

# MSA

Médecine  
Sciences  
Amérique



Revue francophone d'information en sciences de la santé

**Numéro**  
**Carrefour Biotransfert 2011**

Recherche et développement en sciences de  
la vie- Biotechnologies

**Vol.1 n°2**

**LE CARREFOUR**  
**BIOTRANSFERT**



## Table des matières

<b>Nouvelle</b>	<b>Page</b>
Nouvelle méthode de purification d'ARN par affinité avec l'étiquette ARiBo <i>Geneviève di Tomasso, Pascale Legault</i>	1
La prohibitine : un nouveau bio-marqueur sanguin pour le diagnostic précoce de l'arthrose <i>Jean-François Lavoie, Cynthia Picard, Alain Moreau</i>	8
Moduler la diversification des anticorps pour combattre certaines maladies <i>Alexandre Orthwein, Javier di Noia</i>	15
La médecine personnalisée grâce aux signatures d'expression génique : l'exemple du cancer du sein <i>Laurent Sansregret, Alain Nepveu</i>	24



### *Introduction au Carrefour BioTransfert*

Le Carrefour BioTransfert, événement annuel, propose une sélection des meilleures avancées dans le domaine des biotechnologies et des progrès thérapeutiques en santé humaine.

Chaque année, plusieurs universités et organismes canadiens oeuvrant en recherche et développement en sciences de la vie présentent une sélection de leurs meilleures technologies aux différents partenaires industriels susceptibles de devenir de potentiels récepteurs pour ces technologies.

En 2011, trois grands groupes étaient présents : le Conseil national de recherches du Canada, représenté par son Institut de recherche en biotechnologie (IRB-CNRC) et son Institut des sciences biologiques (ISB-CNRC), l'Université McGill et Univalor de l'Université de Montréal.

Tel qu'il est mentionné sur le site internet du Carrefour BioTransfert (<http://www.biotransfer.ca/>), les technologies présentées ciblent les domaines suivants :

- Nouveaux composés biopharmaceutiques et pharmaceutiques: cancer, système cardiovasculaire, maladies infectieuses et allergies,
- Nouveaux vaccins et adjuvants,
- Biomarqueurs pour applications diagnostiques et théranostiques,
- Plateformes de technologies pour la découverte, le développement et la production de produits thérapeutiques : expression de protéines et administration de médicaments,

Médecine Sciences Amérique était présent au Carrefour BioTransfert 2011 et offre dans ce numéro une sélection des meilleures présentations.

Image de couverture :

L'image de couverture nous a été fournie par le Carrefour BioTransfert.



**Nouvelle**

## **Nouvelle méthode de purification d'ARN par affinité avec l'étiquette ARiBo**

**Novel affinity purification method for RNA using the ARiBo tag**

**Geneviève Di Tomasso et Pascale Legault**

Département de biochimie, Université de Montréal  
C.P. 6128 – Succursale Centre-ville, Montréal (Québec) H3C 3J7  
Téléphone : 514-343-7326, Télécopie : 514-343-2210  
Courriel : [pascale.legault@umontreal.ca](mailto:pascale.legault@umontreal.ca)

**Article reçu le : 1<sup>er</sup> août 2011**  
**Article accepté le : 25 novembre 2011**



Plusieurs ARN non codants sont maintenant reconnus pour jouer des rôles considérables dans le contrôle de l'expression génétique. Parmi ceux-ci, les microARN associés à la régulation de la traduction se révèlent très importants dans le développement humain et leur dysfonctionnement est associé à diverses maladies. Conséquemment, plusieurs laboratoires de recherche s'intéressent à la caractérisation biochimique et structurale de ces ARN. Les ARN sont généralement synthétisés *in vitro* avec la polymérase à ARN du bactériophage T7. Cette enzyme génère, outre le transcrit désiré, des transcrits abortifs et parfois même des produits de plus grandes tailles [1]. L'ARN désiré doit être purifié et cela se fait généralement par migration sur gel de polyacrylamide dénaturant, une méthode qui présente plusieurs inconvénients, particulièrement lorsque plusieurs mg d'ARN doivent être purifiés [2, 3]. La grande taille des gels et le nombre de gels nécessaires rendent le

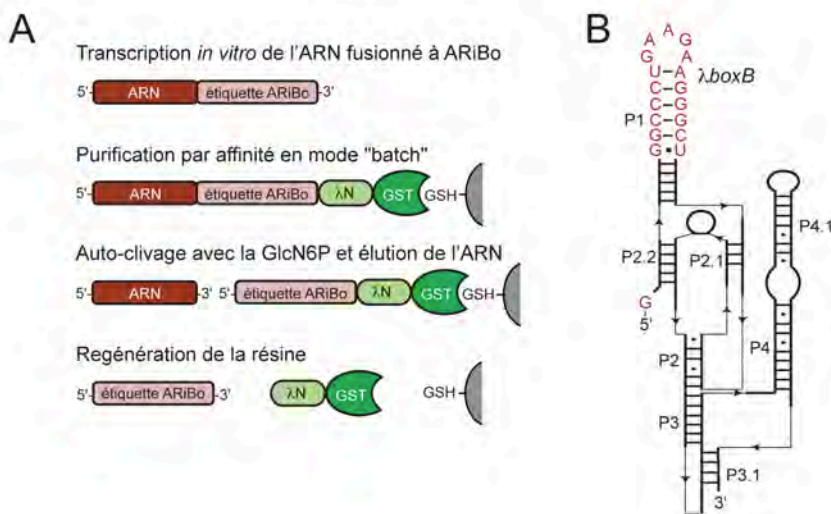
processus très ardu, ce qui peut demander plusieurs jours, voire plusieurs semaines de travail. De plus, les gels de polyacrylamide en présence d'urée dénaturent systématiquement l'ARN, et cela peut nuire à la caractérisation biochimique et structurale de la forme biologiquement active [2]. Une étape de purification additionnelle est également indispensable pour décontaminer les échantillons d'ARN des oligomères d'acrylamide. Étant donné ces désavantages, plusieurs méthodes alternatives ont récemment été développées pour purifier l'ARN plus rapidement, et ce, dans des conditions non dénaturantes. La purification par affinité représente une alternative très prometteuse [4-8] puisqu'elle offre une rapidité exceptionnelle et est facilement adaptable aux applications à haut débit. Nous avons donc développé une nouvelle méthode de purification d'ARN par affinité en vue de rendre le processus de purification plus rapide et performant [8].



### Stratégie de purification d'ARN par affinité avec l'étiquette ARiBo

Un schéma de la purification par affinité avec étiquette ARiBo est présenté à la **Figure 1A** [8]. L'ARN d'intérêt est premièrement transcrit avec une étiquette ARiBo à son extrémité 3' (**Figure 1B**). Une

fois synthétisé, l'ARN de fusion est lié à une protéine de fusion GST/ $\lambda$ N et le complexe résultant est capturé sur résine GSH-Sépharose. À la suite de plusieurs lavages pour enlever les impuretés, l'ARN est élué avec de la glucosamine-6-phosphate. Au besoin, la résine peut être régénérée pour usages subséquents.



**Figures 1 A et B**

**A.** Schéma représentant la stratégie de la méthode (voir texte).

**B.** L'étiquette ARiBo1 contient la séquence du ribozyme *glmS* de *Bacillus anthracis* sauf pour une substitution de sa tige P1 par l'ARN *boxB* du bactériophage  $\lambda$ .

L'appellation ARiBo provient de l'anglais et signifie **Activatable Ribozyme and BoxB RNA**. La séquence de l'étiquette ARiBo est dérivée du ribozyme *glmS* de *Bacillus anthracis*, un ribozyme qui s'autocleave rapidement et efficacement en amont du résidu guanine à son extrémité 5'. Ce clivage est strictement dépendant d'un petit métabolite, la glucosamine-6-phosphate.

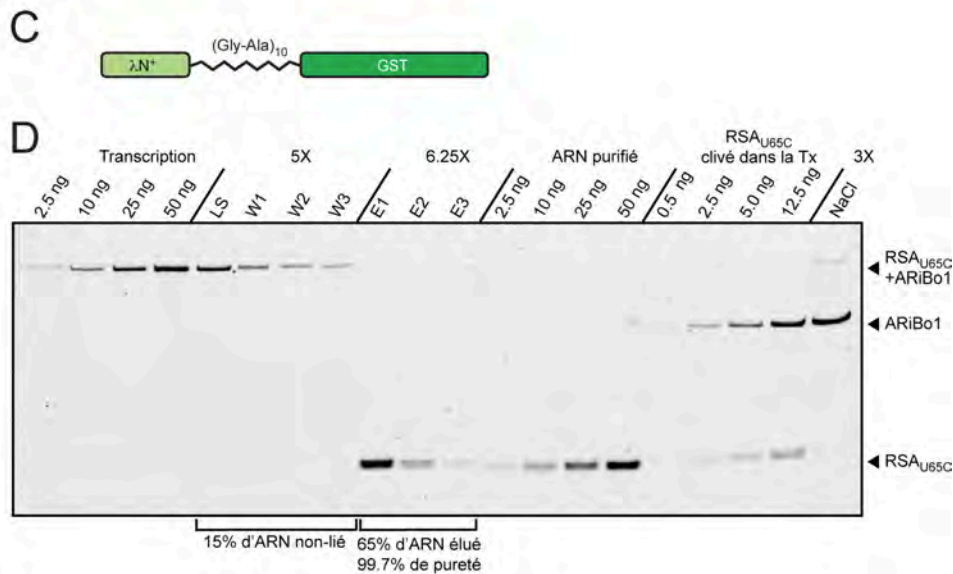
Nous avons incorporé l'ARN *boxB* du bactériophage lambda dans la tige-boucle variable P1 du ribozyme *glmS*. Cet ARN forme une interaction de haute affinité avec un peptide  $\lambda$ N de type sauvage ( $K_D \sim 2-20$  nM) et d'une encore plus haute affinité avec un mutant du peptide  $\lambda$ N ( $\lambda N^+$ ;  $K_D \sim 10$  pM) [9].



