

Mécanismes moléculaires impliqués dans la cancérogenèse du mésothéliome

Période : novembre 2010 à février 2011

Pascal ANDUJAR

Université Paris-Est Créteil – INSERM U955 Équipe 4 – Créteil

Mots clés : Amiante, Cancérogenèse, *ERCC1*, Gène de réparation, Gène suppresseur de tumeur, *LATS2*, Mésothéliome, *NF2*, *XRCC1*, *YAP*

Les fibres d'amiante, classées dans le groupe 1 du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), c'est-à-dire comme agent cancérogène certain pour l'Homme, génèrent des altérations génétiques et chromosomiques notamment dans le mésothéliome pleural (MP), tumeur maligne de la plèvre fortement associée à une exposition antérieure à l'amiante (Robinson *et al.*, 2005; Sediko *et al.*, 2010). De façon générale, la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse est due à l'activation d'un ou de plusieurs oncogènes⁽¹⁾ et à l'inactivation d'un ou de plusieurs gènes suppresseurs de tumeur. L'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur, tels que les gènes *P14*, *P15* et *P16* dans le cas du MP, rend la cellule insensible aux signaux antiprolifératifs par inactivation des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire *via* ces protéines⁽²⁾ de contrôle résultant de ces gènes. Pour réparer un dommage à l'ADN⁽³⁾ sous forme d'une mutation génétique, la cellule normale dispose de plusieurs mécanismes de réparation de l'ADN, l'empêchant ainsi, selon la localisation de la mutation, de devenir une cellule anormale susceptible selon les cas de se transformer en cellule cancéreuse. L'expression de ces gènes de réparation de l'ADN, comme *XRCC1* ou *ERCC1*, est l'un des mécanismes permettant de réparer une mutation génétique. Il est donc primordial d'acquérir une meilleure connaissance des mécanismes d'inactivation ou de modulation de l'expression des gènes suppresseurs de tumeur et/ou des gènes de réparation de l'ADN mis en jeu dans la cancérogenèse du MP.

La présence de variants des gènes de réparation *XRCC1* et *ERCC1* modifie le risque de survenue de mésothéliome : étude cas-témoins

Betti M, Ferrante D, Padoan M, Guarrera S, Giordano M, Aspesi A, Mirabelli D, Casadio C, Ardisson F, Ruffini E, Betta PG, Libener R, Guaschino R, Matullo G, Piccolini E, Magnani C, Dianzani U. *XRCC1* and *ERCC1* variants modify malignant mesothelioma risk: A case-control study. *Mutat Res.* 2011; 708: 11-20.

Analyse

Le rôle de certains polymorphismes génétiques⁽⁴⁾ de type SNP⁽⁵⁾ (Single Nucleotide Polymorphism) dans la modulation de l'expression de gènes est connu pour certains gènes (Neri *et al.*, 2008), notamment des gènes suppresseurs de tumeur comme le gène *p53*. Les auteurs de cet article proposent de rechercher une association entre 35 SNP dans 15 gènes potentiellement impliqués dans la cancérogenèse du MP et la survenue de MP, chez 220 patients ayant eu un MP et 296 sujets témoins, dans les régions de Turin et de Casale-Monferrato, ville italienne connue pour sa forte pollution environnementale par l'amiante. Une exposition professionnelle ou environnementale à l'amiante a été identifiée chez 90 % des cas de MP et chez 74 % des sujets témoins. L'analyse multivariée en régression logistique a montré que des SNP des gènes de réparation de l'ADN *XRCC1* et *ERCC1* sont associés de façon statistiquement significative à la survenue de MP. En ce qui concerne le gène *XRCC1*, en tenant compte uniquement de l'exposition à l'amiante, une augmentation du risque de

survenue de MP statistiquement significative a été observée chez les sujets résidents à Casale-Monferrato, ayant un polymorphisme du gène *XRCC1*, soit en position 399Q avec un odds ratio (OR) à 1,44 [IC95 % (Intervalle de confiance à 95 %) : 1,02 - 2,03], soit en position IV53 A>C avec un OR à 1,43 [IC95 % : 1,02 - 2,01]. Par ailleurs, l'haplotype TGGGGGAACAGA dans ce gène était également significativement associé avec un risque de survenue d'un MP dans cette population, avec un OR à 1,76 [IC95 % : 1,04 - 2,96].

