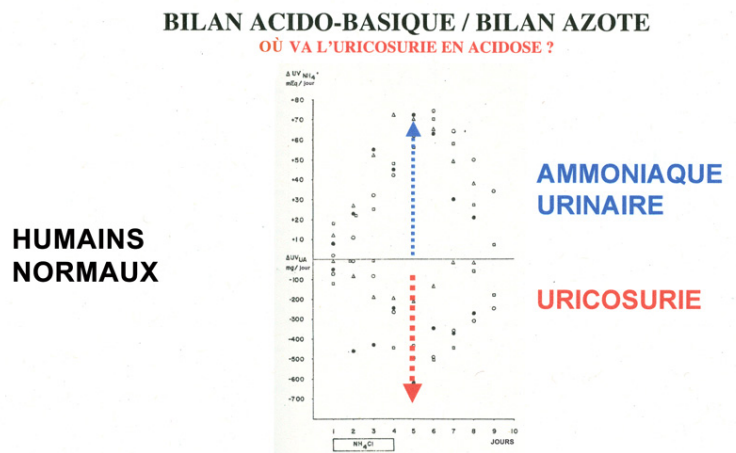
Enfin, la troisième anomalie, également peu documentée, laquelle est susceptible de prendre de l'importance dans les années qui viennent est le développement de l'hyperuricémie au cours de la PIR [14]. Les mécanismes responsables de ce nouveau marqueur possible sont loin d'avoir suscité de l'intérêt dans la communauté scientifique. On semble en effet avoir oublié l'étroite relation que pourrait avoir l'interaction métabolique de la glutamine entre la NH_3 et

la synthèse de la lourde molécule quadri-azotée (l'acide urique), molécule qui nous intéresse particulièrement. Cette hypothèse a déjà été suggérée et apparaît dans une observation intéressante et intrigante à la fois, faite sur l'humain, et rapportée il y a près d'un demi-siècle : une augmentation de la NH_3 / hypo-uricosurie accompagnée d'une élévation de l'uricémie [24], relation azotée, pour le moins remarquable, présentée dans la **Figure 4**.

Figure 4

La contribution de l'hyperuricémie dans la progression de l'insuffisance rénale est loin de se limiter aux autres effets toxiques associés à l'accumulation de cet agent quadri azoté. Tel que nous l'avons suggéré, il y a presque un demi-siècle, son action rapportée sur le muscle se joint facilement à ses effets délétères possibles qui l'éloignent de son état azoté, pour l'associer éventuellement à un phénomène évolutif encore inconnu,

peut-être aussi embryologique, d'une déviation du métabolisme de la glutamine, l'acide aminé le plus abondant chez l'humain. L'association toujours inexpliquée de l'ammoniurie, induite par une acidose, et de l'hypo-uricosurie associée



s'avère difficile à réconcilier avec l'intervention unique des enzymes impliqués inversement dans la production et la dégradation de la glutamine, tel que démontré chez l'humain normal. Figure modifiée de Plante et al. 1968.



*Résumé et retour personnalisé
au réin d'abord et avant tout*

Cette revue assez brève d'une nouvelle approche clinique et biologique propose d'évaluer les aspects structuraux et physiologiques rénaux, car ils pourraient permettre le développement de nouveaux marqueurs plus précis dans l'évaluation de la PIR, d'autant qu'ils pourraient contribuer à l'évolution plus humaine de la néphrologie personnalisée. Il n'est pas impossible de structurer des méthodes non invasives pour procéder à la mesure des trois fonctions décrites plus haut, de manière à établir les rôles respectifs de l'homéostasie acido-basique, de la régulation du métabolisme des phosphates et enfin de l'intégration des dérivations possibles de la balance azotée. Certaines de ces trois fonctions vitales jouent en effet un rôle interactif précoce, peut-être même amplificateur, dans l'atteinte de plusieurs autres organes-cibles. Une réalisation assez rapide de la démonstration de pareils bio-marqueurs

pourrait permettre d'éventuelles interventions bénéfiques de la médecine personnalisée, médecine qui, comme nouvelle approche, est souhaitable dans le futur. Elle pourrait permettre en plus de saisir la complexité des nombreuses autres fonctions rénales dont l'étude a été longtemps négligée, outre la diminution tardive de l'eGFR. Dans les années futures, il serait possible également, en initiant une intervention précoce, dans un contexte protecteur de ces fonctions vitales, d'éviter certaines interventions pharmacologiques qu'on ne connaît pas comme étant à risque. Evidemment, l'accélération de l'emploi des procédures nouvelles visant la protection des organes vitaux, ciblées dans la PIR, en particulier l'amplification des actions positives de la BK et de ses précieux récepteurs, est susceptible de créer un avenir bénéfique [29]. L'identification des marqueurs génétiques et épigénétiques impliqués dans la régulation des récepteurs universels B1 et B2 de la BK, démontrée dans des publications récentes, fort stimulantes, présage d'un futur prometteur en médecine personnalisée [30].



Références

- 1- Rovin BH, McKinley AM, Birmingham DJ. Can we personalize treatment of kidney diseases? *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4:1670-1676.
- 2- Dwivedi RS, Herman JG, McCaffrey TA, Raj DSC. Beyond genetics: epigenetic code in chronic renal disease. *Kidney Int* 2011; 79:23-32.
- 3- Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17 :1503-1520.
- 4- Vallon V. The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Am J Physiol* 2011; 300: R1009-R1022.
- 5- Belcher JM, Edelstein CL, Parikh CR. Clinical application of biomarkers for acute kidney injury. *Am J Kidney Dis* 2011; 57: 930-940.
- 6- Chade AR. Renovascular disease, microcirculation, and the progression of renal injury: role of angiogenesis. *Am J Physiol* 2011; 300 :R783-E790.
- 7- Brodsky, SV, Yamamoto T, Tada T, Kim B, *et al.* Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure rescue by transplanted endothelial cells. *Am J Physiol* 2002; 282 :F1140-F1144.
- 8- Katamura M. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces. *Am J Physiol* 2008; 295 :F323-F334.
- 9- Radisky DC. Epithelial-mesenchymal transition and its implication fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112 :1776-1784.
- 10- Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifactorial disorder (The wiggers award lecture). *Am J Physiol* 2006; 291 :H985-H1002.
- 11- Basile DP, Friedrich JL, Spahic J, Khipe N, *et al.* Impaired endothelial proliferation and mesenchymal transition to vascular rarefaction following acute kidney injury. *Am J Physiol* 2011; 300 :F721-F733.
- 12- Kwon O, Wang W-W, Miller S. Renal organic anion transporter is maldistributed and diminished in proximal tubule cells in vasculature after ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 2008; 295 :F1807-F1816.
- 13- Pieczynski J, Margolis B. Protein complexes that control epithelial polarity. *Am J Physiol* 2011 300 :F589-F601.
- 14- McDonough AA. Mechanisms of proximal tubule sodium transport regulation that link extracellular fluid volume and blood pressure *Am J Physiol Regul Integr and Comp Physiol* 2010; 298:R851-R861.
- 15- Gingras M, Farand P, Safar ME, Plante GE. Adventitia: the vital wall of conduit arteries. *J Am Soc Hypertens* 2009; 3:166-183.
- 16- Maury E, Ramsay KM, Bass J. Circadian rhythms and metabolic syndrome. From experimental genetics to human diseases. *Circ Res* 2010; 106 :447-462.
- 17- Florey E. An Introduction to General and Comparative Animal Physiology. Philadelphia: W.B.Saunders Co, 1966: 713p.
- 18- Kakokia M, Sullivan KA, Backus C, Hayes JM, *et al.* Lack of both bradykinin B1 and B2 receptors enhances nephropathy, neuropathy and bone mineral loss in Akita diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:10190-10195.
- 19- Melamed ML, Bauer C, Hostetter TH. eGFR : is it ready for early identification of CKD? *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:1569-1572.
- 20- Rouse RL, Zhang J, Stewart SR, Rosenzweig BA, *et al.* Comparative profile of commercially available urinary biomarkers in preclinical drug-induced kidney injury and recovery in rats. *Kidney Int* 2011; 79: 1186-1197.



21- Viau A, Karovi KL, Laouari D, Burtin M, *et al.* Lipokalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *J Clin Invest* 2010; 120:4065-4076.

22- Koch KM, Aynedjian HS, Bank N. Effect of acute hypertension on sodium reabsorption by the proximal tubule. *J Clin Invest* 1968; 47:1696-1709.

23- Walker KA, Bertram JF. Kidney development : Core curriculum 2011. *Am J Kidney Dis* 2011; 57:948-958.

24- Plante GE, Durivage J, Lemieux G. Renal excretion of hydrogen in primary gout. *Metabolism* 1968; 17:377-385.

25- MacLaughlin M, Damasco MC, Igaretta P, Aonera C. *In vitro* and *in vivo* evaluation of proximal tubular acidification in aging rats. *Am J Physiol* 2001; 280:R1627-F1631.

26- Frassetto LA, Morris RC Jr, Sebastian A. Effect of age on blood acid-base composition in

adult humans : role of age-related renal functional decline. *Am J Physiol* 1996; 271:F1114-F1122.

27- Nagami GT, Chang JA, Plato ME, Santamaria R. Acid loading in vivo and low pH in culture increase angiotensin receptor expression: enhanced ammoniogenic response to angiotensin-II. *Am J Physiol* 2008; 295:F1864-1870.

28- Plante GE. Phosphate excretion determines the progression of renal disease. *Kidney Int* 1989; 36(Suppl 27):S128-S132.

29- Plante GE, Bissonnette M, Sirois MG, Regoli D, *et al.* Renal permeability alteration precedes hypertension and involves bradykinin in the spontaneously hypertensive rat. *J Clin Invest* 1992; 89:530-532.

30- Regoli D, Plante GE, Gobeil F Jr. Impact of kinins in the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther* 2012; 135(1):94-111.



Les kinases de type Polo : maîtresses du cycle cellulaire et cibles thérapeutiques anti-cancer

Polo-Like Kinases: Masters of the Cell Cycle and Targets for Cancer Therapies

Xavier Pinson, Vincent Archambault

Institut de recherche en immunologie et en
cancérologie, et Département de Biochimie,
Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale
Centre-ville, Montréal (Québec) Canada H3C
3J7

xavier.pinson@umontreal.ca
vincent.archambault.1@umontreal.ca

Téléphone : 514-343-6111, poste 15795
Télécopieur : 514-343-6843



Vincent Archambault

Article reçu le 12 décembre 2011
Article accepté le 10 avril 2012



Résumé

La transmission sans erreur du matériel génétique lors de la division cellulaire est essentielle au développement et à la survie des organismes eucaryotes. La fine régulation nécessaire à ce processus fait intervenir un jeu complexe d'interactions entre protéines kinases et phosphatases. Parmi celles-ci, les kinases de types Polo (ou *Polo-like kinases*, PLK) jouent des rôles importants à de nombreuses étapes du cycle cellulaire, particulièrement en mitose et en cytokinèse. Ceci est notamment reflété par le dérèglement fréquemment observé des protéines de cette famille dans différents types de cancers. PLK1 est ainsi une cible de développement de thérapies anticancéreuses et des inhibiteurs de cette kinase font en ce moment l'objet d'essais cliniques. Cet article passe en revue les fonctions principales des PLK humaines, et plus particulièrement le rôle de PLK1 dans la régulation du cycle cellulaire. Nous discutons de la conservation des PLK chez les eucaryotes et de l'importance des organismes modèles dans l'étude des fonctions de ces protéines. Enfin, nous résumons le rôle des PLK dans la biologie du cancer et leur utilisation comme cibles thérapeutiques.

Summary

The faithful segregation of genetic material during cell division is essential for proper development and survival of eukaryotes. This process requires complex regulatory networks of proteins that include many kinases and phosphatases. The Polo-like kinases (PLKs) family members play important roles at many stages of the cell cycle, particularly in mitosis and cytokinesis. This is reflected by the aberrant activities of these kinases, frequently observed in many cancers. PLK1 is a validated drug target for cancer therapy, and inhibitors are currently in clinical trials. In this review, we survey the current knowledge of the main functions of human PLKs, particularly PLK1 in cell cycle regulation. We also discuss how PLKs in model organisms parallel human PLKs and have been instrumental in dissecting their functions. Finally, we briefly summarize the implications of PLKs in cancer and their potential as drug targets.



Introduction

Le cycle cellulaire est entraîné par un jeu complexe de protéines au centre duquel on trouve les kinases cyclines-dépendantes (les CDK). Liées à différentes cyclines, elles agissent successivement au cours du cycle. En association avec la cycline B, l'action de CDK1 permet l'entrée de la cellule en mitose et est en cause notamment dans la rupture de l'enveloppe nucléaire, la condensation des chromosomes ou l'assemblage du fuseau mitotique [1]. La transition métaphase/anaphase est un moment crucial initié par le complexe E3 ubiquitine-ligase, APC/C qui déclenche l'inactivation de CDK1 *via* la protéolyse de la cycline B, ainsi que la ségrégation des chromosomes *via* la protéolyse de securine, l'inhibiteur de la séparase. L'APC a aussi d'autres substrats dont la dégradation facilite la complétion de la division [1].

Ces grands acteurs du cycle cellulaire et les événements cellulaires de la mitose et de la cytokinèse qu'ils contrôlent sont finement régulés par de nombreux autres facteurs. Depuis sa découverte, la kinase Polo et ses orthologues sont apparus comme des régulateurs cruciaux, agissant à tous les stades de la mitose et ont gagné au fil des années une place centrale dans notre compréhension de la symphonie

enzymatique de la division cellulaire. On sait maintenant que les kinases de type Polo forment une famille de protéines agissant à divers stades du cycle cellulaire et leur importance dans la biologie du cancer est de mieux en mieux établie.

Structure et conservation des kinases de type Polo

Le gène *polo* a été identifié en 1988 chez la mouche *Drosophila melanogaster* à la suite d'un crible génétique pour des mutants affectant la progression de la mitose [2]. Le clonage de ce gène, quelques années plus tard, a révélé qu'il encode une protéine kinase [3]. Depuis, plusieurs protéines kinases apparentées à Polo ont été identifiées et forment la famille des kinases de type Polo (*Polo-like kinases*; PLK). Les protéines de cette famille partagent un domaine Sérine/Thréonine kinase très conservé situé à la terminaison N, ainsi qu'un domaine dit *Polo-Box Domain* (PBD) à la terminaison C et permettant l'interaction avec les protéines cibles et la localisation des PLK à des structures subcellulaires spécifiques (Figure 1) [4].

Le PBD est lui-même généralement constitué de deux motifs conservés dits



Polo-box qui forment un site d'interactions avec des substrats, souvent à un site déjà phosphorylé [5]. Alors qu'une seule PLK existe chez les levures *S. cerevisiae* (Cdc5) ou *S. pombe* (Plo1), deux sont présentes chez *D. melanogaster* (Polo et SAK/PLK4) et jusqu'à cinq chez les eucaryotes supérieurs (PLK1-5) (Tableau I). Tandis que PLK1, PLK2 et PLK3 se ressemblent beaucoup au niveau de la séquence et des

caractéristiques fonctionnelles de leurs domaines, PLK4 se démarque par la présence d'un seul motif *Polo-Box* [5, 6], et PLK5 n'a pas d'activité kinase [7]. Plusieurs motifs de régulation contribuent à contrôler les activités des PLK par des modifications post-traductionnelles au cours de cycle cellulaire et selon le contexte cellulaire.