*Maximiser le rendement et la pureté  
de l'ARN purifié*

Parmi les procédures de purification d'ARN par affinité rapportées, jusqu'à maintenant, seule notre méthode avec étiquette ARiBo a été développée pour maximiser le rendement de l'ARN et sa pureté [8]. Pour se faire, nous avons préparé et testé plusieurs protéines de fusion GST/ $\lambda$ N. Ces protéines de fusion diffèrent principalement par la position du peptide  $\lambda$ N, soit à l'extrémité carboxyle ou amine de la protéine GST, et par la séquence du peptide N, soit le type sauvage ( $\lambda$ N) ou le variant de haute affinité ( $\lambda$ N<sup>+</sup>). Parmi toutes les protéines testées, celle qui offre les

meilleurs résultats en terme de rendement et de pureté est la protéine  $\lambda$ N<sup>+</sup>-L<sup>+</sup>-GST (**Figure 1C**), une fusion du peptide  $\lambda$ N de haute affinité ( $\lambda$ N<sup>+</sup>) à l'extrémité amine de la protéine GST via un *linker* de 20 acides aminés. Nos analyses par gel d'électrophorèse démontrent qu'avec cette protéine de fusion, il y a 15% ou moins de perte d'ARN de fusion au cours des étapes de lavage. Mais, plus important encore, l'ARN désiré est obtenu avec un bon rendement et une pureté exceptionnelle, puisque 65% de l'ARN transcrit est élué sous forme libre avec plus de 99% de pureté (**Figure 1D**). D'aussi bons résultats n'ont jamais été rapportés auparavant pour la purification d'ARN par affinité.



Figures 1 C et D

**C.** Diagramme de la protéine de fusion  $\lambda N^+L^-$ -GST, qui contient le peptide N du bactériophage  $\lambda$  modifié pour lier l'ARN *boxB* avec une haute affinité ( $\lambda N^+$ ) fusionné à l'extrémité amine de la protéine GST via le *linker* (Gly-Ala)<sub>10</sub>.

**D.** Gel typique de purification par affinité d'un mutant du riborégulateur à adénine de *Bacillus subtilis* (RSA<sub>U65C</sub>; [8]). Des échantillons de chaque étape de purification ont été chargés sur le gel de polyacrylamide, incluant les étapes de lavage (LS, W1, W2 et W3), les étapes d'éluion

(E1, E2 et E3) et l'étape de régénération de la résine (NaCl). Les échantillons 1X correspondent à 50 ng de l'ARN de fusion RSA<sub>U65C</sub>-ARiBo1 présent dans la transcription ou à 16 ng de RSA<sub>U65C</sub> à être purifié. De plus, des quantités connues de la réaction de transcription, d'ARN purifié et d'une réaction de transcription traitée avec la GlcN6P (RSA<sub>U65C</sub> clivé dans la Tx) ont été chargées à titre de contrôle pour l'analyse quantitative de la méthode

### Avantages de la nouvelle méthode

La nouvelle méthode de purification par affinité avec étiquette ARiBo présente de multiples avantages. Par comparaison avec la méthode traditionnelle de purification par

gels, elle peut être réalisée beaucoup plus rapidement, surtout pour la purification de grandes quantités d'ARN. Par exemple, pour purifier 10 mg d'ARN, 2 à 3 semaines sont habituellement requises avec la méthode par gels, tandis qu'il ne faut que



3 heures pour la purification par affinité. De plus, un échantillon d'ARN d'une très grande pureté peut être obtenu sous forme native avec des rendements comparables à la méthode par gels. Pour obtenir de tels rendements, il est nécessaire d'utiliser un excès molaire de protéine de fusion de 5 fois la quantité d'ARN à purifier et donc de préparer au préalable des quantités suffisantes de cette protéine.

La purification par affinité a été démontrée en mode *batch*, c'est-à-dire en incubant l'ARN, la protéine de fusion  $\lambda$ N<sup>+</sup>-L<sup>+</sup>-GST et la résine GSH-Sépharose dans un récipient au lieu d'utiliser une colonne, et cela présente plusieurs avantages en terme d'adaptabilité. Par exemple, ce mode de purification permet l'incorporation de procédures enzymatiques et peut être adapté aux applications à haut débit. De plus, l'utilisation de la GSH-Sépharose, une des résines d'affinité les moins chères et les plus versatiles sur le marché, peut être adaptée aux méthodologies connexes, tel que les résines magnétisables, les plaques de 96 puits et les colonnes de centrifugation.

### *Applications potentielles : un avenir prometteur*

La méthode de purification par affinité avec étiquette ARiBo a été réalisée avec succès dans notre laboratoire pour la purification de quelques  $\mu$ g à plusieurs mg d'ARN et ce pour divers types d'ARN, tels de petits ARN en tige-boucle, des riborégulateurs, des ribozymes et des précurseurs de micro ARN. Nous envisageons un avenir prometteur pour cette nouvelle méthodologie pour la purification d'ARN synthétisé *in vitro* ou pour toute autre application potentielle qui nécessite l'immobilisation ou la purification d'ARN. Par exemple, la méthodologie pourrait être adaptée à certaines applications à haut débit comme le criblage d'ARN pour la cristallogénèse ainsi qu'à la purification de complexes ARN/protéines à partir de cellules vivantes.

### *Remerciements*

Ce travail a été financé par les Instituts de recherche en santé du Canada (MOP-64341 et MOP-86502). Pascale Legault détient une Chaire de recherche du Canada en biologie structurale et ingénierie de l'ARN.



## Références

1. Milligan JF, Groebe DR, Witherell GW, Uhlenbeck OC. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 8783-98.
2. Uhlenbeck OC. Keeping RNA happy. *RNA* 1995; 1: 4-6.
3. Lukavsky PJ, Puglisi JD. Large-scale preparation and purification of polyacrylamide-free RNA oligonucleotides. *RNA* 2004; 10: 889-93.
4. Cheong HK, Hwang E, Lee C, Choi BS, Cheong C. Rapid preparation of RNA samples for NMR spectroscopy and X-ray crystallography. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: e84.
5. Kieft JS, Batey RT. A general method for rapid and nondenaturing purification of RNAs. *RNA* 2004; 10: 988-95.
6. Batey RT, Kieft JS. Improved native affinity purification of RNA. *RNA* 2007; 13: 1384-9.
7. Pereira MJ, Behera V, Walter NG. Nondenaturing purification of co-transcriptionally folded RNA avoids common folding heterogeneity. *Plos One* 2010; 5: e12953.
8. Di Tomasso G, Lampron P, Dagenais P, Omichinski JG, Legault P. The ARiBo tag: a reliable tool for affinity purification of RNAs under native conditions. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: e18.
9. Austin RJ, Xia T, Ren J, Takahashi TT, Roberts RW. Designed arginine-rich RNA-binding peptides with picomolar affinity. *J Am Chem Soc* 2002; 124: 10966-7.



**Nouvelle**

## **La prohibitine : un nouveau bio-marqueur sanguin pour le diagnostic de l'arthrose**

**Prohibitin: Novel blood-based biomarker for the diagnosis of osteoarthritis**

**Jean-François Lavoie<sup>1,3</sup>, Cynthia Picard<sup>1,3</sup>, Alain Moreau<sup>1,2,3</sup>.**

1. Laboratoire Viscogliosi en génétique moléculaire des maladies musculo-squelettiques, Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Montréal;
2. Département de stomatologie, Faculté de médecine dentaire, Université de Montréal;
3. Département de biochimie, Faculté de médecine, Université de Montréal.

### Correspondance

Prof. Alain Moreau, directeur

Laboratoire Viscogliosi en génétique moléculaire des maladies musculo-squelettiques

Centre de recherche du CHU Sainte-Justine

3175, chemin de la Côte-Sainte-Catherine

Montréal (Québec) H3T 1C5 Canada

Courriel : [alain.moreau@umontreal.ca](mailto:alain.moreau@umontreal.ca)

**Article reçu le : 6 août 2011**

**Article accepté le : 30 janvier 2012**



L'arthrose est la maladie articulaire la plus répandue dans le monde, affectant plus de 20 millions de personnes aux États-Unis seulement. De plus, le vieillissement accru des populations et l'augmentation de la prévalence de l'obésité au niveau mondial rendent prévisible une augmentation de ce nombre dans les prochaines années. Chez les personnes souffrant d'arthrose, le cartilage articulaire, qui n'est normalement pas vascularisé, devient minéralisé et vascularisé. Il en résulte une dégradation du cartilage (perte nette de son épaisseur), une réponse inflammatoire et une sclérose de l'os sous-chondral. L'arthrose a ceci de particulier que l'importance des douleurs ressenties n'est pas corrélée avec la sévérité des symptômes anatomiques. Aucun test génétique ou biochimique n'est à ce jour disponible sur le marché pour la détection précoce de l'arthrose, ni même pour l'évaluation des risques de progression et de sévérité à une étape précoce de la maladie. Par conséquent, l'application des traitements est retardée jusqu'à un stade avancé de dégradation du cartilage. La recherche d'un médicament pour le traitement de

l'arthrose est largement freinée par l'incapacité à identifier à un stade précoce les patients qui pourraient bénéficier de traitements. Un grand besoin d'innovation existe donc dans le domaine des tests cliniques afin de pouvoir identifier les individus asymptomatiques. De même, il importe d'identifier, parmi les patients qui en ressentent les symptômes, ceux qui risquent de voir progresser la maladie.