De même, en ce qui concerne le gène *ERCC1*, en tenant compte uniquement de l'exposition à l'amiante, une augmentation du risque de survenue de MP statistiquement significative a été observée chez les sujets résidents à Casale-Monferrato ou à Turin et ayant un polymorphisme de ce gène *ERCC1* en position N118N pour le variant TC avec un OR à 1,59 [IC95 % : 1,01 - 2,50]. Quand les auteurs ont pris en compte le polymorphisme dominant de la position N118N (*ERCC1* hétérozygotes CT et homozygotes CC *versus* homozygotes TT), le risque de survenue de MP était statistiquement significatif avec un OR à 1,61 [IC95 % : 1,06 - 2,47] chez tous les sujets (cas et témoins confondus résidents dans les 2 villes) sans tenir compte de l'exposition à l'amiante et avec un OR similaire à 1,56 [IC95 % : 1,02 - 2,40] en tenant compte uniquement des cas exposés à l'amiante.

La combinaison des polymorphismes du gène *ERCC1* en position N118N et du gène *XRCC1* en position R399Q était statistiquement significativement associée à un risque de survenue de MP avec pour les résidents de Casale-Monferrato un OR à 2,02 [IC95 % :

1,01 - 4,05] et pour les résidents des 2 villes un OR à 2,39 [IC95 % : 1,29 - 4,43].

Ainsi, d'après cet article, il existerait une association statistiquement significative entre certains polymorphismes de deux gènes de la réparation de l'ADN, *ERCC1* et *XRCC1*, et la survenue de MP humains suggérant l'hypothèse que chez certains sujets une susceptibilité génétique pourrait favoriser la cancérogenèse des cellules mésothéliales après exposition à des fibres d'amiante.

Commentaire

Les auteurs de cet article suggèrent qu'il existerait un rôle possible de certains polymorphismes génétiques de gènes de la réparation de l'ADN dans la genèse du MP, renforçant ainsi l'hypothèse du rôle des facteurs de susceptibilité génétique dans les mécanismes de cancérogenèse de l'amiante, avec toutefois, aux vues des odds ratios (OR), une implication beaucoup plus modeste des facteurs génétiques (OR autour de 1 à 2) dans la survenue de MP comparativement à ceux observés avec l'amiante (OR autour de 50 à 100 selon les études).

LATS2 est un gène suppresseur de tumeur dans le mésothéliome malin.

Murakami H, Mizuno T, Taniguchi T, Fujii M, Ishiguro F, Fukui T, Akatsuka S, Horio Y, Hida T, Kondo Y, Toyokuni S, Osada H, Sekido Y. *LATS2 is a Tumor Suppressor Gene of Malignant Mesothelioma*. Cancer Res. 2011; 71: 873-883.

Analyse

Le gène de la neurofibromatose de type 2 *NF2* est un gène suppresseur de tumeur codant pour la merline (ou schwannomine) qui est une protéine inhibant la prolifération cellulaire et la progression du cycle cellulaire. Le gène *NF2* est très fréquemment inactivé dans le mésothéliome humain et murin (environ 40 à 50 % des cas) (Fleury-Feith *et al.*, 2003; Altomare *et al.*, 2005; Lecomte *et al.*, 2005). Des auteurs ont suggéré que l'augmentation de l'expression d'un des régulateurs de la merline, le CPI-17, ou d'un microARN⁽⁶⁻⁷⁾ pourrait avoir pour cible l'inactivation du gène *NF2*. La voie de signalisation Hippo⁽⁸⁾, découverte récemment chez la drosophile, qui contrôle la croissance tissulaire en inhibant la prolifération cellulaire et en favorisant l'apoptose (mort cellulaire programmée), semble également réguler la cascade de signalisation de la merline *via* l'expression de protéines, comme la protéine *SAV1* (Salvador protein) ou les protéines de la famille LATS (LArge Tumor Suppressor) qui inactivent par phosphorylation le candidat oncoprotéine YAP (Yes-Associated Protein), co-activateur transcriptionnel⁽⁹⁾. Les auteurs de l'article ont donc voulu étudier les altérations génétiques du gène suppresseur de tumeur *LATS2* dans le mésothéliome pleural (MP).