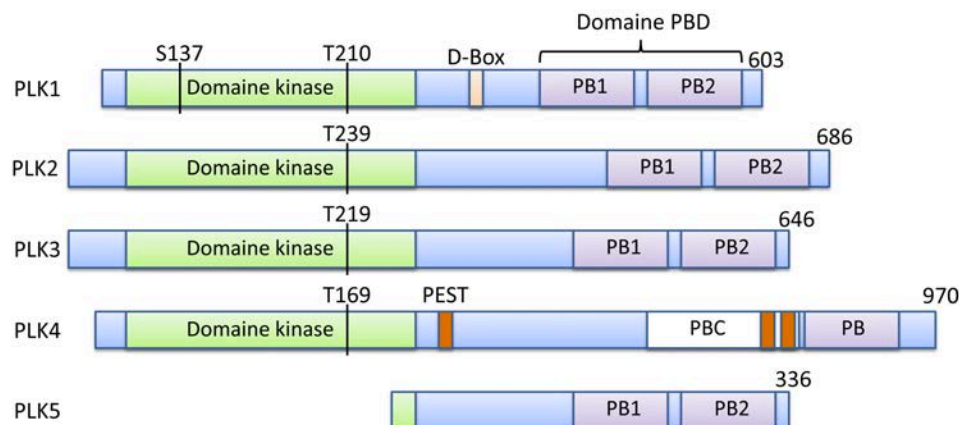


Figure 1. Structures primaires des 5 kinases de type Polo humaines.

Les kinases de type Polo partagent généralement un domaine kinase N-terminal (vert), ainsi qu'un domaine *Polo-Box* (PBD) C-terminal, composé de deux motifs *Polo-Box* (PB; mauve). Cependant, le domaine kinase de PLK5 est tronqué, alors que le domaine PBD de PLK4 ne contient qu'un motif *Polo-Box*, en plus d'un motif apparenté appelé *Polo-Box Cryptique* (PBC; blanc). PLK1-4 ont également en commun un résidu thréonine situé dans la boucle d'activation du domaine kinase et permettant leur activation par phosphorylation. La phosphorylation du résidu Sérine 137 de PLK1 a

également été en cause dans l'activation de la protéine. PLK1 comporte une boîte de destruction (*D-Box*; jaune) située entre les domaines kinases et PBD et permettant sa reconnaissance et son ubiquitination par le complexe APC/C. PLK4 comporte des séquences PEST (orange) permettant la reconnaissance puis l'ubiquitination par le complexe SCF. Des séquences PEST potentielles ont également été trouvées dans PLK2 et PLK3 mais leur possible rôle dans la protéolyse de ces deux kinases n'a pas été démontré.



Espèce	Protéines de la famille des kinases de type Polo			
<i>H. sapiens</i>	PLK1	PLK2 PLK3	PLK4	PLK5
<i>M. musculus</i>	mPLK1	mPLK2 mPLK3	mPLK4	mPLK5
<i>X. laevis</i>	Plx1	Plx2 Plx3	Plx4	Plx5
<i>D. melanogaster</i>	Polo	—	Plk4/Sak	—
<i>S. cerevisiae</i>	Cdc5	—	—	—
<i>S. pombe</i>	Plo1	—	—	—

Tableau I

Conservation et nomenclature des PLK dans différentes espèces

Les kinases Polo (en vert) jouent plusieurs rôles majeurs dans le cycle cellulaire et sont mieux conservées.

Polo, un régulateur central de la mitose et de la cytokinèse

Polo remplit diverses fonctions depuis l'entrée en mitose jusqu'à la cytokinèse. Ceci est reflété par la localisation de Polo et ses plus proches orthologues aux centrosomes, centromères, kinétochores, et au site de division de la cellule en cytokinèse (Figure 2) [8].

Tout d'abord, Polo intervient pour stimuler l'activation du complexe CDK1-cycline B qui, une fois actif, phosphoryle divers substrats permettant l'entrée en phase M. Ainsi, CDK1-cycline B déclenche par exemple la condensation des

chromosomes et la rupture de l'enveloppe nucléaire. La phosphorylation de CDK1 par les kinases MYT1 et WEE1 la maintient dans un état inactif. C'est leur déphosphorylation par la phosphatase CDC25 qui permet l'activation de CDK1-cycline B et l'entrée en mitose. CDK1-cycline B est capable d'inhiber MYT1 et de favoriser la protéolyse de WEE1 ainsi que d'activer CDC25, catalysant ainsi sa propre activation par une boucle d'auto-amplification [1]. La kinase Polo permet d'amorcer ce processus en activant CDC25 [9] et en inhibant WEE1 et MYT1 par phosphorylation [10, 11]. Par ces mécanismes, Polo contribue à dicter le



moment précis de l'entrée en mitose, mais n'est pas essentielle à l'entrée en mitose dans un cycle cellulaire normal, tel que démontré par des expériences d'inactivation

de Polo par voies génétique, chimique, par ARNi ou par injection d'anticorps [8].

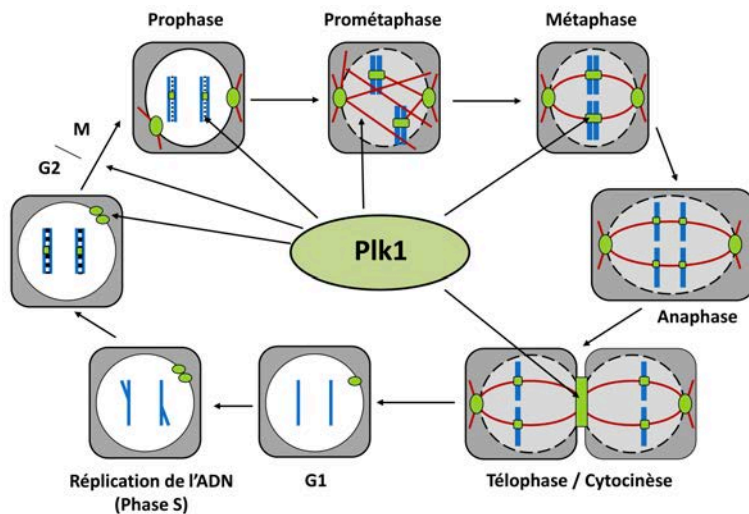


Figure 2.
Résumé des rôles et de la localisation de PLK1 au cours du cycle cellulaire

PLK1 régule plusieurs événements de la mitose et de la cytokinèse. Ce faisant, PLK1 (en vert) se localise clairement aux centromères, kinétochores et centrosomes en mitose, de même qu'au fuseau central en cytokinèse. Voir le texte pour plus de détails.

Les premiers mutants *polo* isolés chez la drosophile montraient des défauts au niveau des pôles du fuseau mitotique des neuroblastes larvaires et des embryons, d'où le nom de *polo*, pour pôle en espagnol [2]. Une des principales fonctions de Polo et de ses plus proches orthologues (dans ce texte : les « kinases Polo »; [Tableau I](#)) aux centrosomes est de contribuer à leur maturation. Polo permet notamment le recrutement du complexe γ -TuRC (*γ -Tubulin Ring Complex*), un facteur favorisant la nucléation de microtubules à partir des centrosomes [12]. Les kinases Polo régulent

les fonctions du centrosome en phosphorylant plusieurs effecteurs. Les mécanismes précis de ces régulations diffèrent entre les espèces [8].

La mitose requiert la séparation des chromatides sœurs des chromosomes répliqués durant la phase S. Le complexe des cohésines, qui médie la cohésion des chromatides, est phosphorylé par la kinase Polo, chez la levure comme chez les vertébrés. Cette phosphorylation favorise à la fois l'enlèvement d'une partie des cohésines en début de mitose et leur clivage par la séparase, à la transition métaphase-



anaphase, mais n'est probablement pas absolument essentielle à l'inactivation des cohésines [13, 14].

Par ailleurs, des études chez la levure et la mouche ont mis en évidence des rôles plus complexes des kinases Polo dans la ségrégation des chromosomes au cours de la méiose. Cdc5, en plus de phosphoryler le complexe cohésine, intervient dans la formation des enjambements (ou *crossing-overs*) en méiose I [15]. Plus tard, à l'anaphase II, la phosphorylation par Polo de protéines de la famille Shugoshin (SGO1 et SGO2 chez les vertébrés, MEI-S332 chez la drosophile) amorce la séparation des chromatides sœurs retenues aux centromères jusque-là par l'action de ces protéines [16].

La kinase Polo est essentielle à l'attachement des chromosomes aux microtubules, d'où sa localisation aux kinétochores [17]. Pour ce faire, PLK1 semble phosphoryler plusieurs composantes du kinétochore, mais le mécanisme exact n'est pas encore clair [8]. Tant que tous les microtubules ne sont pas attachés et sous tension, le point de contrôle du fuseau mitotique (*Spindle Assembly Checkpoint*; SAC) empêche la séparation des chromatides sœurs [18, 19]. Il n'est donc pas surprenant qu'une perte

d'activité de Polo cause un arrêt en prométaphase.

Les kinases Polo jouent aussi plusieurs rôles en fin de mitose, soit à partir de l'anaphase. L'attachement correct des chromosomes sur le fuseau mitotique libère l'APC de son inhibition par le SAC. L'ubiquitination de la securine (l'inhibiteur de la séparase) par l'APC active sa dégradation et la séparase est alors libre de déclencher la ségrégation des chromosomes en clivant les cohésines. Du même coup, l'APC active aussi la dégradation des cyclines mitotiques, ce qui inactive CDK1 et facilite la déphosphorylation de ses substrats. En conséquence, après l'anaphase, les chromosomes se décondensent, le fuseau se désassemble et l'enveloppe nucléaire se reforme. Les kinases Polo favorisent directement ou indirectement l'activité de l'APC par des mécanismes moléculaires qui semblent différer entre les espèces [8, 20]. En plus, chez la levure, Cdc5 active une cascade de signalisation qui déclenche la complétion de la mitose, le *Mitotic Exit Network*, aboutissant à l'activation de la phosphatase Cdc14, responsable de la déphosphorylation de plusieurs substrats de CDK1. Ce mécanisme n'est pas conservé chez les animaux. En revanche, on sait



depuis plusieurs années que la kinase Polo est requise à la cytokinèse chez plusieurs espèces, dont les levures et la mouche [21-23]. Récemment, les inhibiteurs chimiques de PLK1, qui ont été développés, ont permis de mettre en lumière le rôle crucial de PLK1 dans la cytokinèse des cellules humaines et de disséquer les mécanismes moléculaires en cause. Entre autres, PLK1 promeut l'activité de la GTPase RhoA, essentielle à la contraction du cytosquelette lors de la division [23-25].

Il ressort de plus d'une vingtaine d'années de recherche que la kinase Polo et ses orthologues ont des fonctions essentielles lors de la phase M aux niveaux des chromosomes, du fuseau, et de la cytokinèse, en plus de plusieurs fonctions plus accessoires (Figure 2). Non seulement pouvons-nous voir Polo et ses plus proches cousines comme les maîtresses du cycle cellulaire, mais on peut penser que ce dernier est l'amant des PLK, si intime est leur relation.

Les autres membres de la famille PLK

Outre PLK1, PLK4 a un rôle bien défini lors du cycle cellulaire : permettre la réplication des centrioles en phase S (Figure 3). La perte de fonction de PLK4 mène à une disparition des centrosomes et des cils, alors qu'un gain de son activité peut résulter en l'apparition de centrosomes surnuméraires [26, 27].

Les rôles des autres membres de la famille (PLK2, PLK3 et PLK5) dans le cycle cellulaire restent moins connus. PLK2 se localise aux centrosomes et semble atteindre un pic d'expression lors des phases G1/S. Un rôle dans la duplication des centrioles a été mis en évidence [28]. L'expression de PLK3 atteint son maximum en phase G1 et la protéine est localisée au nucléole en interphase. Il a été proposé qu'elle régule la transition G1/S et promeuve la réplication de l'ADN en favorisant l'accumulation de la cycline E [8, 29]. PLK3 est également en cause dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN en phosphorylant p53 et contribue à l'arrêt du cycle cellulaire et au déclenchement de l'apoptose [30]. En cela, PLK3 s'oppose dans cette voie à l'action de PLK1 [31].

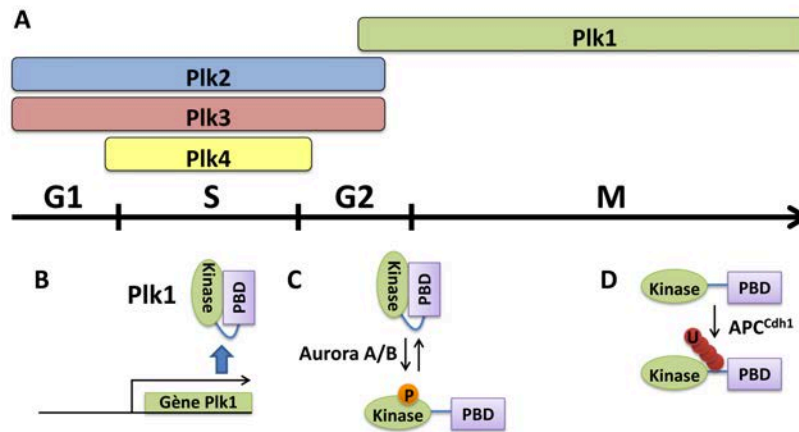


Figure 3. Fenêtres d'activité des PLK et régulation de PLK1

A. Les PLK agissent à différents moments du cycle cellulaire. PLK1 est active depuis la fin de la phase G2 et lors de la phase M, durant toute la mitose et jusqu'en cytokinèse. PLK2 et PLK3 régulent différents événements en interphase alors que PLK4 a un rôle dans la duplication des centrioles en phase S. La fenêtre d'activité de PLK5 est encore peu caractérisée.

B-D. Modes de régulation majeurs de PLK1. PLK1 est soumise à une régulation transcriptionnelle qui mène à son expression maximale en G2 (B). Elle est activée par phosphorylation au moment de la transition G2/M (C) et est dégradée par le protéasome en fin de mitose, après avoir été ubiquitinée par le complexe APC^{Cdh1} (D).

Alors que PLK1 est exprimée dans toutes les cellules en division, PLK2, PLK3 et PLK5 sont aussi exprimées dans des cellules quiescentes ou différenciées où elles régulent des processus hors du cycle cellulaire, par exemple dans les neurones [8, 32, 33]. PLK5 est une pseudo-kinase propre aux vertébrés qui n'a été que très récemment identifiée [32, 34]. Encore peu

caractérisée, l'expression de PLK5 répond à divers stress et se localise au niveau du nucléole. Sa surexpression induit l'arrêt du cycle cellulaire en G1, suivi d'apoptose [34]. Avec l'activité du domaine PBD mais sans activité kinase, PLK5 pourrait réguler certains processus par une sorte d'effet dominant négatif envers l'activité des autres PLK.



Régulation des kinases de type de Polo

L'activité des PLK est soumise à une fine régulation spatiale et temporelle par différents mécanismes. Tout d'abord, il existe une régulation au niveau transcriptionnel.

Dans le cas de PLK1, son expression est maximale au moment de la transition G2/M. Cependant, les modifications post-traductionnelles, plus rapides, sont essentielles à une régulation efficace des PLK lors du cycle cellulaire [8].