Ce constat d'échec découle du fait que l'arthrose progresse lentement et souvent de façon phasique, ce qui rend difficile l'identification des déterminants moléculaires précoces déclenchant cette maladie. De plus, l'hétérogénéité de la maladie engendre beaucoup de controverses quant à son étiologie et aux mécanismes moléculaires responsables de sa progression. La nature multifactorielle de l'arthrose primaire est bien acceptée et des facteurs génétiques ont maintenant été identifiés comme déterminants importants de l'arthrose [1-6]. Ces études ont également mis en évidence des différences potentielles dans le degré d'héritabilité de l'arthrose, selon le sexe et l'articulation affectée (arthrose de la main vs arthrose du genou ou de



la hanche) [7, 8]. Cette diversité suggère un niveau élevé d'hétérogénéité dans la nature des gènes de susceptibilité pour l'arthrose, comme en témoigne le nombre croissant de loci et de gènes candidats identifiés à ce jour dans l'ensemble du génome humain [2]. Toutefois, l'importance fonctionnelle de chacun des gènes de susceptibilité n'a pas encore été déterminée, illustrant notre connaissance incomplète de la biologie et de la génétique de l'arthrose.

Les marqueurs présentement associés à l'arthrose sont pour la plupart décelables à des stades avancés de la maladie, lorsque les lésions sont dans la grande majorité des cas irréversibles. Ces marqueurs biochimiques sont associés de façon non spécifique à la dégradation du cartilage, à l'hypertrophie des chondrocytes ou tout simplement à l'inflammation. Par conséquent leur utilité clinique s'en trouve fortement limitée. Afin d'identifier des marqueurs plus précoces de l'arthrose, nous avons cherché à identifier des gènes et des protéines régulant l'homéostasie du cartilage. Dans ce contexte, nous avons identifié le facteur de transcription PITX1, dont la

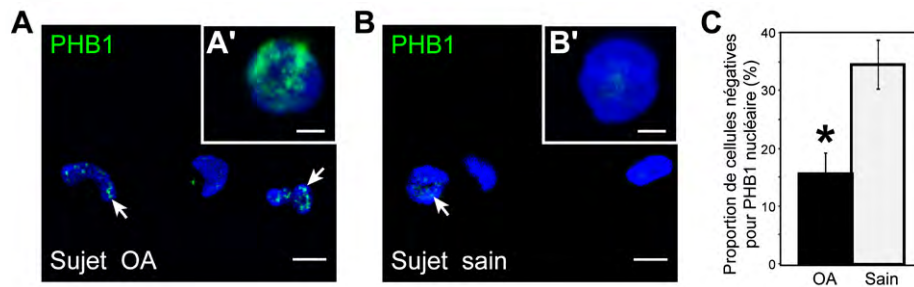
diminution de l'expression entraîne l'apparition de symptômes similaires à ceux de l'arthrose dans un modèle de souris transgénique ayant perdu une copie du gène PITX1 [9]. Au niveau clinique, cette perte d'expression survient également au niveau des chondrocytes articulaires des patients atteints d'arthrose primaire du genou ou de la hanche [9]. Dans le but de déterminer le mécanisme responsable de cette perte d'expression, nous avons identifié par différentes approches expérimentales la prohibitine (PHB1) dans un complexe répresseur présent sur le promoteur du gène PITX1 chez les patients atteints d'arthrose primaire. PHB1 fait partie de la superfamille SPFH (Stomatine, Prohibitine, Flotiline et HflK/C), qui regroupe des protéines membranaires possédant un domaine appelé PHB. Bien que ces protéines soient hautement conservées dans les cellules eucaryotes, la fonction de PHB1 *in vivo* n'est pas claire [10]. PHB1 est principalement présente à la membrane interne des mitochondries, où elle forme des complexes hétéro-oligomères avec la prohibitone (PHB2) et où elle semble jouer un rôle de chaperon moléculaire pour les protéines associées à la chaîne



de transport des électrons. De plus, PHB1 peut aussi se localiser dans le noyau, où elle régule la transcription de plusieurs gènes et inhibe la prolifération cellulaire [10]. Nous avons observé une accumulation de PHB1 nucléaire au niveau des chondrocytes articulaires des patients atteints d'arthrose (43 patients consécutifs atteints d'arthrose ont été analysés lors d'une étude pilote et comparés à 7 sujets témoins âgés n'ayant aucun problème articulaire ou osseux). Cette observation nous a conduits à confirmer le rôle de PHB1 comme répresseur transcriptionnel de PITX1 en sur-exprimant PHB1 dans des cellules normales et par atténuation transcriptionnelle (*gene silencing*) dans les chondrocytes de patients atteints d'arthrose. Puisque PHB1 est une protéine ubiquitaire, nous avons émis l'hypothèse que d'autres types cellulaires plus accessibles, comme les leucocytes, pourraient également subir une accumulation nucléaire de PHB1 chez les patients atteints d'arthrose et les sujets à risque de développer l'arthrose. Grâce à une subvention de démonstration des principes accordée

par les Instituts de recherche en santé du Canada en 2010, le D<sup>r</sup> Moreau et son équipe mènent actuellement des recherches pour déterminer si l'accumulation nucléaire de PHB1 dans les cellules sanguines pourrait servir de bio-marqueur pour prévoir et évaluer l'apparition précoce et l'évolution de l'arthrose. Les tests peuvent être réalisés à partir d'une prise de sang provenant de sujets asymptomatiques ou de patients présentant des symptômes, de concert (ou non) avec l'analyse de l'histoire familiale, de données cliniques ou de signes radiographiques, pour identifier les patients à risque de progression de l'arthrose.

Les résultats obtenus à ce jour par les techniques d'immunodétection, notamment la microscopie confocale, sont fort prometteurs. Ils démontrent que PHB1 s'accumule dans les noyaux des leucocytes (monocytes, lymphocytes et neutrophiles) des patients atteints d'arthrose (13 sujets consécutifs), ce qui contraste avec les niveaux observés chez les sujets sains (7 sujets consécutifs), nettement inférieurs ou sous le seuil de détection (**Figure 1**).



**Figure 1 : Augmentation de la localisation nucléaire de PHB1 dans les noyaux de leucocytes chez les patients atteints d'arthrose**

(A-B) Images confocales montrant le marquage et la localisation de PHB1 dans des sections de noyaux de leucocytes isolés du sang de sujets sains ou diagnostiqués pour l'arthrose par gradient de Ficoll. Une fois les leucocytes (monocytes, lymphocytes et polymorphonucléaires) transférés sur des lames de microscope, la visualisation de la localisation de PHB1 dans les noyaux est faite par immunofluorescence à l'aide de l'anticorps Prohibitin Ab-1 (NeoMarkers, Fremont, CA) qui reconnaît spécifiquement la protéine PHB1. Ces complexes PHB1-anticorps (représentés en vert) sont détectés par immunofluorescence indirecte à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (Alexa-488, Invitrogen, Eugene, OR) et les noyaux sont contre-colorés avec le colorant Hoechst

(représentés en bleu). Les images sont obtenues par microscopie confocale (Zeiss, LSM) en ajustant le plan focal, d'une épaisseur de moins de 1  $\mu$ m, entre le tiers supérieur et le centre du noyau. L'échelle en blanc dans les panneaux A et B correspond à 5  $\mu$ m et dans les panneaux A' et B' à 2  $\mu$ m. Les flèches représentent des exemples de cellules positives pour la présence nucléaire de PHB1.

(C) Quantification de la proportion de leucocytes négatifs pour la présence de PHB1 nucléaire. Pour cette analyse, trois sujets sains et six patients atteints d'arthrose ont été analysés. La barre d'erreur représente l'écart type à la moyenne pour les sujets analysés et l'étoile représente un résultat significatif à  $p = 0.016$  (test de Student bilatéral).

Cependant, il reste à déterminer la sensibilité et la spécificité de PHB1 comme marqueur spécifique de l'arthrose, en vérifiant notamment si elle n'est spécifique qu'à certaines formes d'arthrose (primaire vs secondaire) ou si elle pourrait être impliquée dans d'autres maladies rhumatismales. De plus, nous ne savons pas encore à quel

point l'accumulation nucléaire de PHB1 précède les premiers symptômes cliniques de l'arthrose (mois, années ou décennies). Finalement, l'arthrose est une maladie chronique avec des épisodes symptomatiques et des périodes de rémission qui varient au cours de la maladie. Il reste à déterminer si l'accumulation nucléaire



de PHB1 varie aussi en fonction de ces épisodes.

En résumé, ces résultats montrent pour la première fois la possibilité d'un test sanguin pour le diagnostic précoce de l'arthrose. Ce test pourrait être utilisé pour diagnostiquer plus précocement la maladie et pourrait servir à tester l'efficacité de nouvelles thérapies visant à arrêter ou à moduler la progression de l'arthrose.