Les auteurs ont tout d'abord analysé les altérations chromosomiques par la technique employant des puces CGH⁽¹²⁾ (Comparative Genomic Hybridization) sur 14 cultures primaires issues de MP humains. L'analyse de ces puces a montré que

21,4 % (3/14) des cultures primaires de MP avaient une délétion chromosomique au niveau du chromosome en position 13q12 où est localisé le gène *LATS2*. Les auteurs ont montré que 35 % (7/20) des cultures primaires de MP avaient un gène *LATS2* inactivé soit par une délétion homozygote (4/20), soit par une mutation génétique (3/20) localisée sur le gène. Les auteurs ont par la suite confirmé ces résultats sur un panel de 25 tissus tumoraux de MP humains à l'aide de puces CGH et par séquençage de l'ADN. Au total, 12 % (3/25) des tumeurs avaient une inactivation du gène *LATS2* par délétion homozygote, par mutation génétique ponctuelle (sur une seule base nucléotidique). Concernant les altérations de l'expression et l'inactivation des gènes *SAV1* et *NF2*, 60 % (12/20) des cultures primaires de MP étaient inactivées pour le gène *NF2* et une seule l'était pour le gène *SAV1*. Au total, 80 % (16/20) des cultures primaires de MP analysées avaient au moins une inactivation de l'un de ces 3 gènes. Par ailleurs, l'analyse en immunohistochimie montre que 36/45 tumeurs mésothéliales pleurales exprimaient l'oncogène YAP dont 33/36 avec un fort marquage nucléaire supérieur ou équivalent au marquage intracytoplasmique. Enfin, pour montrer le rôle du gène *LATS2* dans la dérégulation de la voie de signalisation merline/Hippo, les auteurs ont introduit, dans le génome des cellules mésothéliales non tumorales, un ADN plasmidique permettant d'insérer dans le génome de façon ciblée une mutation ou une délétion inactivant soit le gène *NF2*, soit le gène *LATS2* ou les 2. Ainsi, l'inactivation du gène *NF2* induit une phosphorylation de YAP. À l'inverse, l'inactivation des 2 gènes, *NF2* et *LATS2*, n'induit pas de phosphorylation de YAP, suggérant que *LATS2* doit nécessairement transmettre un signal inhibiteur de la merline vers YAP. Deux études complémentaires confirment cette hypothèse: d'une part, l'inhibition de l'expression de *LATS2* à l'aide d'un shRNA⁽¹⁰⁾ (short hairpin RNA) bloque la phosphorylation de YAP dans les cellules mésothéliales inactivées pour le gène *NF2*; d'autre part, la transduction du gène *LATS2* dans les cellules mésothéliales initialement inactivées pour le gène *LATS2*, permettant ainsi la restauration d'une expression de la protéine *LATS2*, se traduit par l'absence d'expression de la protéine YAP.

En conclusion, les auteurs suggèrent que l'inactivation de *LATS2* est un des mécanismes de l'activation constitutive de YAP, induisant ainsi une dérégulation de la prolifération cellulaire mésothéliale.

Commentaire

Les auteurs de l'article ont mis en évidence un nouveau gène suppresseur de tumeur fréquemment inactivé dans le mésothéliome humain: le gène *LATS2*. Les auteurs ont associé à leur étude descriptive des altérations génétiques du gène *LATS2* une étude mécanistique particulièrement intéressante montrant le rôle du gène *LATS2* dans la voie de signalisation Hippo/merline. Ainsi, le gène *LATS2* est impliqué dans la voie de signalisation Hippo/merline en inhibant, par phosphorylation, l'oncogène YAP. L'inactivation de la voie de signalisation Hippo/merline *via* le gène *LATS2* pourrait donc jouer un rôle critique dans la genèse du MP. Ces travaux pourraient à l'avenir contribuer, d'une part à mieux diagnostiquer les mésothéliomes, à mieux stratifier

les phénotypes tumoraux des MP, et d'autre part, à définir une nouvelle cible thérapeutique dans cette pathologie. En revanche, le rôle des fibres d'amiante dans l'inactivation du gène *LATS2* et notamment par des délétions chromosomiques n'a pas été abordé par les auteurs.

CONCLUSION GÉNÉRALE

En conclusion, ces deux articles originaux permettent d'avancer dans la compréhension des mécanismes moléculaires des voies de cancérogenèse dans le mésothéliome. Le premier article met en évidence des variations génétiques des gènes de réparation de l'ADN, *XCCR1* et *ECCR1*, associées à la survenue de mésothéliome. Certains variants génétiques peuvent être à l'origine de modification de l'expression de gènes. Dans le cas présent gènes de réparation de l'ADN, ce qui pourrait altérer les capacités de réparation de l'ADN de la cellule mésothéliale lors de la survenue d'une mutation génétique. Le second article met en avant un nouveau gène suppresseur de tumeur fréquemment muté dans le mésothéliome : le gène *LATS2* qui pourrait être joué un rôle critique dans la genèse du MP et devenir à l'origine d'un outil diagnostique complémentaire et d'une future cible thérapeutique.