Comme de nombreuses autres kinases, les PLK sont activées par phosphorylation sur la boucle T, aussi appelée boucle d'activation. La phosphorylation à ce site induit un changement de conformation favorable à l'activité kinase. Le résidu phosphorylé est T210 pour PLK1 [35] et son haut degré de conservation chez les PLK souligne son importance (Figure 1). La mutation de ce résidu réduit fortement l'activité kinase de la protéine, sauf si le résidu substituant est chargé négativement, où l'activité kinase est alors fortement augmentée [35, 36]. En plus d'un effet modulaire sur le domaine kinase, il a été suggéré que cette phosphorylation empêche une interaction intramoléculaire entre les domaines kinases et PBD qui

inhiberait leurs fonctions respectives. Aurora A a été identifiée comme une kinase responsable de l'activation de PLK1 à T210 en G2 [37, 38]. Cependant, Aurora A ne peut plus remplir ce rôle lors des phases plus tardives de la mitose, et il est probable que d'autres kinases contribuent à activer PLK1. Il a été récemment montré chez *D. melanogaster* qu'Aurora B est requis pour l'activation de Polo à la boucle T aux centromères, permettant ses fonctions aux kinétochores en mitose, et cette voie semble conservée chez l'humain [39]. D'autre part, les autres PLK sont actives lors de phases G1/S, ce qui exclut les kinases Aurora pour leur activation. D'autres kinases doivent donc certainement intervenir.

D'autres sites de phosphorylation moins bien caractérisés semblent jouer un rôle dans la régulation des PLK. La phosphorylation de PLK1 à un autre résidu bien conservé, la Serine 137, semble réguler ses fonctions en fin de mitose [40].

Les PLK sont aussi les proies de la dégradation déclenchée par l'ubiquitination. Un motif boîte de destruction est présent entre les domaines kinase et PBD de PLK1, et permet son ubiquitination par l'APC^{Cdh1} et sa dégradation en fin de mitose (Figures 1 et 3) [41].



Le motif est absent chez les autres PLK humaines. PLK2-4 possèdent toutes des séquences PEST, reconnues par les complexes E3 ubiquitine-ligase SCF, souvent actives en interphase. Cela a été démontré dans le cas de PLK4 chez l'humain et la drosophile, où la dégradation de PLK4 permet de prévenir la duplication excessive des centrioles [42]. Le domaine PBD, par lequel les PLK interagissent avec d'autres protéines, permet un niveau supplémentaire de régulation. Il est essentiel à la localisation correcte des PLK [43]. Un site consensus d'interaction avec le PBD de PLK1 a été caractérisé, et correspond à Ser/Thr-pSer, où la sérine 2 est phosphorylée [4, 44]. Le site consensus d'interaction au PBD sur les substrats de PLK1 est souvent préalablement phosphorylé par CDK1 en début de mitose. Par contre, en G2 ou en fin de mitose, CDK1 est peu active et PLK1 peut alors créer ses propres sites de liaison à ses partenaires d'interaction ou substrats. L'accès de PLK1 à certains substrats qu'elle régule après l'anaphase est restreint par leur phosphorylation par CDK1. Il y donc une collaboration étroite entre PLK1 et CDK1, qui s'entraident en début de mitose, alors que CDK1 peut retarder certaines

fonction de PLK1 jusqu'en fin de mitose [45].

Il existe toutefois des interactions engageant le PBD des PLK qui ne requièrent pas de phosphorylation du partenaire. C'est le cas de l'interaction de Polo avec Map205 au niveau des microtubules chez la mouche [46]. Il en va de même pour l'interaction entre PLK1 et le cofacteur d'Aurora A, BORA, où la phosphorylation n'est pas nécessaire [38]. Finalement, le PBD de Cdc5 peut lier un substrat à un site alternatif aux résidus en cause dans les liaisons aux motifs phosphorylés, et ces mêmes résidus de Cdc5 ne sont même pas nécessaires aux fonctions essentielles de Cdc5 [47]. Les capacités de liaison du PBD des PLK à leurs partenaires d'interaction sont plus complexes qu'on pouvait l'envisager initialement.



Dérèglements des PLK dans les cancers

Vu son rôle central dans la régulation de la division cellulaire, il n'est pas étonnant de retrouver PLK1 parmi les protéines en jeu dans les cancers. PLK1 est surexprimée dans de nombreux cancers [48, 49]. Des niveaux élevés de PLK1 ont été corrélés avec un pronostic défavorable. De plus, plusieurs types de cellules cancéreuses sont plus sensibles que des cellules saines à une inhibition partielle de PLK1, ce qui ouvre une fenêtre thérapeutique [50]. PLK1 est effectivement devenue une cible pour le développement de nouvelles thérapies contre le cancer [33]. De nombreuses expériences suggèrent que PLK1 régule négativement la protéine p53. L'augmentation de l'activité de PLK1 contribuerait alors à la tumorigénèse en stimulant la transcription permettant le contournement de points de contrôle et en favorisant l'aneuploïdie [33]. Les mécanismes moléculaires par lesquels PLK1 facilite la survie et la prolifération des cellules cancéreuses sont presque assurément multiples.

Au contraire de PLK1, les activités de PLK2 et PLK3 semblent s'opposer à la transformation maligne. L'expression de PLK2 a été trouvée fréquemment réduite

dans des cancers des lymphocytes B. De plus, la même étude a montré que la surexpression de PLK2 induit l'apoptose de cellules issues de lymphomes de Burkitt [51]. PLK3 pourrait également être un suppresseur de tumeurs, son expression étant souvent diminuée dans de nombreux types tumoraux. Par ailleurs, son gène est situé dans une région chromosomique souvent impliquée dans la perte d'hétérozygotie des cellules tumorales [52]. *PLK4* est située dans une région fréquemment perdue dans les hépatocarcinomes et est un gène réprimé par p53 [33, 53]. Cependant, il a également été montré que des souris *PLK4*^{+/-} développaient spontanément plus de tumeurs hépatiques et pulmonaires, évoquant alors un rôle suppresseur de tumeurs pour PLK4 [54]. En conséquence, bien que les rôles de PLK2, PLK3 et PLK4 dans le développement de cancers restent à préciser, l'état des connaissances actuelles suggère que contrairement à PLK1, l'inhibition de PLK2, PLK3 ou PLK4 chez un patient cancéreux pourrait avoir des effets néfastes.



PLK1, une cible thérapeutique prometteuse

Ces dernières années, PLK1 a suscité beaucoup d'intérêt comme cible potentielle de traitements anticancéreux. On a d'abord observé que l'inactivation de PLK1 par interférence sur sa traduction pouvait à elle seule réduire substantiellement la prolifération et déclencher l'apoptose des cellules cancéreuses [55]. De nombreux projets de développement d'inhibiteurs chimiques de PLK1 ont été amorcés, et à ce jour, plusieurs inhibiteurs du domaine kinase de PLK1 ont été développés. Un criblage à haut-débit suivi d'une phase d'optimisation a permis d'identifier le composé BI2536, un inhibiteur de PLK1 agissant par compétition avec l'ATP [56]. Ce composé est capable d'inhiber la prolifération de nombreuses lignées tumorales, et a démontré son efficacité *in vivo* [48, 56]. Cependant, il inhibe aussi PLK2 et PLK3 avec une efficacité très similaire, ce qui n'est pas souhaitable, compte tenu de leurs rôles dans la restriction du cycle cellulaire. À ce titre, certains inhibiteurs plus récents comme le GSK461364 sont plus spécifiques

et pourraient potentiellement s'avérer plus utiles en clinique. Ces composés ainsi que plusieurs autres, principalement des inhibiteurs compétitifs de l'ATP, font l'objet d'essais cliniques à des stades variés, et certains résultats sont encourageants [33].

Afin d'éviter les problèmes de spécificité rencontrés avec des molécules agissant sur le domaine kinase, d'autres efforts se sont focalisés sur l'inhibition du domaine PBD, unique aux PLK et nécessaire à leurs fonctions. De plus, le PBD diffère plus en séquence entre les PLK humaines que le domaine kinase. Un crible *in vitro* pour des inhibiteurs d'interactions du PBD de PLK1 avec un peptide a permis l'identification de la thymoquinone, et le développement subséquent de la Poloxine qui en est dérivée [57]. Sous l'effet de la Poloxine à des concentrations de l'ordre du micromolaire, des cellules cancéreuses arrêtent en mitose et la localisation de PLK1 est affectée [33]. Son potentiel anti-tumoral est à l'examen. Quelques autres inhibiteurs d'interaction des PLK ont été développés, mais il est encore tôt pour dire si l'inhibition du PBD, seule ou en combinaison avec l'inhibition du domaine kinase, sera porteuse de fruits pour traiter le cancer.



Conclusions

Depuis sa découverte, Polo a montré son caractère central et essentiel dans la régulation de la mitose. L'étude de cette enzyme et des autres membres de la famille des PLK a grandement éclairé la compréhension des mécanismes fondamentaux de la régulation du cycle cellulaire. PLK1 est maintenant une cible de choix pour l'exploration de nouvelles stratégies thérapeutiques, comme le reflète les nombreux inhibiteurs actuellement en développement. À ce titre, la particularité du PBD, unique aux kinases de type Polo pourrait s'avérer cruciale.

Outre les fonctions des kinases Polo, il est clair que les autres PLK, bien que moins bien connues, interviennent dans la régulation du cycle cellulaire à d'autres niveaux. Il est donc pertinent d'explorer leur rôle dans la biologie du cancer. Par ailleurs, les PLK sont de plus en plus associées à des fonctions hors du cycle cellulaire, laissant entrevoir une biologie plus complexe qu'envisagé auparavant pour ces kinases. Les kinases de type Polo sont encore bien loin d'avoir livré tous leurs secrets, et le futur nous dira si elles sont réellement un talon d'Achille du cancer.

Références

1. Morgan DO. The Cell Cycle: Principles of Control. 2007.
2. Sunkel CE, Glover DM. Polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J Cell Sci*, 1988. 89 (Pt 1): p. 25-38.
3. Llamazares S, *et al.* polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila*. *Genes Dev*, 1991. 5(12A): p. 2153-65.
4. Elia AE, Cantley LC, Yaffe MB. Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science*, 2003. 299(5610): p. 1228-31.
5. Elia AE, *et al.* The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell*, 2003. 115(1): p. 83-95.
6. Leung GC, *et al.* The Sak polo-box comprises a structural domain sufficient for mitotic subcellular localization. *Nat Struct Biol*, 2002. 9(10): p. 719-24.
7. de Carcer G, *et al.* Plk5, a polo box domain-only protein with specific roles in neuron differentiation and glioblastoma suppression. *Mol Cell Biol*, 2011. 31(6): p. 1225-39.
8. Archambault V, Glover DM. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. 10(4): p. 265-75.
9. Kumagai A, Dunphy WG. Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science*, 1996. 273(5280): p. 1377-80.
10. Watanabe N, *et al.* M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004. 101(13): p. 4419-24.
11. Inoue D, Sagata N. The Polo-like kinase Plx1 interacts with and inhibits Myt1 after fertilization of *Xenopus* eggs. *EMBO J*, 2005. 24(5): p. 1057-67.



12. Glover DM. Polo kinase and progression through M phase in *Drosophila*: a perspective from the spindle poles. *Oncogene*, 2005. 24(2): p. 230-7.
13. Alexandru G, *et al.* Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell*, 2001. 105(4): p. 459-72.
14. Sumara I, *et al.* The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell*, 2002. 9(3): p. 515-25.
15. Clyne RK, *et al.* Polo-like kinase Cdc5 promotes chiasmata formation and cosegregation of sister centromeres at meiosis I. *Nature Cell Biology*, 2003. 5(5): p. 480-5.
16. Clarke AS, *et al.* POLO kinase regulates the *Drosophila* centromere cohesion protein MEI-S332. *Dev Cell*, 2005. 8(1): p. 53-64.
17. Lenart P, *et al.* The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. *Curr Biol*, 2007. 17(4): p. 304-15.
18. Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. 8(5): p. 379-93.
19. Przewłoka MR, Glover DM. The kinetochore and the centromere: a working long distance relationship. *Annu Rev Genet*, 2009. 43: p. 439-65.
20. Eckerdt F, Strebhardt K. Polo-like kinase 1: target and regulator of anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis. *Cancer Res*, 2006. 66(14): p. 6895-8.
21. Carmena M, *et al.* *Drosophila* polo kinase is required for cytokinesis. *J Cell Biol*, 1998. 143(3): p. 659-71.
22. Ohkura H, Hagan IM, Glover DM. The conserved *Schizosaccharomyces pombe* kinase plo1, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells. *Genes Dev*, 1995. 9(9): p. 1059-73.
23. Yoshida S, *et al.* Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis. *Science*, 2006. 313(5783): p. 108-11.
24. Niiya F, *et al.* Phosphorylation of the cytokinesis regulator ECT2 at G2/M phase stimulates association of the mitotic kinase Plk1 and accumulation of GTP-bound RhoA. *Oncogene*, 2006. 25(6): p. 827-37.
25. Burkard ME, *et al.* Chemical genetics reveals the requirement for Polo-like kinase 1 activity in positioning RhoA and triggering cytokinesis in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007. 104(11): p. 4383-8.
26. Bettencourt-Dias M, *et al.* SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development. *Curr Biol*, 2005. 15(24): p. 2199-207.
27. Habedanck R, *et al.* The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nature Cell Biology*, 2005. 7(11): p. 1140-6.
28. Warnke S, *et al.* Polo-like kinase-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr Biol*, 2004. 14(13): p. 1200-7.
29. Zimmerman WC, Erikson RL. Polo-like kinase 3 is required for entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007. 104(6): p. 1847-52.
30. Xie S, *et al.* Plk3 functionally links DNA damage to cell cycle arrest and apoptosis at least in part via the p53 pathway. *J Biol Chem*, 2001. 276(46): p. 43305-12.
31. Ando K, *et al.* Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J Biol Chem*, 2004. 279(24): p. 25549-61.
32. de Carcer G, Manning G, Malumbres M. From Plk1 to Plk5: functional evolution of polo-like kinases. *Cell Cycle*, 2011. 10(14): p. 2255-62.
33. Strebhardt K. Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. 9(8): p. 643-60.
34. Andrysik Z, *et al.* The novel mouse Polo-like kinase 5 responds to DNA damage and localizes in the nucleolus. *Nucleic Acids Res*, 2010. 38(9): p. 2931-43.
35. Jang YJ, *et al.* Phosphorylation of threonine 210 and the role of serine 137 in the regulation of mammalian polo-like kinase. *J Biol Chem*, 2002. 277(46): p. 44115-20.
36. Jang YJ, *et al.* Functional studies on the role of the C-terminal domain of mammalian polo-like kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002. 99(4): p. 1984-9.
37. Macurek L, *et al.* Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint



- recovery. *Nature*, 2008. 455(7209): p. 119-23.
38. Seki A, *et al.* Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science*, 2008. 320(5883): p. 1655-8.
39. Carmena M, *et al.* The Chromosomal Passenger Complex Activates Polo Kinase at Drosophila centromeres. *Plos Biol.*, in press 2011.
40. van de Weerd BC, *et al.* Uncoupling anaphase-promoting complex/cyclosome activity from spindle assembly checkpoint control by deregulating polo-like kinase 1. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(5): p. 2031-44.
41. Lindon C, Pines J. Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J Cell Biol*, 2004. 164(2): p. 233-41.
42. Cunha-Ferreira I, *et al.* The SCF/Slimb ubiquitin ligase limits centrosome amplification through degradation of SAK/PLK4. *Curr Biol*, 2009. 19(1): p. 43-9.
43. Lee KS, *et al.* Mutation of the polo-box disrupts localization and mitotic functions of the mammalian polo kinase Plk. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998. 95(16): p. 9301-6.
44. Lowery DM, *et al.* Proteomic screen defines the Polo-box domain interactome and identifies Rock2 as a Plk1 substrate. *EMBO J*, 2007. 26(9): p. 2262-73.
45. Park JE, *et al.* Polo-box domain: a versatile mediator of polo-like kinase function. *Cell Mol Life Sci*, 2010. 67(12): p. 1957-70.
46. Archambault V, *et al.* Sequestration of Polo kinase to microtubules by phosphopriming-independent binding to Map205 is relieved by phosphorylation at a CDK site in mitosis. *Genes Dev*, 2008. 22(19): p. 2707-20.
47. Chen YC, Weinreich M. Dbf4 regulates the Cdc5 Polo-like kinase through a distinct non-canonical binding interaction. *J Biol Chem*, 2010. 285(53): p. 41244-54.
48. Strebhardt K, Ullrich A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(4): p. 321-30.
49. Holtrich U, *et al.* Induction and down-regulation of PLK, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994. 91(5): p. 1736-40.
50. Liu X, Lei M, Erikson RL. Normal cells, but not cancer cells, survive severe Plk1 depletion. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(6): p. 2093-108.
51. Syed N, *et al.* Transcriptional silencing of Polo-like kinase 2 (SNK/PLK2) is a frequent event in B-cell malignancies. *Blood*, 2006. 107(1): p. 250-6.
52. Dai W, *et al.* PRK, a cell cycle gene localized to 8p21, is downregulated in head and neck cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000. 27(3): p. 332-6.
53. Li J, *et al.* SAK, a new polo-like kinase, is transcriptionally repressed by p53 and induces apoptosis upon RNAi silencing. *Neoplasia*, 2005. 7(4): p. 312-23.
54. Swallow CJ, *et al.* Sak/Plk4 and mitotic fidelity. *Oncogene*, 2005. 24(2): p. 306-12.
55. Spankuch-Schmitt B, *et al.* Downregulation of human polo-like kinase activity by antisense oligonucleotides induces growth inhibition in cancer cells. *Oncogene*, 2002. 21(20): p. 3162-71.
56. Steegmaier M, *et al.* BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth *in vivo*. *Curr Biol*, 2007. 17(4): p. 316-22.
57. Reindl W, Strebhardt K, Berg T. A high-throughput assay based on fluorescence polarization for inhibitors of the polo-box domain of polo-like kinase 1. *Anal Biochem*, 2008. 383(2): p. 205-9.