Ce projet est financé par une subvention des Instituts de recherche en santé du

### Références

1. Jordan JM, Kraus VB, Hochberg MC. Genetics of osteoarthritis. *Current rheumatology reports* 2004; 6: 7-13.
2. Loughlin J. Genetic epidemiology of primary osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology* 2001; 13: 111-6.
3. Mertens F, Palsson E, Lindstrand A, et al. Evidence of somatic mutations in osteoarthritis. *Human genetics* 1996; 98: 651-6.
4. Peach CA, Carr AJ, Loughlin J. Recent advances in the genetic investigation of osteoarthritis. *Trends in molecular medicine* 2005; 11: 186-91.
5. Spector TD, MacGregor AJ. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis and cartilage/OARS, Osteoarthritis Research Society* 2004; 12 Suppl A: S39-44.
6. Yao JY, Wang Y, An J, et al. Mutation analysis of the Smad3 gene in human osteoarthritis. *European journal of human genetics : EJHG* 2003; 11: 714-7.
7. Jones DL, Cauley JA, Kriska AM, et al. Physical activity and risk of revision total knee arthroplasty in individuals with knee osteoarthritis: a matched case-control study. *The Journal of rheumatology* 2004; 31: 1384-90.
8. Loughlin J. Genetics of osteoarthritis and potential for drug development. Canada (PPP-110826) octroyée au D<sup>r</sup> Moreau. La propriété intellectuelle et la commercialisation des travaux du D<sup>r</sup> Moreau sont soutenues par Gestion UNIVALOR, s.e.c., partenaire commercial de l'Université de Montréal et de ses hôpitaux et centres de recherche affiliés. Des demandes de brevet sont en cours d'examen dans plusieurs pays et le D<sup>r</sup> Moreau et ses collègues ont récemment reçu un avis d'acceptation d'un premier brevet en Europe et pour l'Australie concernant cette technologie.



*Current opinion in pharmacology* 2003;  
3: 295-9.

9. Picard C, Azeddine B, Moldovan F, Martel-Pelletier J, Moreau A. New emerging role of pitx1 transcription factor in osteoarthritis pathogenesis.

*Clinical orthopaedics and related research* 2007; 462: 59-66.

10. Mishra S, Murphy LC, Murphy LJ. The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *Journal of cellular and molecular medicine* 2006; 10: 353-63.



**Nouvelle**

## **Moduler la diversification des anticorps pour combattre certaines maladies**

**How to fight cancer and autoimmune diseases by modulating antibody  
diversification**

**Alexandre Orthwein<sup>1,2</sup> , Javier M Di Noia<sup>1,2</sup>**

1-Institut de recherches cliniques de Montréal

110, av. des Pins Ouest, Montréal (Québec) H2W 1R7 Canada

2-Département de médecine, Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal.

[Alexandre.Orthwein@ircm.qc.ca](mailto:Alexandre.Orthwein@ircm.qc.ca)

[Javier.Di.Noia@ircm.qc.ca](mailto:Javier.Di.Noia@ircm.qc.ca)

**Article reçu le : 01 août 2011**

**Article accepté le : 24 octobre 2011**



Les animaux vertébrés, en particulier les humains, ont une tâche imposante : combattre la diversité presque illimitée de pathogènes et d'antigènes avec un matériel génétique limité. Les lymphocytes B ont développé un mécanisme efficace bien que dangereux de modification de leur patrimoine génétique. D'abord, les gènes codant pour les anticorps sont assemblés par recombinaison VDJ (gènes variable, de diversité et de jonction; *variable, diverse, joining*). Ce processus engage un réarrangement combinatoire de fragments d'ADN pour former des gènes codant pour chaque chaîne des anticorps. Ce réarrangement est unique à chaque lymphocyte B et la recombinaison VDJ crée donc un répertoire primaire d'anticorps, dont certains seront en mesure de reconnaître un

antigène déterminé. Le répertoire primaire d'anticorps compte deux limites : d'abord ces anticorps ne reconnaissent pas un antigène avec une grande affinité, en plus d'être tous du même isotype (IgM), ce qui ne convient pas à toutes les situations. Un second processus de mutagenèse a lieu pour modifier génétiquement le répertoire primaire d'immunoglobulines (Ig) quand des lymphocytes B s'activent après avoir reconnu un antigène. Il conduit d'une part à la commutation isotypique permettant le remplacement de la région constante  $\mu$  des anticorps (laquelle détermine l'isotype IgM) par une autre région constante ( $\gamma$ ,  $\epsilon$  ou  $\alpha$ ) déterminant des isotopes avec des propriétés biologiques et des fonctions effectrices différentes (**Figure 1**; [1]).



### Activation Induced Deaminase (AID)

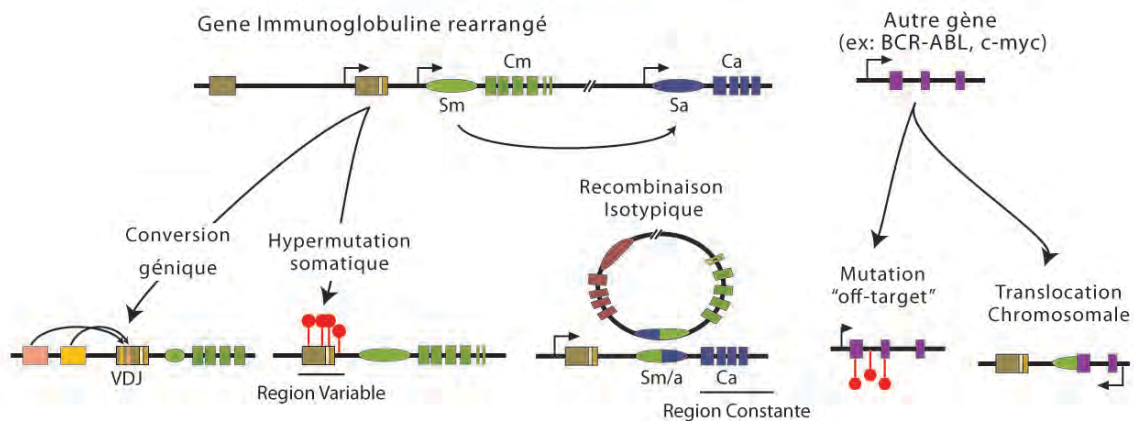


Figure 1

Vue schématisée des différentes modifications génétiques initiées par AID (*activation-induced cytidine deaminase* ou cytidine déaminase induite après activation) des gènes des immunoglobulines et d'autres gènes. AID introduit préférentiellement des mutations dans les gènes immunoglobulines en déaminant des déoxycytidines en déoxyuridines. L'introduction de ces mutations conduit au recrutement de protéines en cause dans la réparation de l'ADN et permet la diversification des gènes immunoglobulines par conversion génique (mécanisme aviaire de diversification des

anticorps), hypermutation somatique (qui consiste en l'introduction de mutations ponctuelles dans la région variable des gènes des immunoglobulines) et commutation de classe (qui conduit à la modification de la chaîne lourde de l'anticorps). AID peut cependant introduire des mutations dans d'autres gènes à un niveau moins important, comme BCR-ABL, ce qui peut conduire à l'apparition de mutations pathologiques (par exemple liées au développement de résistances à l'imatinib, ou encore que déclenchent des translocations des chromosomes).



D'autre part, il permet l'hypermutation somatique consistant en l'introduction de mutations ponctuelles dans la région variable des anticorps (**Figure 1**) et qui, couplée à la sélection clonale, permet une maturation de l'affinité des anticorps pour un antigène donné [2].

La commutation isotypique et l'hypermutation somatique sont initiées par une même enzyme, AID (*activation-induced cytidine deaminase* ou cytidine déaminase induite après activation) [1-3]. Cette enzyme désamine l'ADN des gènes Ig, changeant des déoxycytidines en déoxyuridines [1-2], processus mutagénique en lui-même mais qui n'est que l'étape initiale de ces mécanismes de diversification des anticorps. En l'absence d'AID, la réponse immunitaire chez l'homme et la souris est grandement compromise et conduit à une forme d'immunodéficience, le syndrome hyper-IgM [3;5]. À l'inverse, des niveaux anormalement élevés d'AID contribueraient au développement de maladies autoimmunes telles que le lupus et l'arthrite rhumatoïde [6]. De plus, AID peut muter des (proto)-oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur [7-8] ainsi qu'initier une instabilité génomique causant des translocations chromosomales (**Figure 1** ; [9-12]) qui peuvent conduire au

développement de leucémie/lymphome. Notamment, dans le cas de la leucémie myéloïde chronique, AID favorise le développement de résistance au traitement anticancéreux [13].

De nombreux mécanismes de régulation d'AID ont été identifiés pour s'assurer que cette enzyme fonctionne au bon moment, au bon endroit et aussi longtemps que nécessaire. Pour parvenir à cet équilibre subtil entre immunité et autoimmunité et/ou cancer, la régulation d'AID va du contrôle des niveaux d'ARN messenger et protéiques à l'accès restreint au noyau ou au ciblage préférentiel vers les gènes des immunoglobulines. Notre laboratoire travaille sur la régulation post-traductionnel d'AID, en particulier sa localisation intracellulaire et sa stabilité au niveau protéique qui sont des mécanismes liés [14]. AID circule constamment entre le cytoplasme et le noyau, bien que cette protéine soit majoritairement cytoplasmique due à la compétition entre trois processus que nous, et d'autres, avons identifié : l'import et l'export nucléaires actifs et une rétention cytoplasmique [15-17]. Or, AID cytoplasmique est plus stable que dans le noyau, un autre moyen de limiter son activité mutagène [14]. Il est important de noter que des variations dans les niveaux



d'AID affectent non seulement son impact physiologique dans la diversification des anticorps mais aussi son activité pathologique [12;18], et que AID est exprimé dans plusieurs types de cancers [19-22], d'où l'importance de comprendre les mécanismes post-traductionnels régulant les niveaux d'AID.