**Découverte de modulateurs allostériques
peptidiques de récepteurs
transmembranaires :
focus sur la sélectivité fonctionnelle**

*Discovery of new allosteric peptidic modulators of transmembranous receptors : Focus
on functional selectivity*

¹Christiane Quiniou, ³Eugénie Goupil, ²William Lubell, ³Stéphane Laporte ¹Sylvain
Chemtob*

¹Département de Biochimie, Université de Montréal, Centre de recherche Hôpital Sainte-Justine;

²Département de Chimie, Université de Montréal; ³Département de pharmacologie et thérapeutique,
Université McGill

*Toute correspondance doit être adressée à Dr. Sylvain
Chemtob Hôpital Sainte-Justine Centre de recherche 3175,
chemin de la Côte-Sainte-Catherine H3T 1C5 local 2709
Montréal, Canada

Courriel : sylvain.chemtob@gmail.com

Téléphone : 514-345-4931 poste 2978



Sylvain Chemtob

Article reçu le : 12 avril 2012

Article accepté le : 01 juin 2012



Résumé

La capacité des modulateurs allostériques d'affecter sélectivement la signalisation découlant de l'activation des protéines (par exemple des récepteurs) en fait une nouvelle classe d'agents thérapeutiques pouvant intervenir de façon ciblée et efficace. Nous avons développé de petits peptides modulateurs allostériques (peptidiques de conformation D) reproduisant des portions de régions spécialement choisies à l'extérieur du domaine de liaison du ligand orthostérique, dans les régions interdomaines, la portion juxtamembranaire ou dans les boucles des récepteurs IL-1R/IL-1RAcP (récepteur de l'interleukine 1), FP (récepteur de la prostaglandine F_{2α}) et V2R (récepteur de type 2 de la vasopressine). Ces peptides ont démontré un mécanisme de sélectivité fonctionnelle caractéristique des modulateurs allostériques.

Summary

The potential of allosteric modulators to selectively affect the signalling following the activation of a targeted protein (such as a receptor) is probably the most promising pharmacological property of this new class of therapeutic agents. We have developed small peptidic allosteric modulators (D-peptide conformation) reproducing portions of flexible regions selected precisely outside the orthosteric binding site and into interdomains, juxtamembranous or loops regions of IL-1R/IL-1RAcP receptor (interleukin receptor 1), FP (prostaglandin F_{2α} receptor) and V2R (vasopressin receptor). *In vitro* and *in vivo* characterization of these peptides revealed functional selectivity and a binding site distinct from that of the orthosteric ligand, characteristic of allosteric modulators.



Historique

Depuis que R.P. Stephenson a défini l'efficacité en 1956 [1] en étudiant les effets de composés possédant des propriétés analogues à l'acétylcholine, la recherche en développement de médicaments a surtout mis l'accent sur des inhibiteurs orthostériques qui, par définition, entrent en compétition avec les ligands naturels des récepteurs pour le même site de liaison et qui bloquent ainsi certaines voies de signalisation qui auraient intérêt à demeurer actives. Ces dernières années ont été présentées de nouveaux concepts concernant la modulation de l'activité des récepteurs et l'aspect dynamique et allostérique des interactions protéines-protéines. Ils ouvrent la voie à la conception de médicaments se liant à un site différent du site de liaison du ligand naturel et pouvant affecter sélectivement des voies particulières de signalisation, donnant ainsi naissance à des thérapeutiques plus efficaces, sélectives et puissantes.

L'élaboration de la théorie allostérique s'est véritablement amorcée entre les années 1961 et 1965. Jacques Monod et son équipe ont introduit le terme « allostérie » (du grec *allos stereos*, signifiant « autre site ») dans le vocabulaire

de la chimie des protéines pour décrire la présence de sites de liaison pour des molécules modulatrices de l'activité. Le modèle MWC (Monod, Wyman, Changeux) en 1965 [2] proposait qu'une protéine existe en différentes conformations, dont certaines sont actives et d'autres inactives, et qu'un ligand se liant à l'une de ces conformations favorise le déplacement de l'équilibre vers celle-ci et de ce fait en augmente le nombre (conformations sélectionnées). Les premières tentatives de modéliser les interactions allostériques se sont poursuivies avec le modèle de Koshland *et al* (KNF) (1966) [3], qui décrivait les interactions entre un substrat et une enzyme et proposait que la liaison au site actif changeait la structure de l'enzyme (conformation induite). À partir de la découverte des protéines G [4], les modèles ligand-récepteur ont décrit la relation récepteurs-protéines G comme étant de type allostérique puisque celles-ci se lient à un site autre que le site orthostérique [5]. Le modèle d'antagonisme allostérique de F.J. Ehler [6] fut le premier modèle à introduire de façon formelle la sélectivité fonctionnelle et la différence de réponse dépendante de l'agoniste et du modulateur allostérique.



Les dernières avancées technologiques en matière de découverte et de caractérisation de nouveaux composés nous ont fait comprendre la réelle complexité de la dynamique ligand-récepteur et de la réponse biologique s'y rapportant. Les récepteurs ne fonctionnent pas comme des interrupteurs ouverts ou fermés mais doivent plutôt être vus comme des structures dynamiques capables d'adopter tout un éventail d'états conformationnels [7].

Au cours des vingt dernières années, des études de résonance magnétique (^{15}N et résonance paramagnétique) et de fluorescence chez le récepteur $\beta 2$ -adrénergique et la rhodopsine [8, 9] ont illustré la flexibilité et la multitude de conformations qu'une même protéine peut adopter, contrairement à ce que suggéraient jusqu'alors les résultats de cristallographie et les modèles théoriques. Des méthodes comme le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) et le BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) ont confirmé qu'une corrélation existe entre les changements

conformationnels et les changements fonctionnels observés avec différents ligands pour un même récepteur [10].

La nouvelle vision de l'allostérisme reconnaît désormais que les protéines préexistent en tant qu'ensembles de populations de conformères. Ces conformères se replient et se déplient continuellement de façon localisée, ce qui résulte en un nombre important de structures différant légèrement les unes des autres. La liaison d'un effecteur allostérique (sur un complexe ligand-récepteur ou sur une protéine seule) mène à un déplacement de l'équilibre et à un changement dans la composition des populations de conformères [11]. Selon cette nouvelle compréhension, la modulation allostérique peut comporter des micro-changements de conformations, difficilement détectables [12], qui influencent l'activité biologique contrôlée par un récepteur et mènent à une modulation différente de la signalisation induite par la liaison d'un ligand orthostérique, c'est-à-dire à une sélectivité fonctionnelle.



La sélectivité fonctionnelle, une propriété pharmacologique essentielle des modulateurs allostériques

L'efficacité d'un ligand à générer un effet biologique était auparavant considérée comme linéaire et uniforme. Un agoniste lié à un récepteur au site orthostérique générerait donc toute la gamme de signaux associés à ce récepteur. La signalisation de plusieurs récepteurs étant partiellement connue, l'évaluation de l'efficacité d'un composé consistait souvent à ne considérer que le paramètre classique validé dans la littérature.

Ces dernières années, certains agonistes des récepteurs de la dopamine et de la sérotonine ont démontré des activités pouvant être agonistes ou antagonistes en fonction des effets considérés. Ainsi, le récepteur de l'angiotensine [13], AT₁AR, signale différemment si le ligand présent est l'angiotensine ou son dérivé SII. Ce dernier ne peut activer la protéine G α q, mais induit l'internalisation du récepteur et active la voie des MAPK, ce qui génère un effet cardioprotecteur ouvrant des perspectives

pharmacologiques intéressantes. Un agoniste du récepteur AT₁IR, TRV120027, génère le même profil signalitique. Ces travaux décrivaient en fait ce que Terry Kenakin, en 1995, appellera « signalisation biaisée » ou « sélectivité fonctionnelle » [14].

Les modulateurs allostériques possèdent plusieurs propriétés intéressantes au niveau pharmacologique. La saturation de leurs effets découle du fait que le ligand allostérique n'occupe pas le site de liaison orthostérique et parvient donc rapidement à la saturation des sites de liaison, ce qui rend quasi inexistantes les risques de surdose. Au contraire, un modulateur orthostérique entre en compétition avec le ligand naturel pour le site de liaison et l'effet dépend directement de la quantité respective des deux ligands. La localisation du site de liaison des modulateurs allostériques leur confère aussi une plus grande sélectivité. Habituellement, les sites allostériques se retrouvent dans des régions stabilisatrices non conservées de la protéine. Mais la propriété de loin la plus intéressante en pharmacologie est la sélectivité fonctionnelle [15]. Cette propriété élimine par exemple l'accoutumance aux médicaments dans le traitement d'affections chroniques et permet d'éviter le blocage de



certaines voies de signalisation bénéfiques. Une inhibition compétitive et totale (antagoniste orthostérique) de la signalisation peut être préjudiciable, alors qu'un inhibiteur allostérique pourrait être capable de bloquer uniquement les voies responsables des signaux cellulaires pathologiques. Il y a habituellement un état qui est favorisé thermodynamiquement par le ligand allostérique, ce qui module positivement ou négativement certaines voies de signalisation [7].

Il existe quelques exemples de composés allostériques qui ont été caractérisés et qui ont démontré de la sélectivité fonctionnelle. L'aplaviroc [16] n'a pas d'effet sur l'affinité de la chimiokine RANTES (CCL5) pour le récepteur CCR5, mais il inhibe la réponse pharmacologique induite (mobilisation calcique). Par contre, l'aplaviroc ne bloque pas la réponse à un autre ligand du même récepteur, MIP-1 α . La neurokinine NKA induit l'activation des protéines G α s et G α q lorsqu'elle se lie au récepteur NK. Le composé LP1805 se lie à NKR sur un site différent de NKA et activerait uniquement la protéine G α q en inhibant le couplage à G α s [17]. Un autre exemple s'applique au composé AC-42, qui inhibe uniquement l'internalisation du

récepteur M $_1$ Ach mais non la réponse biologique [18].

Conception de modulateurs peptidiques allostériques

Des séquences peptidiques dérivées des séquences primaires des protéines (soit de l'interface entre deux sous-unités ou dimères, soit entre deux régions intramoléculaires) ont déjà été utilisées avec succès pour inhiber l'activité biologique de plusieurs récepteurs [19-21] en interférant avec leur assemblage ou leur conformation. Étant donné que ces régions sont situées à des endroits différents des sites de liaison orthostériques, ces peptides s'avèrent être des antagonistes non compétitifs pouvant moduler l'activité biologique des récepteurs – des caractéristiques qui correspondent à celles d'un modulateur allostérique [7].

L'approche utilisée par notre laboratoire dans le but de concevoir de petits peptides modulateurs (composés d'acides aminés de conformation d) ayant des propriétés allostériques a donc consisté à reproduire de petites parties des portions extracellulaires flexibles et des boucles des récepteurs de façon à ce qu'ils interagissent en s'interposant entre deux sous-unités ou



entre deux régions de la même sous-unité. Ces régions ont été spécialement choisies à l'extérieur du domaine de liaison du ligand orthostérique dans les régions interdomaines, la portion juxtamembranaire ou dans les boucles (régions flexibles) des récepteurs IL-1R/IL-1RAcP (récepteur de l'interleukine 1), FP (récepteur de la prostaglandine F2 α) et le V2R (récepteur type 2 de la vasopressine).

Étant donné que les boucles sont exposées durant les changements de conformation, notre hypothèse était qu'une séquence peptidique reproduisant certaines régions de ces boucles pourrait déplacer l'équilibre de l'ensemble vers un état particulier et modulerait la signalisation. Certaines voies de signalisation pourraient être partiellement inhibées ou potentialisées tandis que d'autres ne seraient pas touchées puisque le ligand orthostérique pourrait toujours se lier au récepteur pour induire la signalisation correspondante à ce conforme.

Peptides modulant l'activité de récepteurs couplés aux protéines G

Un grand nombre de régions importantes pour l'activation et l'activité des récepteurs couplés aux protéines G ont été identifiées [22]. Parmi ces régions, la seconde boucle extracellulaire a fait l'objet de recherches concernant son rôle dans la liaison du ligand orthostérique et, dans l'activation des récepteurs. Les résidus situés à l'interface de la région extracellulaire qui pouvaient potentiellement faire partie de sites allostériques, particulièrement ceux situés près du site de liaison au ligand [22], ont aussi fait l'objet d'études plus approfondies. . Nous avons donc reproduit les régions juxtamembranaires de deux récepteurs couplés aux protéines G, le récepteur FP (prostaglandine F2 α) et le récepteur de la vasopressine V2R, et vérifié leurs effets sur l'activité biologique.



*Récepteur de la prostaglandine
F_{2α} (FP) : activité des
modulateurs THG₁₁₃ et
PDC_{113.824}*

Les prostaglandines (PG), dont la synthèse est sous la gouverne de la cyclooxygénase et des prostaglandines synthases spécifiques, jouent un rôle important dans plusieurs états physiologiques et pathologiques, y compris durant la grossesse et l'accouchement [23]. Les prostaglandines sont les initiateurs du déclenchement du travail et agissent par l'intermédiaire des récepteurs couplés aux protéines G. En particulier, la prostaglandine PGF_{2α} promeut la contraction myométriale par l'activation du récepteur FP [23]. Le récepteur de PGF_{2α}, couplé à la protéine G_{αq}, induit la mobilisation calcique intracellulaire par l'accumulation d'inositol phosphate et l'activation de la protéine kinase C (PKC). Il a aussi été démontré que l'activation de FP induisait la réorganisation du cytosquelette dépendante de la protéine Rho et que ces deux voies de signalisation participaient à la contraction myométriale (**Figure 1B**). À partir d'un premier criblage *in vitro*, nous avons identifié un peptide, THG₁₁₃ (ilghrdyk), dont la structure est

dérivée de la région N-terminale de la 2^e boucle extracellulaire du récepteur FP, qui possède une activité tocolytique. À partir de la structure de ce peptide, nous avons développé un peptidomimétique, PDC_{113.824} (**Figure 1A**), qui est sélectif du récepteur FP et agit comme un modulateur allostérique en démontrant une sélectivité fonctionnelle par rapport à la signalisation du récepteur FP [24]. *In vivo*, PDC_{113.824} retarde le début du travail induit par PGF_{2α} ou le LPS chez les souris CD-1 gestantes (**Figure 1C**). *In vitro*, PDC_{113.824} interfère de manière minime sur l'activation de la protéine G_{αq}, mais agit plutôt comme un modulateur négatif en inhibant l'activation de la protéine G_{α12} et de ce fait inhibe la voie Rho kinase (ROCK) (**Figures 1D et 1E**) qui gouverne la réorganisation du cytosquelette. Par ailleurs, PDC_{113.824} agit comme un modulateur allostérique positif en amplifiant l'activation de la PKC et de Erk1/2 induite par PGF_{2α} (**Figure 1F**). Cette sélectivité dans la modulation s'explique par un couplage plus efficace à la protéine G_{αq} qu'à la protéine G_{α12}. Par conséquent, PDC_{113.824} présente des propriétés de sélectivité pharmacologique sur différentes voies de signalisation induite par la prostaglandine F_{2α}.

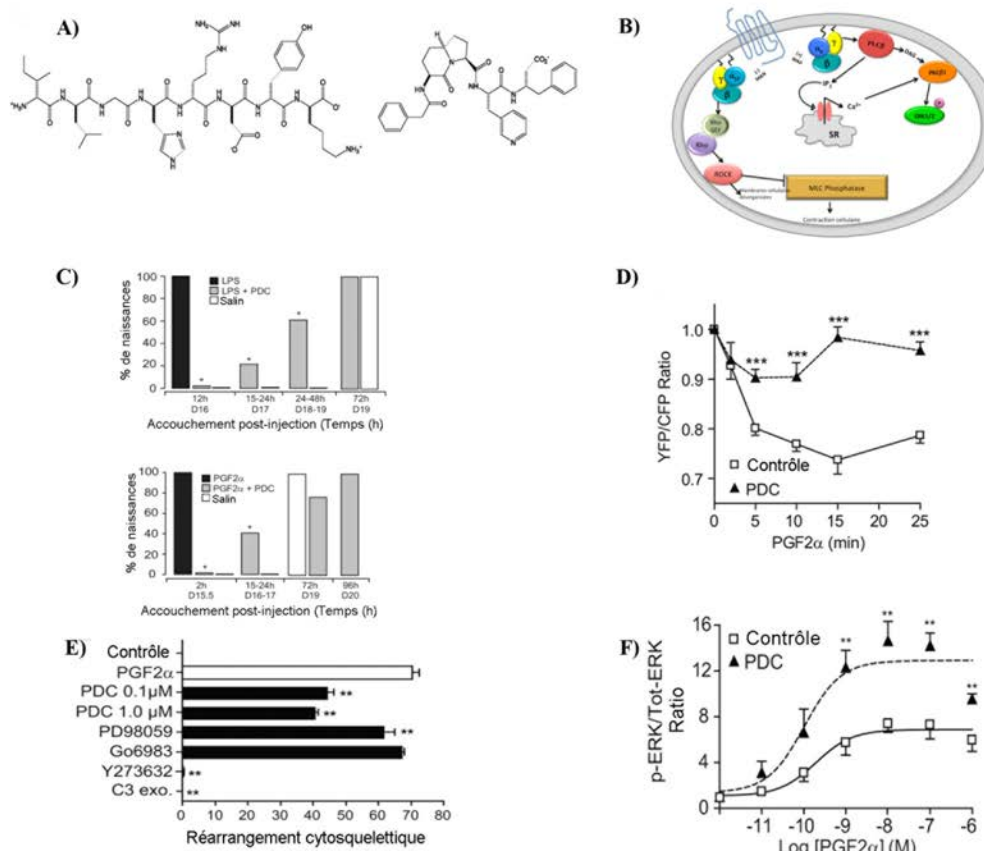


Figure 1

PDC113.824 démontre de la sélectivité fonctionnelle vis-à-vis du récepteur FP

A) Structure de THG113 (ilghrdyk) et de son dérivé peptidomimétique PDC113.824.

B) Signalisation lors de l'activation du récepteur par PGF2 α .

C) Action tocolytique de PDC113.824 chez la souris gestante suite à l'administration de LPS ou PGF2 α .

D) Activation de Rho GTPase déterminée par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert). L'activation de Rho diminue le signal FRET. PDC113.824 empêche l'activation;

E) PDC113.824 inhibe la réorganisation du cytosquelette induite par PGF2 α dans les cellules myométriales (PD98058 inhibiteur de MEK1, Go6983 inhibiteur de PKC, Y273632 et C3 exoenzyme inhibiteurs de Rho kinase);

F) PDC113.824 potentialise la phosphorylation des kinases Erk1/2 dans les cellules myométriales. Résultats tirés de la référence [24].



VRQ397 : un modulateur du récepteur de la vasopressine V_{2R}

L'arginine vasopressine (AVP) est un neuropeptide exerçant un effet sur la circulation et l'homéostasie hydrique corporelle. L'AVP agit par l'intermédiaire de trois récepteurs couplés aux protéines G, dont le V_{2R}, qui est majoritairement exprimé sur l'épithélium du tubule rénal collecteur et qui médie les effets hydro-osmotiques de la vasopressine [25]. V_{2R} est aussi présent sur l'endothélium et médie une vasodilatation [26]. V_{2R} joue donc un rôle dominant dans la rétention d'eau et dans l'inhibition de la contractilité vasculaire. Avec la même approche que celle décrite ci-dessus pour le récepteur FP, nous avons conçu six petits peptides reproduisant les régions juxtamembranaires du récepteur V_{2R} (**Figure 2A**) [27]. Le plus efficace,

VRQ397 (cravky), a été davantage caractérisé. VRQ397 inhibe la vasorelaxation induite par la DDAVP (desmopressine (1-désamino-8-D-arginine vasopressine), ligand sélectif pour le V_{2R} (**Figure 2B**), et augmente la clairance d'eau. Ce peptide agit spécifiquement sur V_{2R} de façon non compétitive en occupant un site de liaison différent du site orthostérique et démontre très clairement une sélectivité fonctionnelle d'action. Il inhibe la génération de la prostacycline PGI₂ (**Figure 2C**) mais non le couplage à la protéine G α s et la formation subséquente d'AMP cyclique (**Figures 2D, 2E**); il n'inhibe pas non plus le recrutement de la β -arrestine 2 (**Figure 2F**). Le peptide VRQ397 démontre donc véritablement des propriétés de signalisation biaisée en lien avec la définition d'un modulateur allostérique.

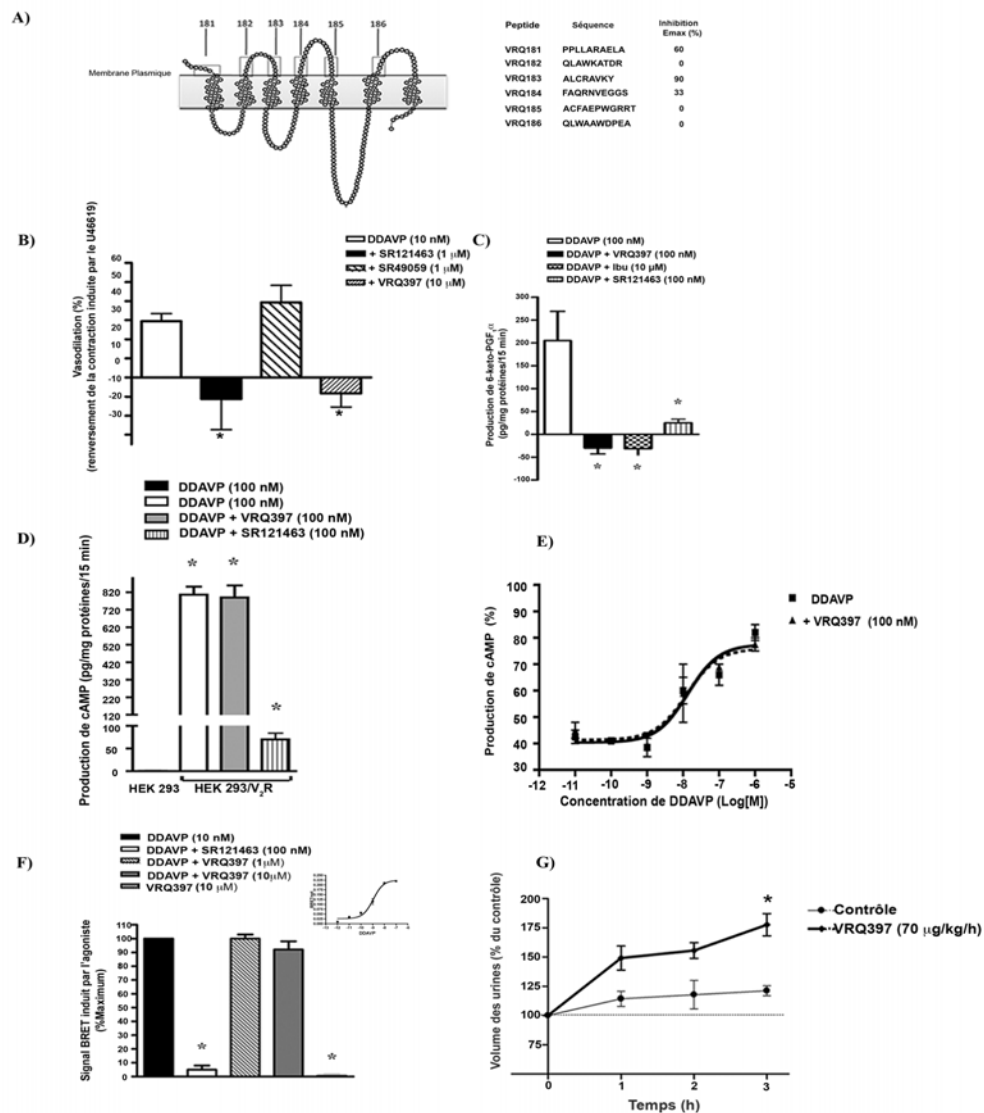


Figure 2 : Sélectivité fonctionnelle de VRQ397 vis-à-vis le récepteur V2R

A) Représentation graphique 2-D du récepteur de la vasopressine et emplacement des sites dont sont dérivés les peptides. Le tableau de droite indique la séquence et l'efficacité maximale des peptides à inhiber la vasodilatation induite sur le muscle crémastère de rat par la desmopressine, DDAVP.

B) Efficacité de VRQ397 à inhiber la vasodilatation, et **C)** la production de PGI₂

induite par le DDAVP dans le muscle crémastère de rat;

D) et E) VRQ397 n'a aucun effet ni sur la production d'AMP cyclique induite par le DDAVP dans des cellules exprimant V2R, ni sur **F)** le recrutement de la β -arrestine suite à l'activation du récepteur.

G) Effet diurétique de VRQ397 chez le rat [27].



*Modulateurs peptidiques
sélectifs au niveau fonctionnel
pour le récepteur de l'IL-1
(de type tyrosine kïnase)*

Le récepteur de l'interleukine-1 est composé de deux sous-unités, IL-1R et IL-1RAcP, qui est la protéine accessoire signalisatrice du complexe. L'IL-1RAcP interagit avec la sous-unité IL-1R qui forme un complexe avec l'IL-1 (IL-1R/IL-1) (**Figure 3A**). En nous basant sur cette information, nous avons conçu de petits peptides (≤ 12 acides aminés) qui reproduisent plusieurs régions de la protéine accessoire [28]. Parmi ces peptides, 101.10 (rytvela) inhibait certains effets biologiques de IL-1 β *in vitro* (ainsi qu'*in vivo*) et démontrait une modulation de ces effets et une sélectivité fonctionnelle en inhibant plus de 90 % de la prolifération des thymocytes mais seulement 30 à 35 % de la formation de PGE₂ (prostaglandine E₂) induite par l'IL-1 (**Figures 3C, 3E**); la séquence brouillée de rytvela (verytla) était inefficace. La séquence de 101.10 est située dans la portion juxtamembranaire de la protéine accessoire qui n'interagit pas avec le ligand.

En accord avec cette notion, rytvela (en employant [¹²⁵I]-rytvela) ne se lie pas au site orthostérique de liaison du substrat bien qu'il affecte légèrement l'affinité du ligand pour le récepteur. Ces caractéristiques le distingue de l'inhibiteur compétitif Kineret (IL-1Ra) [29]. *In vivo*, le peptide 101.10 injecté de façon intrapéritonéale inhibe l'inflammation du pavillon de l'oreille induite par l'injection sous-cutanée d'IL-1 β dans les souris CD-1 (**Figure 3F**).

Les autres peptides provenant de différentes régions (distinctes du site orthostérique) de l'IL-RAcP modulaient aussi différemment les effets biologiques de IL-1. Par exemple, les peptides 103, 106 et 108 affectaient de manière similaire au 101.10 la production de PGE₂ (**Figure 3C**), mais avaient des effets très différents sur la phosphorylation de p38 : par exemple, le peptide 103 augmentait la phosphorylation de p38 tandis que 101.10 l'inhibait totalement (**Figure 3D**). En somme, les peptides dérivés de la structure primaire de IL-1RAcP démontrent un mécanisme d'action correspondant à des modulateurs allostériques.

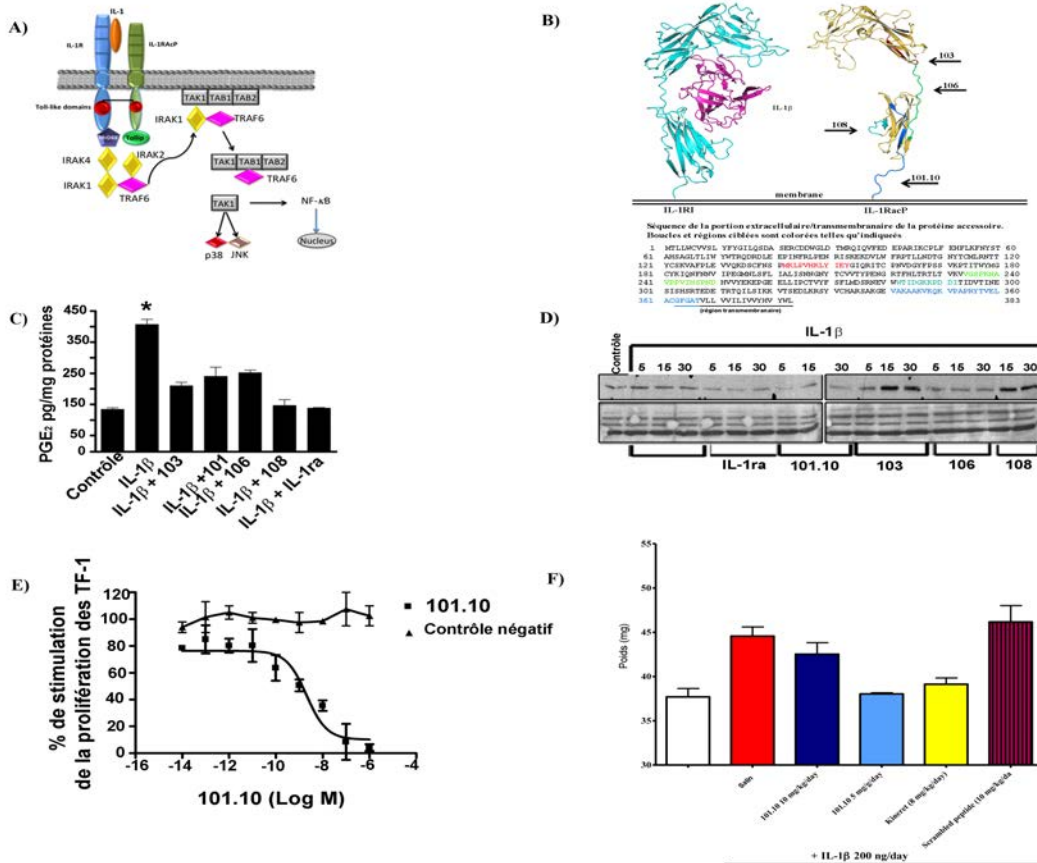


Figure 3.