Nous nous sommes donc intéressés à identifier des partenaires cytoplasmiques d'AID qui pourraient jouer un rôle dans sa stabilité. Une recherche protéomique par spectrométrie de masse a été réalisée et nous avons observé qu'un certain nombre de chaperons moléculaires connus comme protéines de choc thermique (*Heat shock proteins Hsp*), interagissaient avec AID

telles que Hsp40, Hsp70 et Hsp90 et qu'ils faisaient tous partie de la même voie de chaperonnage (**Figure 2**; [23]). Pour avoir une mesure de la spécificité de cette interaction (les chaperons moléculaires ne reconnaissant normalement pas un site défini), nous nous sommes intéressés aux protéines Apobec, qui font partie de la même sous-famille de cytidine désaminases qu'AID et qui ont une structure tridimensionnelle conservée et une grande similarité de séquence (50-60%) avec AID, en faisant d'excellents contrôles. Or, aucune des protéines Apobec testées (Apobec1, 2 et 3G) n'interagissent avec Hsp90, au contraire d'AID.

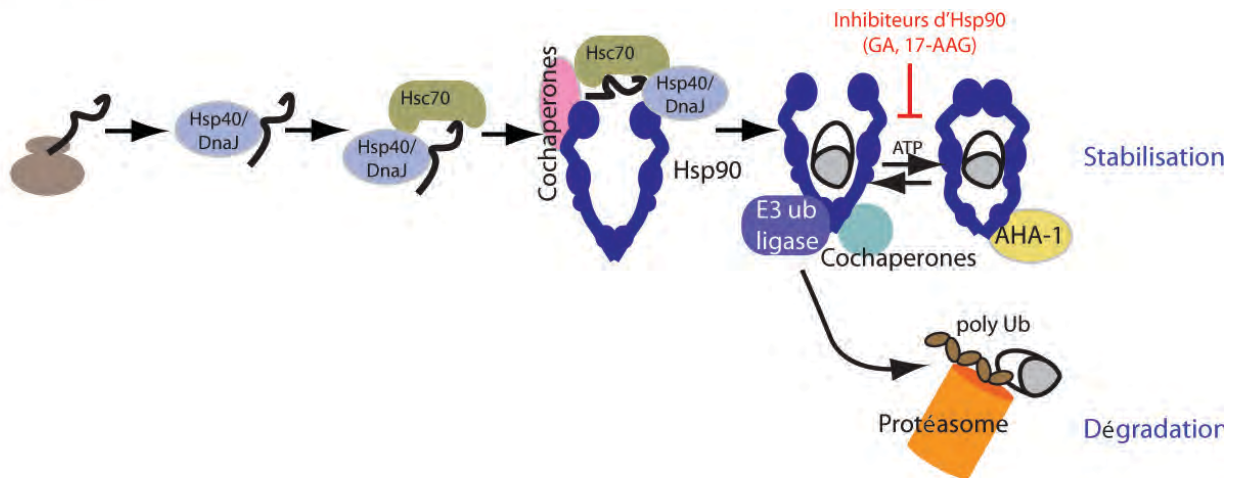


Figure 2

Vue schématisée simplifiée des différentes étapes lors de la stabilisation et de la dégradation d'une protéine cliente d'Hsp90. Après synthèse ribosomale dans le cytoplasme, AID est pris en charge par la voie de chaperonnage. Elle interagit en premier lieu avec Hsp40 qui recrute Hsp70 avant de transmettre AID à un complexe

moléculaire contenant notamment Hsp90. Hsp90 stabilise AID par hydrolyse d'ATP. L'inhibition d'Hsp90 par la geldanamycine ou 17-AAG conduit au recrutement d'une ubiquitine E3 ligase qui polyubiquitine AID et permet sa dégradation par le protéasome.

Hsp90 est un candidat intéressant en ce sens qu'il joue un rôle important dans la maturation conformationnelle de nombreuses protéines importantes dans la transduction de signal ainsi que de protéines circulant entre le noyau et le cytoplasme comme les récepteurs d'hormones stéroïdiennes [24]. De nombreuses protéines clientes d'Hsp90 jouent un rôle dans la transformation cellulaire et l'oncogenèse, faisant d'Hsp90

une cible de choix pour le développement de traitements anticancéreux [24]. L'activité chaperone d'Hsp90 dépend de sa capacité d'hydrolyser l'ATP. De fait, des inhibiteurs de l'activité ATPase d'Hsp90 tels que la geldanamycine, ou un de ses nombreux dérivés 17-AAG, sont des outils puissants pour étudier les différentes fonctions d'Hsp90 (Figure 2) [24]. L'inhibition d'Hsp90 conduit à la perte d'interaction avec AID et corrèle avec une forte diminution des



niveaux d'AID endogène dans des cellules B immortalisées d'origine humaine, aviaire ou murine mais aussi dans des cellules B primaires humaines. Dans les faits, Hsp90 stabilise AID dans le cytoplasme et le traitement à la geldanamycine conduit à la polyubiquitination et à la dégradation d'AID par le protéasome (**Figure 2**). L'inhibition d'Hsp90 qui affecte la fraction cytoplasmique d'AID a toutefois un impact direct sur ses fonctions nucléaires. L'utilisation de modèles cellulaires (lignée de cellules B de poulet) [25] diversifiant leurs anticorps par un processus initié par AID et appelé conversion génique (**Figure 1**) a montré que des doses croissantes d'inhibiteurs d'Hsp90 diminuent proportionnellement les niveaux endogènes d'AID ce qui corrèlent avec une réduction de la conversion génique. Un effet similaire est observable dans un modèle cellulaire capable de diversifier les gènes des immunoglobulines par l'hypermutation somatique. Enfin, l'inhibition chronique ou aiguë d'Hsp90, dans une lignée de cellules de souris ou dans des cellules B primaires de souris capable de remplacer sa chaîne lourde  $\mu$  pour la chaîne  $\alpha$  ou  $\gamma$  après stimulation par un cocktail de cytokines, a montré une réduction significative de la

commutation isotypique. Tous ces résultats suggèrent qu'Hsp90, en stabilisant la fraction cytoplasmique d'AID, détermine les niveaux totaux de la protéine et par là même son niveau d'activité physiologique. Cette observation est d'autant plus intéressante qu'elle pourrait être utilisée pour diminuer les effets pathologiques d'AID. Or, certains résultats ont montré qu'AID est exprimé dans des stades avancés de leucémie myéloïde chronique et qu'elle introduit des mutations dans l'oncogène *BCR-ABL* [13]. *BCR-ABL* est en fait la signature moléculaire de ce syndrome myéloprolifératif résultant de la translocation chromosomale entre le gène *BCR* (*breakpoint cluster region*) et celui codant pour la tyrosine kinase *ABL* (*abelson murine leukemia viral oncogene homolog*). Cette dernière, qui dans un contexte normal a une activité kinase très régulée, devient une kinase constitutivement active après fusion avec *BCR*, qui est en grande partie responsable de la prolifération des cellules leucémiques. En mutant *BCR-ABL*, AID confère une résistance à l'inhibiteur imatinib qui cible spécifiquement l'activité tyrosine kinase d'*ABL* et qui est utilisé avec beaucoup de succès dans le traitement de leucémie myéloïde chronique [26]. Nous nous sommes donc intéressés à savoir si



l'association d'inhibiteurs d'Hsp90 à l'imatinib pouvait ralentir l'apparition de mutations dans *BCR-ABL* et ainsi empêcher le développement de résistance à l'imatinib dans des cellules leucémiques myéloïdes chroniques exprimant AID. L'expression ectopique d'AID dans de telles cellules *BCR-ABL+* conduit à l'apparition d'une sous-population résistante à l'imatinib et sélectionnée en présence de cette drogue [13]. L'ajout d'inhibiteurs d'Hsp90 empêche l'apparition de cette population résistante et corrèle avec une réduction d'AID et une absence de mutations dans le gène *BCR-ABL1*.

En conclusion, Hsp90 stabilise la protéine AID dans le cytoplasme et contrôle son activité dans la diversification des anticorps.

L'inhibition d'Hsp90, ou même la manipulation de protéines associées à cette chaperone actuellement étudiée dans notre laboratoire, peut conduire à la polyubiquitination et à la dégradation d'AID par le protéasome. Cette voie de régulation peut être une cible de choix pour empêcher les effets pathologiques de l'activité mutagénique d'AID. Nos travaux sont les premiers à mettre en avant un moyen pharmacologique de diminuer les niveaux d'AID pour traiter certaines leucémies et lymphomes, particulièrement la LMC. Ils pourraient aussi ouvrir la porte à l'utilisation préventive d'inhibiteurs d'Hsp90 dans le traitement de certaines maladies autoimmunes associées à une surexpression d'AID.