Le peptide rytvela module les fonctions du récepteur IL-1R/IL-RAcP activé par IL-1 de manière sélective.

A) Signalisation classique de IL-1 β . IL-1 β se lie à IL-1RI et l'ensemble recrute IL-1RIAcP. Le complexe recrute ensuite MyD88 ce qui induit la phosphorylation des kinases associées à IL-1R. Par la suite NF κ B est activé et pourra entrer dans le noyau afin d'induire l'expression d'autres marqueurs pro-inflammatoires tels l'IL-6, IL-8 et COX-2. TAK1 peut aussi activer les MAPK telles que Erk1/2, p38 et JNK (tiré de Dinarello, C 2009 [30]).

B) Séquence primaire de IL-1RAcP. Les séquences colorées correspondent aux boucles indiquées sur la structure: bleu: 101.10, turquoise: 108, vert: 106, rouge: 103.

C) Effets de 101.10 (rytvela [0.1 μ M]), et autres peptides dérivés de la séquence de la protéine accessoire et IL-1Ra (9 nM) sur la production de PGE₂ et **D)** sur la phosphorylation de p38 induite par IL-1 β (50 pM) dans des cellules TF-1;

E) Dose réponse de l'effet inhibiteur du 101.10 sur la prolifération des lymphocytes TF-1 induite par IL-1 β .

F) Le peptide 101.10 injecté de façon intrapéritonéale inhibe l'inflammation sur le pavillon d'oreilles qui est induite par l'injection sous-cutanée d'IL-1 β (200 ng) dans des souris CD-1 [28].



Conclusion

Les modulateurs allostériques représentent une voie prometteuse pour des applications thérapeutiques. L'utilisation de modulateurs allostériques peptidiques dérivés de séquences primaires pour moduler l'activité biologique représente une approche potentiellement intéressante pour cette nouvelle classe d'agents thérapeutiques. Les modulateurs allostériques comportent les avantages suivants : 1) moins d'effets secondaires dus aux propriétés de sélectivité fonctionnelle et de saturation de la réponse; 2) de par leur nature peptidique (et leurs acides aminés de stéréochimie d), ces composés sont non reconnus par les protéases; 3) les études d'activité-structure permettent de transformer ces peptides en petites molécules ayant des propriétés pharmacologiques et thérapeutiques supérieures aux peptides, comme la biodisponibilité orale et la durée d'action. Malgré ces avantages et l'identification de sélectivité pharmacologique et de propriétés allostériques avec plusieurs composés thérapeutiques déjà sur le marché, la

découverte systématique de modulateurs allostériques demeure un défi. Ce défi reflète nos connaissances limitées dans l'interaction des récepteurs avec les protéines adjacentes impliquées dans la signalisation, la relation entre les changements conformationnels des récepteurs et la signalisation désirée, ainsi que dans la signalisation spécifique et l'effet désiré *in vivo*.

Remerciements

Nous tenons à remercier Dr. Audrey Claing et son équipe pour les expériences sur le cytosquelette ainsi que Mme Hensy Fernandez et Mme Isabelle Lahaie pour l'assistance technique. Dr. Christiane Quiniou est récipiendaire d'une bourse d'excellence doctorale de la Fondation des maladies du cœur. Les travaux sur les récepteurs FP et V2R ont pu être effectués grâce au soutien des Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) dans le cadre d'une subvention de groupe sur la régulation allostérique des récepteurs couplés aux protéines G (cTIGAR).



Références

1. Stephenson RP. 1956. A modification of receptor theory. *Br J Pharmacol Chemother* 11: 379-93
2. Monod J, Wyman J, Changeux JP. 1965. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol* 12: 88-118
3. Koshland DE, Jr., Nemethy G, Filmer D. 1966. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 5: 365-85
4. Gilman AG. 1984. G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell* 36: 577-9
5. De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ. 1980. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 255: 7108-17
6. Ehlert FJ. 1988. Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol Pharmacol* 33: 187-94
7. Kenakin TP. 2010. Ligand detection in the allosteric world. *J Biomol Screen* 15: 119-30
8. Peleg G, Ghanouni P, Kobilka BK, Zare RN. 2001. Single-molecule spectroscopy of the beta(2) adrenergic receptor: observation of conformational substates in a membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8469-74
9. Klein-Seetharaman J, Yanamala NV, Javeed F, Reeves PJ, Getmanova EV, Loewen MC, Schwalbe H, Khorana HG. 2004. Differential dynamics in the G protein-coupled receptor rhodopsin revealed by solution NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3409-13
10. Lohse MJ, Nikolaev VO, Hein P, Hoffmann C, Vilardaga JP, Bunemann M. 2008. Optical techniques to analyze real-time activation and signaling of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 29: 159-65
11. Gunasekaran K, Ma B, Nussinov R. 2004. Is allostery an intrinsic property of all dynamic proteins? *Proteins* 57: 433-43
12. Tsai CJ, del Sol A, Nussinov R. 2008. Allostery: absence of a change in shape does not imply that allostery is not at play. *J Mol Biol* 378: 1-11
13. Violin JD, DeWire SM, Yamashita D, Rominger DH, Nguyen L, Schiller K, Whalen EJ, Gowen M, Lark MW. 2010. Selectively engaging beta-arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance. *J Pharmacol Exp Ther* 335: 572-9
14. Kenakin T. 1995. Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol Sci* 16: 232-8
15. Kenakin T. 2007. Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28: 407-15
16. Watson C, Jenkinson S, Kazmierski W, Kenakin T. 2005. The CCR5 receptor-based mechanism of action of 873140, a potent allosteric noncompetitive HIV entry inhibitor. *Mol Pharmacol* 67: 1268-82
17. Maillet EL, Pellegrini N, Valant C, Bucher B, Hibert M, Bourguignon JJ, Galzi JL. 2007. A novel, conformation-specific allosteric inhibitor of the tachykinin NK2 receptor (NK2R) with functionally selective properties. *Faseb J* 21(9):2124-34.
18. Thomas RL, Mistry R, Langmead CJ, Wood MD, Challiss RA. 2008. G protein coupling and signaling pathway activation by m1 muscarinic acetylcholine receptor orthosteric and allosteric agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 327: 365-74
19. Peri KG, Quiniou C, Hou X, Abran D, Varma DR, Lubell WD, Chemtob S. 2002. THG113: a novel selective FP antagonist that delays preterm labor. *Semin Perinatol* 26: 389-97
20. Chalifour RJ, McLaughlin RW, Lavoie L, Morissette C, Tremblay N, Boule M, Sarazin P, Stea D, Lacombe D, Tremblay P, Gervais F. 2003. Stereoselective interactions of peptide inhibitors with the beta-amyloid peptide. *J Biol Chem* 278: 34874-81
21. Zhang TT, Cui B, Dai DZ, Tang XY. 2005. Pharmacological efficacy of CPU 86017 on hypoxic pulmonary hypertension in rats: mediated by direct inhibition of calcium channels



and antioxidant action, but indirect effects on the ET-1 pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 46: 727-34

22. Kristiansen K. 2004. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 103: 21-80

23. Olson DM, Zaragoza DB, Shallow MC, Cook JL, Mitchell BF, Grigsby P, Hirst J. 2003. Myometrial activation and preterm labour: evidence supporting a role for the prostaglandin F receptor--a review. *Placenta* 24 Suppl A: S47-54

24. Goupil E, Tassy D, Bourguet C, Quiniou C, Wisheart V, Petrin D, Le Gouill C, Devost D, Zingg HH, Bouvier M, Saragovi HU, Chemtob S, Lubell WD, Claing A, Hebert TE, Laporte SA. 2010. A novel biased allosteric compound inhibitor of parturition selectively impedes the prostaglandin F2alpha-mediated Rho/ROCK signaling pathway. *J Biol Chem* 285: 25624-36

25. Holmes CL, Landry DW, Granton JT. 2004. Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2 - clinical physiology. *Crit Care* 8: 15-23

26. Bichet DG. 2008. Vasopressin receptor mutations in nephrogenic diabetes insipidus. *Semin Nephrol* 28: 245-51

27. Rihakova L, Quiniou C, Hamdan FF, Kaul R, Brault S, Hou X, Lahaie I, Sapieha P, Hamel D, Shao Z, Gobeil F, Jr., Hardy P, Joyal JS, Nedev H, Duhamel F, Beauregard K, Heveker N, Saragovi HU, Guillon G, Bouvier M, Lubell WD, Chemtob S. 2009. VRQ397 (CRAVKY): a novel noncompetitive V2 receptor antagonist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R1009-18

28. Quiniou C, Sapieha P, Lahaie I, Hou X, Brault S, Beauchamp M, Leduc M, Rihakova L, Joyal JS, Nadeau S, Heveker N, Lubell W, Sennlaub F, Gobeil F, Jr., Miller G, Pshezhetsky AV, Chemtob S. 2008. Development of a novel noncompetitive antagonist of IL-1 receptor. *J Immunol* 180: 6977-87

29. Carter DB, Deibel MR, Jr., Dunn CJ, Tomich CS, Laborde AL, Slightom JL, Berger AE, Bienkowski MJ, Sun FF, McEwan RN, et al. 1990. Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature* 344: 633-8

30. Dinarello CA. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27: 519-50



L'émergence d'une nouvelle voie de signalisation: PAK-ERK3/4-MK5

PAK-ERK3/4-MK5 : the emergence of a new signal transduction pathway

Pierre-Luc Tanguay, Paul Déléris* et Sylvain Meloche

Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Département de Pharmacologie et Programme de Biologie Moléculaire, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7 Canada

*Adresse actuelle: Institut de Génomique Fonctionnelle, 141 Rue de la Cardonille, 34094 Montpellier, France

PLT et PD ont contribué également à la rédaction de cet article.

Correspondance :

Dr Sylvain Meloche
Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie
Université de Montréal
2950, chemin de Polytechnique
Montréal, Québec H3T 1J4, Canada
Tel.: (514) 343-6966
Courriel: sylvain.meloche@umontreal.ca



Sylvain Meloche

Article reçu le : 20 mars 2012
Article accepté le : 25 mai 2012



Résumé

Les voies de signalisation permettent à la cellule d'intégrer les informations provenant de leur environnement pour s'y adapter et maintenir l'homéostasie cellulaire. La caractérisation de ces voies représente donc un enjeu majeur pour mieux comprendre le fonctionnement physiologique normal ou pathologique. Dans cette revue, nous discuterons de la caractérisation récente d'une nouvelle voie de transduction du signal, assurée par les MAP kinases atypiques ERK3 et ERK4, qui relient les p21-activated kinases (PAKs) et la MAPKAP kinase 5 (MK5). Les rôles physiologiques potentiels de cette nouvelle voie seront analysés en fonction des résultats obtenus à partir de modèles de souris avec invalidation de ces gènes.

Summary

Signaling pathways are used by cells to sense and respond to their environment in order to maintain cellular homeostasis. The characterization of these cellular pathways is essential to understand physiological processes in normal and pathological states. In this review, we discuss the recent characterization of a novel signal transduction pathway involving group I PAKs, the atypical MAP kinases ERK3/ERK4 and the MAPKAP kinase MK5. We describe the possible physiological functions of this pathway from the phenotypic analysis of mouse models bearing inactivating mutations in these genes.



Les cellules sont constamment confrontées à différentes options: migrer, se différencier, se diviser ou mourir sont quelques possibilités qui s'offrent à elles et qui permettent de maintenir l'homéostasie de l'organisme. Dans ce but, un large éventail de récepteurs situés à la surface cellulaire sonde continuellement les signaux provenant du milieu extracellulaire et transmet l'information à différents réseaux de réactions biochimiques. Soigneusement élaborées au cours de l'évolution, ces voies de signalisation sont caractérisées par une succession d'interactions moléculaires et de réactions enzymatiques, principalement relayées par des protéines kinases. Ces enzymes permettent l'amplification du signal perçu par le récepteur et la transposition de celui-ci en une réponse cellulaire parfaitement coordonnée. Le génome humain code pour 518 protéines kinases ayant la capacité de phosphoryler plus du tiers des protéines d'une cellule, faisant de celles-ci une des plus importantes familles d'enzymes. Dans cet article de revue, nous traiterons d'une nouvelle voie de signalisation récemment caractérisée, la voie PAK-ERK3/4-MK5.

Les kinases de la famille PAK

PAK1, le membre fondateur de la famille des PAK (*p21-activated protein kinases*), a été identifié comme l'un des effecteurs principaux des GTPases Rac et Cdc42 [1]. Ces membres de la famille des Rho GTPases sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires, dont le remodelage du cytosquelette et la migration cellulaire. Par la suite, deux autres membres, PAK2 et PAK3, ont été clonés [2]. Aujourd'hui, nous savons que le génome humain encode six différentes PAKs regroupées en deux sous-familles selon leur structure et leur mode de régulation: les PAKs de groupe I (PAK1, PAK2 et PAK3) et de groupe II (PAK4, PAK5 et PAK6) (**Figure 1**).

Conservées au cours de l'évolution, les membres de la famille PAK sont retrouvés de la levure jusqu'à l'homme. Les six isoformes humaines possèdent un domaine de régulation N-terminal et un domaine kinase très bien conservé en C-terminal. Le domaine de régulation consiste en un domaine PBD (*p21-binding domain*), des régions riches en prolines et, seulement chez les PAKs de groupe I, d'un domaine



auto-inhibiteur nommé AID (*autoinhibitory domain*). Le domaine de régulation n'exerce pas exactement le même rôle chez les PAKs de groupe I et II. En effet, les PAKs de groupe I forment des homodimères lorsqu'elles sont sous leur forme inactive. L'interaction entre le PBD et une Rho GTPase entraîne la dissociation du dimère

en relâchant l'effet inhibiteur du AID ce qui provoque l'autophosphorylation de la boucle d'activation du domaine kinase [3]. De leur côté, les membres du groupe II n'ayant pas de AID possèdent une activité constitutive qui n'est pas modifiée suite à leur interaction avec Rac ou Cdc42 [4, 5].