### Références

1. Stavnezer J, Guikema JEJ, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 261-92.
2. Di Noia JM, Neuberger MS. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 1-22.
3. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, et al. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 2000; 102: 553-63.
4. Petersen-Mahrt SK, Harris RS, Neuberger MS. AID mutates *E. coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature* 2002; 418: 99-103.
5. Revy P, Muto T, Levy Y, Geissmann F, Plebani A, Sanal O, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 2000; 102:565-75.
6. Zaheen A, Martin A. Activation-induced cytidine deaminase and aberrant germinal center selection in the development of humoral autoimmunities. *Am J Pathol* 2011; 178: 462-71.
7. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nanjangud G, Chaganti RS, et al. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in



- B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001; 412: 341-346.
8. Liu M, Duke JL, Richter DJ, Vinuesa CG, Goodnow CC, *et al.* Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* 2008; 451: 841-5.
  9. Ramiro AR, Jankovic M, Eisenreich T, Difilippantonio S, Chen-Kiang S, *et al.* AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* 2004; 118: 431-8.
  10. Dorsett Y, Robbiani DF, Jankovic, Reina-San-Martin B, Eisenreich TR, *et al.* A role for AID in chromosome translocations between c-myc and the IgH variable region. *J Exp Med* 2007; 204: 2225-32.
  11. Robbiani DF, Bothmer A, Callen E, Reina-San-Martin B, Dorsett Y, *et al.* AID is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell* 2008; 1028-38.
  12. Robbiani DF, Bunting S, Feldhahn N, Bothmer A, Camps J, Deroubaix S, *et al.* AID produces DNA double-strand breaks in non-Ig genes and mature B cell lymphomas with reciprocal chromosome translocations. *Mol Cell* 2009; 36: 631-41.
  13. Klemm L, Duy C, Iacobucci I, Kuchen S, von Levezow G, Feldhahn N, *et al.* The B cell mutator AID promotes B lymphoid blast crisis and drug resistance in chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2009; 16: 232-45.
  14. Aoufouchi S, Faili A, Zober C, D'Orlando O, Weller S, Weill JC, Reynaud CA. Proteasomal degradation restricts the nuclear lifespan of AID. *J Exp Med* 2008; 205: 1357-68.
  15. Patenaude AM, Orthwein A, Hu Y, Campo VA, Kavli B, Buschiazzi A, Di Noia JM. Active nuclear import and cytoplasmic retention of activation-induced deaminase. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16: 514-27.
  16. Ito S, Nagaoko H, Shinkura R, Begum N, Muramatsu M, Nakata M, Honjo T. Activation-Induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 1975-1980.
  17. McBride KM, Barreto V, Ramiro AR, Stavropoulos P, Nussenzweig MC. Somatic hypermutation is limited by CRM1-dependent nuclear export of activation-induced deaminase. *J Exp Med* 2004; 199: 1235-44.
  18. Casellas R, Yamane A, Kovalchuk AL, Potter M. Restricting activation-induced cytidine deaminase tumorigenic activity in B lymphocytes. *Immunology* 2009; 126: 316-28.
  19. Peled JU, Kuang FL, Iglesias-Ussel MD, Roa S, *et al.* The biochemistry of Somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol* 2007; 26: 481-511.
  20. Feldhahn N, Henke N, Melchior K, Duy C, Soh BN, Klein F, von Levezow G, *et al.* Activation-induced cytidine deaminase acts as a mutator in BCR-ABL1-transformed acute lymphoblastic leukemia cells. *J Exp Med* 2007; 204: 1157-66.
  21. Palacios F, Moreno P, Morande P, Abreu C, Correa A, Porro V, Landoni AI, *et al.* High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood* 2010; 115: 4488-96.
  22. Endo Y, Marusawa H, Kou T, Nakase H, Fuji S, Fujimori T, *et al.* Activation-induced cytidine deaminase links between inflammation and the development of colitis-associated colorectal cancers. *Gastroenterology* 2008; 135: 889-98.
  23. Orthwein A, Patenaude AM, Affar el B, Lamarre A, Young JC, Di Noia JM. Regulation of activation-induced deaminase stability and antibody gene diversification by Hsp90. *J Exp Med* 2010; 207: 2751-65.
  24. Whitesell L, Linquist SL. Hsp90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 761-772.
  25. Arakawa H, Hauschild J, Buerstedde JM. Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion. *Science* 2002; 295: 1301-6.
  26. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, *et al.* Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001; 344:1031-7.



**Nouvelle**

## **La médecine personnalisée grâce aux signatures d'expression génique : l'exemple du cancer du sein**

**Personalized medicine through gene expression signatures: the case of breast cancer**

**Laurent Sansregret<sup>1</sup>, Alain Nepveu<sup>2,3,4,5</sup>**

1-Cancer Research UK London Research Institute, Clare Hall Laboratories, South Mimms, Hertfordshire, EN6 3LD, UK.

2-Centre du cancer Rosalind and Morris Goodman, 3-Départements de biochimie, 4-d'oncologie et 5-de médecine, Université McGill, 1160, avenue des Pins ouest, Montréal (Québec) Canada H3A 1A3

Correspondance : Alain Nepveu

Tél. : (514) 398-5839

Fax : (514) 398-6769

[alain.nepveu@mcgill.ca](mailto:alain.nepveu@mcgill.ca)

**Article reçu le : 8 septembre 2011**

**Article accepté le : 22 novembre 2011**



Nous entrons dans l'ère de la médecine personnalisée. En termes simples, ce type de médecine suppose que l'application d'un traitement spécifique ne puisse être généralisée à tous les patients. En effet, la notion de traitement unique, bien que présentant des avantages pratiques évidents dans l'organisation d'un système de santé, a graduellement été rejetée dans le cas de certaines maladies pour faire place au concept de «traitement sur mesure» pour chaque patient. Le cancer du sein, en particulier, fait figure de paradigme dans l'établissement des principes gouvernant le développement de la médecine personnalisée.

Une femme sur huit sera atteinte du cancer du sein. Nous comptons annuellement 22 000 nouveaux cas de cancer du sein au Canada et 5500 au Québec (Société canadienne du cancer, statistiques 2010). Le cancer du sein est difficile à traiter, entre autres à cause de son hétérogénéité (1, 2). Certains types de cancer du sein répondent bien à certains traitements, mais pas à d'autres. Il est donc important de choisir le bon traitement pour chaque type. Par exemple, le trastuzumab donne de bons résultats pour les cancers du sein qui expriment le récepteur HER2 (3). Les cancers HER2<sup>+</sup> représentent 10% à

15% de tous les cancers du sein. Dans tous les autres cas, le trastuzumab n'a aucun effet bénéfique. La décision de traiter ou non avec le trastuzumab est donc basée sur l'expression du récepteur HER2. Dans les cas de cancer du sein qui expriment le récepteur de l'estrogène (RE<sup>+</sup>), on optera pour un traitement hormonal (4, 5). De plus, on recommandera la chimiothérapie si, lors de la chirurgie, on a détecté l'infiltration de cellules cancéreuses dans les ganglions lymphatiques (GL<sup>+</sup>). Dans le cas des patientes RE<sup>+</sup> qui ne montrent pas d'infiltration des ganglions lymphatiques (RE<sup>+</sup>/LN<sup>-</sup>), la décision d'ajouter ou non la chimiothérapie est plus difficile à prendre, d'une part parce que la chimiothérapie ne profite qu'à environ 10% de ces patientes (6, 7), et d'autre part parce que la chimiothérapie produit des effets secondaires négatifs chez plusieurs patientes (8, 9). Les effets à court terme incluent l'alopécie (perte de cheveux), l'immunosuppression, la nausée et la fatigue. À plus long terme, les traitements de chimiothérapie peuvent entraîner la ménopause précoce et un risque accru de cardiomyopathies, neuropathies et leucémies secondaires (10). Il est donc important de soupeser à la fois les bénéfices et les risques potentiels de la



chimiothérapie pour chacune des patientes. Pour prendre leur décision, l'oncologue et sa patiente devront considérer une série de paramètres cliniques et histo-pathologiques. Au-delà de ces critères classiques, il existe maintenant des outils d'analyse moléculaire qui permettent d'évaluer la probabilité de récurrence ou de progression de la maladie (outil pronostique) ou de prédire la réponse à un traitement spécifique (outil prédictif) (11). En particulier, des signatures d'expression génique ont récemment été développées afin de mieux catégoriser les différents types de cancer du sein et d'évaluer la pertinence de recourir à la chimiothérapie (12).

Les compagnies d'assurance aux États-Unis ainsi que le régime d'assurance-maladie de l'Ontario ont récemment décidé de rembourser les coûts du test OncotypeDX®, afin de mieux cibler les patientes de type RE<sup>+</sup>/LN<sup>-</sup> qui devraient recevoir un traitement de chimiothérapie. Cette décision est justifiée non seulement par le désir de ne pas faire subir inutilement la chimiothérapie aux patientes qui n'en retireraient aucun bénéfice, mais aussi par des considérations économiques. En effet, le coût du test est d'environ 3 800 \$, alors que celui de la chimiothérapie est évalué à environ 17 000 \$ par patiente. Donc, le

système de santé épargne de l'argent si le test permet d'éviter un traitement inutile à 25% des patientes et plus. Or, une étude clinique a démontré que le test OncotypeDX® développé en 2004 permet d'identifier un groupe de patientes RE<sup>+</sup>/LN<sup>-</sup> à faible risque pour lesquelles la chimiothérapie n'apporte aucun bénéfice (7, 13). Ce groupe représente environ 50% de toutes les patientes RE<sup>+</sup>/LN<sup>-</sup>. Cet exemple spectaculaire de médecine personnalisée montre que la biologie moléculaire de pointe permet d'améliorer la qualité des traitements tout en diminuant les coûts. Mais il est possible de faire encore mieux. En effet, si on considère que 90% des patientes RE<sup>+</sup>/LN<sup>-</sup> ne retirent aucun avantage de la chimiothérapie et que le test permet d'identifier seulement 50% de celles-ci, il reste encore une fraction importante des patientes qui pourraient en être épargnées.