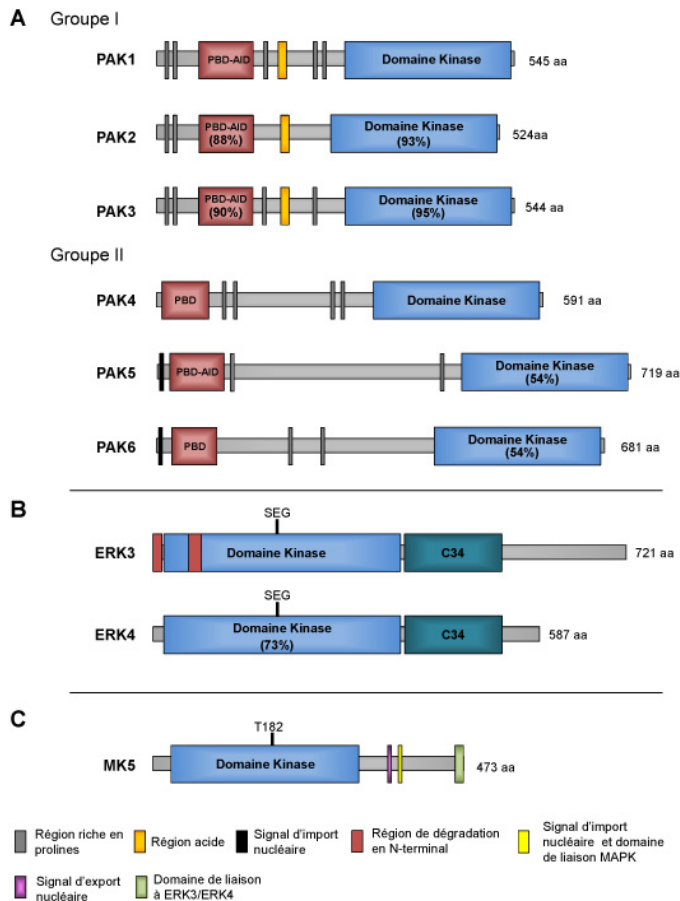


Figure 1

Structure primaire des PAKs, ERK3/ERK4 et MK5.

Les PAKs de groupe I et II possèdent un domaine de régulation en N-terminal qui inclut le PBD et, chez les PAKs de groupe I, une région AID. En C-terminal, on retrouve le domaine kinase. Les PAKs contiennent plusieurs régions riches en prolines. ERK3 et ERK4 possèdent un domaine kinase en N-terminal et une extension en C-terminal qui comprend une région conservée (C34) entre les deux protéines. Le domaine kinase de MK5 se situe en N-terminal et différents éléments de régulation (motif d'interaction, signaux d'import et export nucléaire) sont situés en C-terminal.



D'autres mécanismes d'activation des PAKs de groupe I indépendants des Rho GTPases ont également été décrits. Tout d'abord, PAK1 peut lier, *via* ses régions riches en prolines, les domaines SH3 des protéines adaptatrices Nck et Grb2. La relocalisation de PAK1 vers la membrane plasmique qui s'ensuit entraîne son activation suite à la phosphorylation par PDK1 de la Thr-423 de la boucle d'activation, ou par interaction avec des lipides tels que la sphingosine et l'acide phosphatidique [4]. De plus, PAK1 est activée suite à l'interaction avec le complexe GIT1/PIX et par certaines protéines kinases dont AKT [4, 6]. Finalement, lors de l'apoptose, PAK2 est fortement activée après clivage par les caspases-3, -8 et -10 qui libèrent le domaine catalytique C-terminal de l'action inhibitrice du domaine de régulation [7, 8].

À ce jour, plus de 40 substrats des PAKs ont été identifiés, ce qui explique leur implication dans un grand nombre de processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la survie, la transformation, le réarrangement du cytosquelette, la migration cellulaire, l'invasion et la tumorigenèse [4, 9]. Parmi ces substrats, on retrouve quelques protéines kinases, suggérant que les PAKs interviennent au sein de cascades de protéines kinases. Par exemple, les PAKs activent LIMK (*LIM domain kinase 1*) par phosphorylation de la Thr-508 de la boucle d'activation et inhibent MLCK (*myosin light chain kinase*). La protéine kinase MEK1, un activateur des MAP kinases ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*), est aussi un substrat des PAKs [10, 11]. La phosphorylation de MEK1 sur la Ser-298 pourrait contribuer à l'activation de MEK1 aux foyers d'adhésion. Récemment, deux études indépendantes réalisées par notre laboratoire et celui du Dr Beeser ont montré que les PAKs de groupe I activent également les MAP kinases atypiques ERK3 et ERK4 [12, 13].



Les MAP kinases atypiques ERK3 et ERK4

ERK3 et ERK4 définissent une famille de MAP kinases (*mitogen-activated protein kinases*) qu'on ne retrouve que chez les vertébrés. Elles sont décrites comme « atypiques » puisqu'elles ne sont pas activées par un membre de la famille des MAP kinases kinases contrairement aux MAP kinases dites classiques: ERK1/2, JNK et p38 [14]. Chez l'Homme, elles partagent ce caractère atypique avec NLK (*nemo-like kinase*) et ERK7. Les ADNc de ERK3 et ERK4 ont été clonés par homologie de séquence à ERK1 au début des années 1990 [15, 16].

ERK3 et ERK4 possèdent un domaine kinase conservé à leur extrémité N-terminale qui présente 73 % d'identité protéique entre elles et 41-42% avec ERK1. Néanmoins, certaines régions critiques de leur structure primaire diffèrent considérablement de celles des MAP kinases classiques comme ERK1/2. Premièrement, dans le domaine kinase, la boucle d'activation de ERK3/4 possède le motif Ser-Glu-Gly comprenant un seul site

de phosphorylation, contrairement à la séquence Thr-Xxx-Tyr retrouvée chez les MAP kinases classiques (**Figure 1**). Deuxièmement, ERK3 et ERK4 sont les seules kinases humaines à posséder la séquence Ser-Pro-Arg au niveau du sous-domaine VIII plutôt que la séquence Ala-Pro-Glu, bien que l'impact de cette différence sur l'activité enzymatique ne soit pas connu à ce jour. Finalement, en plus du domaine kinase, ERK3 et ERK4 possèdent une extension en C-terminal qu'on ne retrouve pas chez ERK1/2. La région C-terminale des deux protéines est très bien conservée entre les différentes espèces de vertébrés, ce qui suggère une fonction possiblement importante. Les 150 premiers acides aminés de ce domaine, nommé C34 (*conserved region in ERK3/4*), sont identiques à 50% entre ERK3 et ERK4 alors que leur extrémité, plus longue chez ERK3, présente une plus grande variabilité [14].

Deux mécanismes distincts interviennent dans le contrôle de l'activité de ERK3. Notre laboratoire a montré que ERK3 est une protéine très instable avec une demi-vie d'environ 30 minutes dans des cellules en prolifération [17]. Deux petites régions de 15 et 20 acides aminés en N-terminal,



nommées NDR1/2 (*N-terminal degradation region 1/2*), sont suffisantes et nécessaires pour induire la dégradation de ERK3 par le système ubiquitine-protéasome. Ce mode de régulation est unique à ERK3 puisque la demi-vie de ERK4 est de plusieurs heures. D'autre part, l'activité des MAP kinases classiques est principalement régulée par l'état de phosphorylation des résidus Thr et Tyr de la boucle d'activation. Dans le cas de ERK3 et ERK4, la Ser-189/186 de la boucle d'activation est phosphorylée en *trans in vivo*, mais contrairement aux autres MAP kinases, cette phosphorylation n'est pas modulée par des facteurs de croissance ou des stress cellulaires [18, 19]. La phosphorylation de ce site n'en demeure pas moins importante, puisque la mutation de ce site abolie leur activité enzymatique.

La MAPKAP kinase (*mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase*) MK5 a été identifiée comme premier partenaire d'interaction et substrat physiologique de ERK3 et ERK4 [20-23]. Bien que l'impact fonctionnel de l'interaction entre ERK3/4 et MK5 ne soit pas entièrement compris, il semble que MK5 joue un rôle de chaperone, du moins envers ERK3, stabilisant l'expression de cette dernière. De plus, la

formation du complexe résulte en une redistribution presque exclusivement cytoplasmique des protéines. Plusieurs expériences ont été réalisées afin de mieux comprendre la relation complexe qui existe entre ces kinases (**Figure 2**). Ainsi, MK5 favorise indirectement la phosphorylation de la Ser-186/189 de la boucle d'activation de ERK3/4 en recrutant une troisième kinase [18, 19]. Une fois activée ERK3/4 phosphoryle la Thr-182 de la boucle d'activation de MK5 qui vient à son tour phosphoryler ERK3/4 sur des acides aminés non identifiés.

Jusqu'à récemment, l'identité de la kinase responsable de la phosphorylation de la boucle d'activation de ERK3 et ERK4 demeurait inconnue. Deux approches expérimentales indépendantes ont démontré que les PAKs de groupe I exercent cette fonction. En effet, une approche de purification biochimique classique de l'activité kinase de la Ser-186 de ERK3 et l'utilisation de micropuces de protéines visant l'identification de nouveaux substrats de PAK2 ont révélé la relation qui existe entre ces deux familles de kinases [12, 13]. L'expression de mutants constitutivement actifs des GTPases Rac1 et Cdc42 augmente la phosphorylation de la Ser-186/189 de ERK3/4 de manière



dépendante des PAKs et conduit à l'activation de MK5 [12]. Réciproquement, l'inhibition de l'expression des PAKs par interférence à l'ARN ou de leur activité via la surexpression du AID bloque la phosphorylation de la Ser-189 de ERK3 et

son interaction avec MK5. L'identification des PAKs de groupe I comme activateurs de ERK3/4 a révélé l'existence d'une nouvelle voie de signalisation PAK-ERK3/4-MK5.

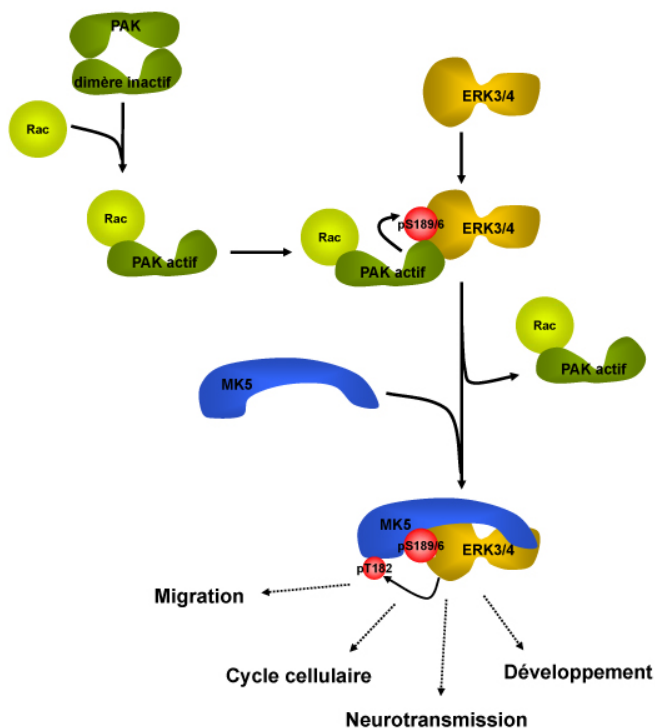


Figure 2

Modèle d'activation de la voie PAK-ERK3/4-MK5.

Les GTPases Rac et Cdc42 interagissent et activent les PAKs de groupe I qui peuvent alors phosphoryler ERK3 et ERK4 respectivement sur la Ser189 et Ser186 dans leur boucle d'activation. ERK3/ERK4 ainsi phosphorylées présentent une plus grande affinité pour MK5. MK5 est à son tour phosphorylée sur sa boucle d'activation (Thr182) par ERK3/ERK4 ce qui conduit à sa pleine activation et conduit à la phosphorylation de substrats potentiels et l'induction de réponses physiologiques.



Fonctions de la voie de signalisation PAK-ERK3/4- MK5

Le défi des prochaines années consiste à élucider les fonctions cellulaires de cette nouvelle voie de signalisation. Néanmoins, à la lumière des différents effets cellulaires décrits à ce jour et des phénotypes observés chez les souris invalidées pour ces kinases, il est possible d'émettre certaines hypothèses. Des rôles dans le développement embryonnaire, la migration, le contrôle du cycle cellulaire et la neurotransmission sont à privilégier.

Rôle dans le développement embryonnaire

Tous les gènes des PAKs de groupe I ont fait l'objet d'une délétion génique chez la souris, résultant en divers phénotypes selon l'isoforme inactivée. Ainsi, les souris *Pak1*^{-/-} sont viables et fertiles mais présentent une réponse immune altérée [24]. Par contre, la délétion génique de *Pak2* engendre la létalité embryonnaire autour du jour E8 [25]. Les souris *Pak3*^{-/-} présentent une plasticité synaptique altérée et des problèmes de

cognition, cohérents avec le fait que PAK3 est principalement exprimée dans le cerveau et qu'il s'agit d'un gène muté dans certaines formes de retard mental lié au chromosome X [26].

Les souris *Erk3*^{-/-} présentent un retard de croissance intra-utérin, une hypoplasie pulmonaire et meurent dans les 24 heures suivant la naissance [27]. L'absence de ERK3 entraîne un défaut de différenciation des pneumocytes de type II, cellules qui produisent le surfactant. De plus, on retrouve moins d'IGF2, un facteur de croissance important lors du développement, dans le sérum des embryons *Erk3*^{-/-}. Ces résultats révèlent que ERK3 est important pour la croissance fœtale et le développement pulmonaire. L'inactivation génique de *Erk4* génère un phénotype bien différent de celle de *Erk3*. Les souris *Erk4*^{-/-} sont viables, fertiles et ne présentent aucun défaut morphologique des organes. La perte de fonction de ERK4 dans les souris *Erk3*^{-/-} n'accentue pas les différents phénotypes attribués à l'inactivation de ERK3, démontrant des rôles physiologiques spécifiques et non redondants pour ces deux MAP kinases [28].



Les souris *Mk5^{-/-}* obtenues dans un fond génétique mixte sont viables, fertiles et ne présentent aucun défaut apparent [29]. Cependant, dans un fond génétique pur C57BL/6, une fraction des embryons *Mk5^{-/-}* meurt aux environs du jour E11, stade de développement où l'expression de ERK3 est la plus élevée, et les embryons qui se développent jusqu'à la naissance ont une taille plus petite [22]. Les causes de ces différences de phénotypes et de la pénétrance partielle du phénotype associé au fond génétique pur demeurent inconnues.

L'hétérogénéité des phénotypes liés à la délétion des divers membres de la voie PAK-ERK3/4-MK5 ne permet pas d'identifier clairement une fonction physiologique commune à cette cascade de protéines kinases. On peut néanmoins constater que l'invalidation des gènes *Pak2*, *Erk3* et *Mk5* entraîne un phénotype de létalité à différents stades. Il est possible que tous ces gènes partagent une fonction commune lors du développement et que la sévérité du phénotype dépende de leur position dans la cascade enzymatique. Ainsi, la perte de fonction de PAK2 (létalité au jour E8) [25], le régulateur le plus en amont, serait plus lourde de conséquences que celle de ERK3 (létalité au jour P1) [27] ou MK5 (viable dans

un fond génétique mixte; létalité avec pénétrance incomplète dans un fond C57BL/6 pur) [22, 29] qui agissent en aval.

Rôle dans le contrôle du cycle cellulaire

Les PAKs sont associées à la régulation du cycle cellulaire et de la survie. PAK1 pourrait jouer un rôle dans la progression des cellules en G1 en phosphorylant de manière adhésion-dépendante MEK1 [4]. De plus, l'activation du facteur transcriptionnel NF-kappa B par PAK1 stimule l'expression de la cycline D1 dans certaines cellules. Plusieurs études ont aussi impliqué PAK1 dans la régulation de la mitose. Tout d'abord, PAK1 dont l'activité enzymatique atteint un maximum durant la mitose est phosphorylée sur la Thr-212 par la kinase cycline B-CDK1 [30]. Cette phosphorylation ne modifie pas son activité, mais plutôt son affinité pour ses partenaires mitotiques. PAK1 phosphoryle la Ser-10 de l'histone H3 et pourrait donc jouer un rôle dans la condensation des chromosomes [31]. D'autres travaux ont également proposé que PAK1 phosphoryle et régule l'activité des kinases mitotiques Aurora A et Plk1 [32]. La surexpression de formes actives de PAK1 entraîne un nombre



anormal de centrosomes et une désorganisation du fuseau mitotique conduisant à l'aneuploïdie.