Des chercheurs du Centre du cancer Goodman de l'université McGill ont récemment mis à jour une signature d'expression génique capable d'évaluer la probabilité de récurrence et de progression de plusieurs types de cancers du sein, notamment ceux du type RE<sup>+</sup>/LN<sup>-</sup> (14). La signature a été nommée C1S (CUX1 Signature) du fait qu'elle comprend des gènes régulés par le facteur de transcription



CUX1. Ce facteur de transcription est surexprimé dans plusieurs types de cancer (15-17), notamment dans le cancer du sein (18, 19). Les gènes régulés par CUX1 sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires qui jouent un rôle important dans le développement et la progression des tumeurs. Ainsi, le facteur CUX1 accélère la prolifération des cellules, stimule leurs propriétés migratoires et invasives et permet la survie de cellules dont le caryotype est instable (14, 20-24). Des modèles de souris transgéniques ont démontré que la surexpression de CUX1 dans les cellules épithéliales de la glande mammaire cause l'apparition de tumeurs mammaires qui ressemblent à plusieurs types de cancer du sein chez l'humain (25). De plus, toutes les tumeurs mammaires induites par CUX1 présentent un haut degré d'instabilité génétique (14). Outre l'avancement de nos connaissances sur les mécanismes sous-jacents à la progression tumorale, ces recherches pourraient mener à des applications pratiques dans le diagnostic des cancers chez l'humain. En effet, des tests bio-informatiques sur plusieurs banques de données de cancers du sein ont révélé que la signature C1S pouvait améliorer le pronostic même après avoir considéré plusieurs critères clinico-

pathologiques tels que le grade, l'infiltration des ganglions lymphatiques et le niveau d'expression du récepteur de l'estrogène (14). Des analyses comparatives ont montré que la signature C1S était supérieure à la signature de OncotypeDX® et de plusieurs autres signatures récemment publiées (**Tableau 1**). La qualité de ces résultats ainsi que la possibilité de développer un test diagnostique d'une grande précision ont permis l'obtention d'une subvention de l'Institut de recherches en santé du Canada pour valider l'utilisation de ce test dans les cas de cancer du sein de type  $RE^+/LN^-$  et de faire une étude comparative des tests C1S et OncotypeDX®.

Nous croyons que la valeur pronostique accrue de la signature C1S, par rapport à d'autres signatures d'expression génique, tient au fait que cette signature comprend deux classes de gènes impliqués dans des processus cellulaires distincts (26). En effet, alors que les signatures de OncotypeDX® et de MammaPrint comprennent essentiellement des gènes liés à la prolifération cellulaire (27, 28), la signature C1S inclut à la fois des gènes qui jouent un rôle dans la prolifération cellulaire et des gènes qui ont un impact sur l'instabilité génomique des cellules cancéreuses. Or, l'instabilité génomique



permet aux cellules cancéreuses d'évoluer rapidement et ainsi de générer de larges populations de variants génétiques. Il est entendu que les changements d'ordre génétique ont généralement un effet délétère sur les cellules. Toutefois, les populations de cellules cancéreuses qui évoluent rapidement permettent l'émergence de rares variants génétiques aux propriétés tumorigènes accrues. La capacité des cellules tumorales à évoluer rapidement est illustrée par leur

hétérogénéité tant histologique (29-31) que génétique (32-35). Au plan pratique, un test diagnostique capable à la fois d'évaluer le potentiel de croissance d'une tumeur et de prédire la stabilité ou l'instabilité génétique des cellules cancéreuses fournira l'information nécessaire aux patientes atteintes du cancer du sein du type RE<sup>+</sup>/LN<sup>-</sup> pour décider de la pertinence de recourir ou non à la chimiothérapie.



**Tableau 1. Analyses univariées**

Variable	Tous les cas, n=1474		Cancers RE <sup>+</sup> /GL <sup>-</sup> , n = 920	
	Intervalle de confiance (95% CI)	Valeurs de p	Intervalle de confiance (95% CI)	Valeurs de p
Grade 2 (vs 1)	2,25 (1,65 – 3,05)	2,1 x 10 <sup>-7</sup> ***	1,69 (1,09-2,63)	2,0 x 10 <sup>-2</sup> ***
Grade 3 (vs 1)	3,18 (2,34 - 4,31)	1,4 x 10 <sup>-13</sup> ***	2,76 (1,73-4,39)	1,9 x 10 <sup>-5</sup>
Ganglion lymphatiques	1,51 (1,27 - 1,78)	1,8 x 10 <sup>-6</sup> ***	-	
HER2	1,47 (1,21 – 1,78)	1,0 x 10 <sup>-4</sup> ***	1,38 (0,94-2,02)	9,9 x 10 <sup>-1</sup>
ER	1,51 (1,27 – 1,80)	4,1 x 10 <sup>-6</sup> ***	-	-
Signature CUX1 (14)	2,34 (2,01 – 2,73)	< 1 x 10 <sup>-19</sup> ***	2,73 (2,12-3,52)	6,3 x 10 <sup>-15</sup> ***
Sotiriou (12)	2,31 (1,97-2,71)	< 1 x 10 <sup>-19</sup> ***	2,74 (2,11-3,56)	5,5 x 10 <sup>-14</sup> ***
Carter (36)	0,55 (0,48-0,64)	1,5 x 10 <sup>-14</sup> ***	2,73 (2,12-3,52)	6,3 x 10 <sup>-15</sup> ***
Liu (37)	1,73 (1,49-2,01)	4 x 10 <sup>-13</sup> ***	1,49 (1,14-1,97)	4,2 x 10 <sup>-3</sup> **
Teschendorff t52 (38)	2,09 (1,79-2,44)	< 1 x 10 <sup>-19</sup> ***	2,26 (1,74-2,94)	9,0 x 10 <sup>-10</sup> ***
van de Vijver (38) (Mammaprint)	0,62 (0,39-0,85)	9,6 x 10 <sup>-10</sup> ***	1,58 (1,17-2,14)	2,9 x 10 <sup>-3</sup> **
Chang (39)	1,72 (1,48-2,00)	1 x 10 <sup>-12</sup> ***	1,64 (1,27-2,11)	1,5 x 10 <sup>-4</sup> ***
Paik (OncotypeDX) (40)	1,15 (0,71-1,02)	6,1 x 10 <sup>-2</sup>	1,03 (0,77-1,39)	8,3 x 10 <sup>-2</sup>
Wang (40)	0,76 (0,65-0,88)	2,8 x 10 <sup>-4</sup> ***	0,96 (0,73-1,25)	7,4 x 10 <sup>-1</sup>
Finak (41)	1,15 (0,99-1,34)	6,8 x 10 <sup>-2</sup>	1,19 (0,91-1,56)	2,0 x 10 <sup>-1</sup>
van Vliet (42)	0,49 (0,42-0,56)	1 < 10 <sup>-19</sup> ***	0,44 (0,34-0,57)	2,3 x 10 <sup>-10</sup> ***
Teschendorff t17 (38)	0,57 (0,49-0,66)	1,8 x 10 <sup>-13</sup> ***	0,65 (0,50-0,83)	6,6 x 10 <sup>-4</sup>

**Tableau 1**

Des analyses unitaires ont été effectuées pour mesurer la valeur pronostique de 12 signatures d'expression génique pour 1474 cas de cancer du sein, provenant de 8 bases de données, et pour lesquels les paramètres cliniques (grade, infiltration des ganglions lymphatiques, expression de HER2 et du récepteur de l'estrogène (RE) étaient disponibles (12, 14, 36-44). Les analyses unitaires considèrent indépendamment les signatures d'expression génique et les paramètres cliniques. La valeur pronostique de chaque signature est calculée soit pour tous les 1474 cas (les deux colonnes à gauche) ou seulement pour les 920 cas positifs pour le récepteur de l'estrogène et négatifs quant à l'infiltration des ganglions lymphatiques (RE<sup>+</sup>/GL<sup>-</sup>). La valeur pronostique des paramètres et des signatures est statistiquement significative lorsque la valeur de p, calculée par le test de Student, est inférieure à 0,05\*, 0,01\*\* ou 0,001\*\*\*.