Plusieurs évidences suggèrent que ERK3 pourrait exercer des fonctions dans le contrôle du cycle cellulaire. Tout d'abord, il a été montré que la surexpression de ERK3 inhibe la prolifération de différents types cellulaires [17, 33]. Ensuite, ERK3 interagit, via son domaine C-terminal, avec la cycline D3 et les phosphatases Cdc14A et B [34-36]. L'interaction entre Cdc14A et ERK3 a pour effet de co-localiser ERK3 au centrosome avec Cdc14A. L'impact fonctionnel de la formation de ces complexes demeure toutefois inconnu. Nous avons également démontré que ERK3 est phosphorylée lors de la mitose par la cycline B-CDK1 sur quatre résidus C-terminaux [35]. Cette phosphorylation a pour effet d'augmenter la demi-vie de ERK3 en mitose. Lors de la transition M-G1, Cdc14A et Cdc14B déphosphorylent ERK3, ce qui augmente la vitesse de dégradation de la protéine.

De son côté, MK5 a récemment été décrite comme un suppresseur de tumeurs. En effet, chez des souris *Mk5*^{-/-} on observe un plus grand nombre de papillomes cutanés induits par un carcinogène que chez les

souris sauvages [37]. En absence de MK5, les cellules de la peau ont une moins grande capacité à induire un programme de sénescence. Ces auteurs ont proposé que MK5 était requise pour la sénescence induite par Ras en phosphorylant et activant p53. Récemment, il a été décrit que la phosphorylation du facteur de transcription FoxO3a par MK5 entraîne une inhibition de la traduction de Myc par l'intermédiaire des microARNs miR-34b/c et que Myc, à son tour, stimule la transcription du gène MK5, établissant ainsi une boucle de rétroaction négative [38]. Cette boucle de régulation est perturbée dans les tumeurs colorectales

Rôle dans la neurotransmission

Les PAKs de groupe I sont toutes trois exprimées dans le cerveau et jouent un rôle crucial dans la physiologie neuronale [39]. Elles sont notamment engagées dans les mécanismes de différenciation, de polarité et de migration neuronale ainsi que dans la guidance axonale, la formation de neurites et la plasticité synaptique. Les PAKs ont été impliquées dans plusieurs maladies neurodégénératives et retards mentaux. ERK4 est préférentiellement exprimée dans le cerveau [28] où l'on détecte aussi



l'expression de ERK3 dans des structures cérébrales spécifiques distinctes [27]. Notamment, les souris déficientes en ERK4 montrent un comportement de type dépressif dans le test de la nage forcée [28]. Les souris *Erk3*^{-/-} néonatales présentent divers phénotypes neuromusculaires, tels que lésion de la main tombante, difficulté de coordination des mouvements, diminution des réflexes et réflexe de tétée compromis [27]. Par ailleurs, l'étude de souris transgéniques exprimant un mutant constitutivement actif de MK5 a révélé que cette kinase joue un rôle dans l'anxiété et dans l'activité locomotrice des souris [40]. Pour l'instant, il est difficile d'associer ce phénotype à l'activation par ERK3 ou ERK4 car les souris *Erk4*^{-/-} mâles ou femelles ne sont pas moins anxieuses que les souris contrôles et ne présentent aucun problème de locomotion [28]. Plus récemment, une étude a montré que les souris déficientes pour *Mk5* présentent des défauts de formation des épines dendritiques au niveau des neurones de l'hippocampe [41]. De manière intéressante, les auteurs ont mis en évidence que ERK3 et MK5 forment un complexe ternaire avec la septine 7, un régulateur du développement des dendrites. Cette interaction permet la phosphorylation des protéines Borgs1-3 (*Binders of Rho*

GTPases), qui agissent comme régulateurs de l'assemblage des filaments de septines. De plus, MK5 interagit avec et phosphoryle la Kalirine-7, un facteur d'échange de nucléotides guanyliques, impliqué dans la plasticité neuronale. Cette activation du module ERK3-MK5 contribuerait à la formation d'épines dendritiques et à la morphogénèse neuronale. L'ensemble de ces données, et tout particulièrement ces derniers travaux, suggère une participation de la voie Rac/Cdc42-PAK-ERK3-MK5 dans les mécanismes de différenciation neuronale, dans le développement du système nerveux et la régulation de la neurotransmission.

Rôle dans la migration cellulaire et l'invasion

La famille PAK est considérée comme un régulateur majeur de la dynamique du cytosquelette et de la migration cellulaire, agissant en aval des GTPases Rac et Cdc42 [2]. Les études ont montré qu'elles contrôlent, selon le contexte cellulaire, la formation des lamellipodes et des filipodes, la perte des points d'adhésions focaux et le désassemblage des fibres de stress [4]. Par conséquent, les PAKs sont intégrées dans



des réseaux de signalisation régulant la migration et l'invasion cellulaire dans des processus physiologiques et pathologiques. Ces réorganisations du cytosquelette et de la membrane, imputables aux PAKs, résultent de la phosphorylation d'une douzaine de substrats, dont les kinases MLCK et LIMK. Toutefois, il y a fort à parier que cette liste soit incomplète et que plusieurs autres substrats restent à identifier.

La voie PAK-ERK3/4-MK5 semble être impliquée dans la réorganisation du cytosquelette, la migration et l'invasion cellulaire. Ainsi, il a été proposé que l'activation de MK5 dans certaines conditions, dont une hausse de l'AMPc intracellulaire, entraîne la phosphorylation de la protéine Hsp27, un régulateur de la polymérisation des filaments d'actine [42]. La séquestration de MK5 par la protéine 14-3-3e inhibe la phosphorylation de Hsp27 et la migration cellulaire induite par MK5. Dans un modèle d'angiogenèse tumorale, MK5

stimule la migration des cellules endothéliales suite à une stimulation au VEGF (*vascular endothelial growth factor*), une fonction qui semble être dépendante de la MAP kinase p38, mais indépendante de ERK3/4 [43]. En revanche, une autre étude rapporte que la protéine IGF2BP1 favorise la migration cellulaire en inhibant la traduction de l'ARNm de ERK4, ce qui prévient l'activation de MK5 [44]. Enfin, il a récemment été proposé que ERK3, suite à son activation par les PAKs, interagit avec et phosphoryle le coactivateur transcriptionnel SRC-3 [45]. La phosphorylation de la Ser-857 permet l'interaction de SRC-3 avec le facteur de transcription PEA3, entraînant une augmentation des niveaux de MMPs (*matrix metalloproteinases*). Ces résultats suggèrent un rôle de ERK3 dans la promotion de l'activité invasive des cellules pulmonaires cancéreuses. Des travaux supplémentaires sont toutefois requis afin de définir la contribution précise de MK5 dans ces réponses cellulaires.



Conclusion

L'adaptation d'une cellule à son environnement est conditionnée par les voies de signalisation utilisables par cette cellule pour intégrer les différents signaux environnementaux et les traduire en réponse physiologique appropriée. La caractérisation de ces voies de signalisation est nécessaire pour bien comprendre le fonctionnement cellulaire normal et pathologique. Nous décrivons ici la convergence de plusieurs acteurs en une nouvelle voie de signalisation recrutant les PAKs de groupe I, les MAP kinases atypiques ERK3 et ERK4 et la MAPKAP kinase MK5. Des travaux récents suggèrent que cette cascade de protéines kinases est

impliquée dans la régulation de nombreuses réponses physiologiques et pathologiques, incluant la différenciation neuronale et la progression tumorale.

Conflit d'intérêts

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

Remerciements

Les travaux réalisés par les auteurs ont été soutenus par un financement des Instituts de recherche en santé du Canada.



Références

1. Manser E, Leung T, Salihuddin H, *et al.* A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* 1994 ; 367 : 40-6.
2. Sells MA, Chernoff J. Emerging from the Pak: the p21-activated protein kinase family. *Trends in cell biology* 1997 ; 7 : 162-7.
3. Eswaran J, Soundararajan M, Kumar R, Knapp S. UnPAKing the class differences among p21-activated kinases. *Trends Biochem Sci* 2008 ; 33 : 394-403.
4. Bokoch GM. Biology of the p21-activated kinases. *Ann Rev Biochem* 2003 ; 72 : 743-81.
5. Zhao ZS, Manser E. PAK and other Rho-associated kinases--effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem J* 2005 ; 386 : 201-14.
6. Zeniou-Meyer M, Borg JP, Vitale N. Le complexe GIT-PIX : Une plate-forme de régulation des GTPases ARF et Rac/Cdc42. *Medecine sciences : M/S* 2005 ; 21 : 849-53.
7. Rudel T, Bokoch GM. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 1997 ; 276 : 1571-4.
8. Fischer U, Stroh C, Schulze-Osthoff K. Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10. *Oncogene* 2006 ; 25 : 152-9.
9. Jaffer ZM, Chernoff J. p21-activated kinases: three more join the Pak. *Int J Biochem Cell Biol* 2002 ; 34 : 713-7.
10. Slack-Davis JK, Eblen ST, Zecevic M, *et al.* PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation. *J Cell Biol* 2003 ; 162 : 281-91.
11. Coles LC, Shaw PE. PAK1 primes MEK1 for phosphorylation by Raf-1 kinase during cross-cascade activation of the ERK pathway. *Oncogene* 2002 ; 21 : 2236-44.
12. Deleris P, Trost M, Topisirovic I, *et al.* Activation loop phosphorylation of ERK3/ERK4 by group I p21-activated kinases (PAKs) defines a novel PAK-ERK3/4-MAPK-activated protein kinase 5 signaling pathway. *J Biol Chem* 2011 ; 286 : 6470-8.
13. De la Mota-Peynado A, Chernoff J, Beeser A. Identification of the atypical MAPK Erk3 as a novel substrate for p21-activated kinase (Pak) activity. *J Biol Chem* 2011 ; 286 : 13603-11.
14. Coulombe P, Meloche S. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* 2007 ; 1773 : 1376-87.
15. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, *et al.* ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 1991 ; 65 : 663-75.
16. Gonzalez FA, Raden DL, Rigby MR, Davis RJ. Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS Lett* 1992 ; 304 : 170-8.
17. Coulombe P, Rodier G, Pelletier S, *et al.* Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol Cell Biol* 2003 ; 23 : 4542-58.
18. Deleris P, Rousseau J, Coulombe P, *et al.* Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 is required for binding, activation and cytoplasmic relocalization of MK5. *J Cell Physiol* 2008 ; 217 : 778-88.
19. Perander M, Aberg E, Johansen B, *et al.* The Ser(186) phospho-acceptor site within ERK4 is essential for its ability to interact with and activate PRAK/MK5. *Biochem J* 2008 ; 411 : 613-22.



20. Seternes OM, Mikalsen T, Johansen B, *et al.* Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *The EMBO J* 2004; 23: 4780-91.
21. Aberg E, Perander M, Johansen B, *et al.* Regulation of MAPK-activated protein kinase 5 activity and subcellular localization by the atypical MAPK ERK4/MAPK4. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 35499-510.
22. Schumacher S, Laass K, Kant S, *et al.* Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *EMBO J* 2004 ; 23 : 4770-9.
23. Kant S, Schumacher S, Singh MK, *et al.* Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 35511-9.
24. Allen JD, Jaffer ZM, Park SJ, *et al.* p21-activated kinase regulates mast cell degranulation via effects on calcium mobilization and cytoskeletal dynamics. *Blood* 2009 ; 113 : 2695-705.
25. Marlin JW, Chang YW, Ober M, *et al.* Functional PAK-2 knockout and replacement with a caspase cleavage-deficient mutant in mice reveals differential requirements of full-length PAK-2 and caspase-activated PAK-2p34. *Mammalian Gen* 2011 ; 22 : 306-17.
26. Meng J, Meng Y, Hanna A, *et al.* Abnormal long-lasting synaptic plasticity and cognition in mice lacking the mental retardation gene Pak3. *J Neurosci* 2005 ; 25 : 6641-50.
27. Klinger S, Turgeon B, Levesque K, *et al.* Loss of Erk3 function in mice leads to intrauterine growth restriction, pulmonary immaturity, and neonatal lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 16710-5.
28. Rousseau J, Klinger S, Rachalski A, *et al.* Targeted Inactivation of Mapk4 in Mice Reveals Specific Non-Redundant Functions of Erk3/Erk4 Subfamily MAP Kinases. *Mol Cell Biol* 2010 ; 30 : 5752-63.
29. Shi Y, Kotlyarov A, Laabeta K, *et al.* Elimination of protein kinase MK5/PRAK activity by targeted homologous recombination. *Mol Cell Biol* 2003 ; 23 : 7732-41.
30. Banerjee M, Worth D, Prowse DM, Nikolic M. Pak1 phosphorylation on t212 affects microtubules in cells undergoing mitosis. *Current Biol* 2002 ; 12 : 1233-9.
31. Li F, Adam L, Vadlamudi RK, *et al.* p21-activated kinase 1 interacts with and phosphorylates histone H3 in breast cancer cells. *EMBO reports* 2002 ; 3 : 767-73.
32. Dummer B, Ohshiro K, Kumar R, Field J. Pak protein kinases and their role in cancer. *Cancer Metast Rev* 2009 ; 28 : 51-63.
33. Crowe DL. Induction of p97MAPK expression regulates collagen mediated inhibition of proliferation and migration in human squamous cell carcinoma lines. *Int J Oncol* 2004 ; 24 : 1159-63.
34. Sun M, Wei Y, Yao L, *et al.* Identification of extracellular signal-regulated kinase 3 as a new interaction partner of cyclin D3. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340: 209-14.
35. Tanguay PL, Rodier G, Meloche S. C-terminal domain phosphorylation of ERK3 controlled by Cdk1 and Cdc14 regulates its stability in mitosis. *Biochem J* 2010 ; 428 : 103-11.
36. Hansen CA, Bartek J, Jensen S. A functional link between the human cell cycle-regulatory phosphatase Cdc14A and the atypical mitogen-activated kinase Erk3. *Cell Cycle* 2008 ; 7 : 325-34.
37. Sun P, Yoshizuka N, New L, *et al.* PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell* 2007 ; 128 : 295-308.
38. Kress TR, Cannell IG, Brenkman AB, *et al.* The MK5/PRAK kinase and Myc form a negative feedback loop that is disrupted during colorectal tumorigenesis. *Mol cell* 2011 ; 41 : 445-57.



39. Kreis P, Barnier JV. PAK signalling in neuronal physiology. *Cell Signal* 2009 ; 21 : 384-93.
40. Gerits N, Van Belle W, Moens U. Transgenic mice expressing constitutive active MAPKAPK5 display gender-dependent differences in exploration and activity. *Behav Brain Funct* 2007 ; 3 : 58.
41. Brand F, Schumacher S, Kant S, *et al.* The ERK3 (MAPK6) - MAPKAP kinase 5 signalling complex regulates septin function and dendrite morphology. *Mol Cell Biol* 2012: sous presse.
42. Kostenko S, Moens U. Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cell Mol Life Sci* 2009 ; 66 : 3289-307.
43. Yoshizuka N, Chen RM, Xu Z, *et al.* A novel function of p38-regulated/activated kinase in endothelial cell migration and tumor angiogenesis. *Mol Cell Biol* 2012 ; 32 : 606-18.
44. Stohr N, Kohn M, Lederer M, *et al.* IGF2BP1 promotes cell migration by regulating MK5 and PTEN signaling. *Genes Dev* 2012 ; 26 : 176-89.
45. Long W, Foulds CE, Qin J, *et al.* ERK3 signals through SRC-3 coactivator to promote human lung cancer cell invasion. *J Clin Invest* 2012 ; 122 : 1869-80.