**Tableau 2. Analyses multivariées**

Variable	Tous les cas, n=1474		Cancers RE <sup>+</sup> /GL <sup>-</sup> , n = 657	
	Intervalle de confiance (95% CI)	Valeurs de p	Intervalle de confiance (95% CI)	Valeurs de p
Grade 2 (vs 1)	1,77 (1,26-2,49)	9,2 x 10 <sup>-4</sup> ***	1,38 (0,87-2,18)	1,7 x 10 <sup>-1</sup>
Grade 3 (vs 1)	1,58 (1,08-2,30)	1,8 x 10 <sup>-2</sup> *	1,54 (0,90-2,65)	1,1 x 10 <sup>-1</sup>
Ganglion lymphatiques	1,57 (1,29-1,92)	8,5 x 10 <sup>-6</sup> ***	-	-
HER2	1,18 (0,91-1,53)	2,2 x 10 <sup>-1</sup>	0,99 (0,59-1,64)	9,6 x 10 <sup>-1</sup>
ER	1,08 (0,83-1,40)	5,7 x 10 <sup>-1</sup>	-	-
Signature CUX1(14)	1,65 (1,20-2,29)	2,4 x 10 <sup>-3</sup> **	2,13 (1,28-3,55)	3,8 x 10 <sup>-3</sup> **
Sotiriou (12)	1,37 (0,92-2,04)	1,2 x 10 <sup>-1</sup>	1,94 (1,01-3,74)	4,7 x 10 <sup>-2</sup> *
Carter (36)	1,33 (0,89-1,97)	1,6 x 10 <sup>-1</sup>	1,10 (0,59-2,04)	7,7 x 10 <sup>-1</sup>
Liu (37)	1,21 (0,93-1,57)	1,5 x 10 <sup>-1</sup>	1,15 (0,77-1,74)	4,9 x 10 <sup>-1</sup>
Teschendorff t52 (38)	1,20 (0,87-1,65)	2,6 x 10 <sup>-1</sup>	1,35 (0,81-2,25)	2,6 x 10 <sup>-1</sup>
van de Vijver (38) (Mammaprint)	1,17 (0,88-1,55)	2,9 x 10 <sup>-1</sup>	1,12 (0,71-1,77)	6,3 x 10 <sup>-1</sup>
Chang (39)	1,15 (0,88-1,50)	3,0 x 10 <sup>-1</sup>	1,03 (0,66-1,60)	9,1 x 10 <sup>-1</sup>
Paik (OncotypeDX) (40)	1,11 (0,88-1,39)	3,8 x 10 <sup>-1</sup>	1,17 (0,78-1,75)	4,4 x 10 <sup>-1</sup>
Wang (40)	1,07 (0,87-1,32)	5,3 x 10 <sup>-1</sup>	1,21 (0,86-1,71)	2,7 x 10 <sup>-1</sup>
Finak (41)	1,03 (0,84-1,26)	8,0 x 10 <sup>-1</sup>	0,99 (0,69-1,40)	9,3 x 10 <sup>-1</sup>
van Vliet (42)	1,02 (0,71-1,46)	9,3 x 10 <sup>-1</sup>	1,59 (0,87-2,89)	1,3 x 10 <sup>-1</sup>
Teschendorff t17 (38)	1,02 (0,74-1,40)	9,3 x 10 <sup>-1</sup>	1,13 (0,66-1,94)	6,6 x 10 <sup>-1</sup>

**Tableau 2**

Des analyses multivariées ont été effectuées pour mesurer la valeur pronostique de 12 signatures d'expression génique pour 1474 cas de cancer du sein, provenant de 8 bases de données, et pour lesquels les paramètres cliniques (grade, infiltration des ganglions lymphatiques, expression de HER2 et de RE) étaient disponibles (12, 14, 36-44). Alors que les analyses unitaires considèrent indépendamment les signatures d'expression génique et les paramètres cliniques, les analyses multivariées considèrent à la fois les paramètres cliniques ainsi que chacune des signatures d'expression génique. En d'autres termes, les analyses multivariées vérifient si les signatures d'expression génique peuvent fournir de l'information additionnelle au-delà des paramètres cliniques. La valeur pronostique de chaque signature est calculée soit pour tous les 1474 cas (les deux colonnes à gauche) ou seulement pour les 920 cas positifs pour le récepteur de l'estrogène et négatifs quant à l'infiltration des ganglions lymphatiques (RE<sup>+</sup>/GL<sup>-</sup>). La valeur pronostique des paramètres et des signatures est statistiquement significative lorsque la valeur de p, calculée par le test de Student, est inférieure à 0,05\*, 0,01\*\* ou 0,001\*\*\*.



## Références

1. Bevers TB, *et al.* NCCN clinical practice guidelines in oncology: breast cancer screening and diagnosis. *J Natl Compr Canc Netw* 2009; 7(10): 1060-96.
2. Carlson RW, *et al.* Breast cancer. Clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2009; 7(2): 122-92.
3. Mass RD, *et al.* Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Clinical Breast Cancer* 2005; 6(3): 240-6.
4. Vogel VG, *et al.* Update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 Trial: Preventing breast cancer. *Cancer Prevention Research* 2010; 3(6): 696-706.
5. Cuzick J, *et al.* Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncology* 2010; 11(12): 1135-41.
6. Fisher B, *et al.* Treatment of lymph-node-negative, oestrogen-receptor-positive breast cancer: long-term findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project randomised clinical trials. *Lancet* 2004; 364(9437): 858-68.
7. Paik S, *et al.* Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2006; 24(23): 3726-34.
8. Mrozek E, Shapiro CL. Survivorship and complications of treatment in breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2005; 3(3): 211-22, 38.
9. Soule SE. When not to treat--chemotherapy for small (< or = 1 cm) breast cancers. *Breast Disease* 2004; 21: 33-40.
10. Azim HA, Jr., *et al.* Long-term toxic effects of adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Ann Oncol* 2011.
11. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* 2004; 9(6): 606-16.
12. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* 2009; 360(8): 790-800.
13. Paik S. Development and clinical utility of a 21-gene recurrence score prognostic assay in patients with early breast cancer treated with tamoxifen. *The oncologist* 2007; 12(6): 631-5.
14. Sansregret L, *et al.* Cut homeobox 1 causes chromosomal instability by promoting bipolar division after cytokinesis failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(5): 1949-54.
15. De Vos J, *et al.* Comparison of gene expression profiling between malignant and normal plasma cells with oligonucleotide arrays. *Oncogene* 2002; 21(44): 6848-57.
16. Moon NS, *et al.* Expression of N-terminally truncated isoforms of CDP/CUX is increased in human uterine leiomyomas. *Int J Cancer* 2002; 100(4): 429-32.
17. Ripka S, *et al.* CUX1: target of Akt signalling and mediator of resistance to apoptosis in pancreatic cancer. *Gut* 2010; 59(8): 1101-10.
18. Goulet B, *et al.* Characterization of a tissue-specific CDP/Cux isoform, p75, activated in breast tumor cells. *Cancer Res* 2002; 62(22): 6625-33.
19. Michl P, *et al.* CUTL1 is a target of TGF(beta) signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. *Cancer Cell* 2005; 7(6): 521-32.
20. Sansregret L, *et al.* The p110 isoform of the CDP/Cux transcription factor accelerates entry into S phase. *Mol Cell Biol* 2006; 26(6): 2441-55.
21. Truscott M, *et al.* Carboxyl-terminal proteolytic processing of CUX1 by a caspase enables transcriptional activation in proliferating cells. *J Biol Chem* 2007; 282(41): 30216-26.
22. Harada R, *et al.* Genome-wide location analysis and expression studies reveal a role for p110 CUX1 in the activation of DNA



- replication genes. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(1): 189-202.
23. Sansregret L, Nepveu A. The multiple roles of CUX1: Insights from mouse models and cell-based assays. *Gene* 2008; 412(1-2): 84-94.
  24. Kedinger V, *et al.* p110 CUX1 homeodomain protein stimulates cell migration and invasion in part through a regulatory cascade culminating in the repression of E-cadherin and occludin. *J Biol Chem* 2009; 284(40): 27701-11.
  25. Cadieux C, *et al.* Mouse mammary tumor virus p75 and p110 CUX1 transgenic mice develop mammary tumors of various histologic types. *Cancer Res* 2009; 69(18): 7188-97.
  26. Sansregret L, Nepveu A. Gene signatures of genomic instability as prognostic tools for breast cancer. *Future Oncol* 2011; 7(5): 591-4.
  27. Fan C, *et al.* Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 355(6): 560-9.
  28. Oakman C, Santarpia L, Di Leo A. Breast cancer assessment tools and optimizing adjuvant therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2010; 7(12): 725-32.
  29. Hanna W, Nofech-Mozes S, Kahn HJ. Intratumoral heterogeneity of HER2/neu in breast cancer--a rare event. *Breast J* 2007; 13(2): 122-9.
  30. Cottu PH, *et al.* Intratumoral heterogeneity of HER2/neu expression and its consequences for the management of advanced breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2008; 19(3): 595-7.
  31. Iliopoulos D, *et al.* Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(4): 1397-402.
  32. Korkola J, Gray JW. Breast cancer genomes--form and function. *Curr Opin Genet Dev* 2010; 20(1): 4-14.
  33. Shah SP, *et al.* Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature* 2009; 461(7265): 809-13.
  34. Swanton C, Burrell RA, Futreal PA. Breast cancer genome heterogeneity: a challenge to personalised medicine? *Breast cancer research: BCR* 2011; 13(1): 104.
  35. Navin N, *et al.* Inferring tumor progression from genomic heterogeneity. *Genome research* 2010; 20(1): 68-80.
  36. Carter SL, *et al.* A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet* 2006; 38(9): 1043-8.
  37. Liu R, *et al.* The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N Engl J Med* 2007; 356(3): 217-26.
  38. Teschendorff AE, *et al.* A consensus prognostic gene expression classifier for ER positive breast cancer. *Genome biology* 2006; 7(10): R101.
  39. Chang HY, *et al.* Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. *PLoS Biol* 2004; 2(2): E7.
  40. Paik S, *et al.* A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351(27): 2817-26.
  41. Finak G, *et al.* Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nature medicine* 2008; 14(5): 518-27.
  42. van Vliet MH, *et al.* Pooling breast cancer datasets has a synergetic effect on classification performance and improves signature stability. *BMC Genomics* 2008; 9:375.
  43. van de Vijver MJ, *et al.* A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347(25): 1999-2009.
  44. Wang Y, *et al.* Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005; 365(9460): 671-9.