Lexique

- (1) Oncogène : gène dont l'expression favorise la survenue de cancers par la synthèse d'une oncoprotéine stimulant la division, la différenciation et une prolifération cellulaire anarchique.
- (2) Protéine : macromolécule organique biologique composée d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. Les protéines sont essentielles à la vie d'une cellule. Selon le type de protéine, elles peuvent jouer un rôle structural dans la forme de la cellule (par exemple l'actine), dans la mobilité cellulaire (par exemple la myosine et la troponine dans la cellule musculaire), dans des réactions biochimiques (les enzymes), dans la régulation de la compaction de l'ADN (histones) ou dans l'expression des gènes (facteurs de transcription)...
- (3) ADN : Acide DésoxyriboNucléique : molécule organique hélicoïdale sous forme de double brins complémentaires dont chaque brin est composé d'une séquence de bases nucléotidiques successives (4 types de bases nucléotides A, T, C, G correspondant à un alphabet à 4 lettres) et renfermant l'information génétique sous forme de gènes codant au final pour des protéines, qui auront chacune une ou plusieurs fonction(s) biologique(s) dans l'organisme. L'ADN est contenu dans le noyau d'une cellule humaine.
- (4) Polymorphisme génétique : variation génétique avec co-existence de plusieurs allèles pour un même gène dans une population. Ces variations sont très fréquentes dans le génome humain.
- (5) Polymorphisme nucléotidique ou SNP : variation génétique d'un seul nucléotide (SNP en anglais pour single-nucleotide polymorphism) du génome dans une population. Les SNP représentent 90 % de l'ensemble des variations génétiques humaines.
- (6) ARN : Acide RiboNucléique : séquence nucléotidique correspondant à une copie simple brin temporaire d'un gène de l'ADN.
- (7) MicroARN (miARN) : il existe plusieurs centaines de miARN (ou mi RNA en anglais) chez l'Homme. Il s'agit d'ARN répresseurs post-transcriptionnels simples brins, longs d'environ 21 à 24 nucléotides, contrôlant l'expression de gènes en s'appariant à des ARN messagers, dont ils guident la dégradation et/ou, la répression de la traduction⁽¹¹⁾ en protéine.
- (8) Voie de signalisation Hippo : voie de signalisation découverte en 2003 chez des drosophiles mutées dénommée Hippo à cause de l'aspect morphologique de leurs têtes, leurs yeux et leurs cuticules. Ces mouches mutées présentent une dysrégulation entre la prolifération cellulaire et l'apoptose.
- (9) Transcription : processus biologique cellulaire se déroulant dans le noyau des cellules eucaryotes consistant à copier sous forme d'ARN, appelé ARN messager, des séquences de bases nucléotidiques d'un gène présent sur la molécule d'ADN.
- (10) shRNA (short hairpin RNA) : petit ARN en boucle de cheveu pouvant servir à inhiber l'expression d'une protéine spécifique.
- (11) Traduction : processus biologique cellulaire cytoplasmique correspondant à la synthèse des protéines par lecture de la séquence nucléotidique d'ARN messagers matures par les ribosomes (lecture par triplet de nucléotides appelé codon, mot à 3 lettres, correspondant chacun à un acide aminé ou à un signal stop) combinant ainsi une chaîne d'acides aminés.
- (12) Puce CGH ou Puce d'hybridation génomique comparative : la puce CGH (CGH array pour Comparative Genomic Hybridization en anglais) est une technique d'analyse génétique sur puces permettant d'analyser les variations du nombre de copies dans l'ADN.

Publications de référence

- Neri M et al.** Genetic susceptibility to malignant pleural mesothelioma and other asbestos-associated diseases. *Mutat Res.* 2008; 659: 126-136.
- Fleury-Feith J et al.** Hemizyosity of *NF2* is associated with increased susceptibility to asbestos-induced peritoneal tumours. *Oncogene.* 2003; 22: 3799-3805.
- Altomare DA et al.** A mouse model recapitulating molecular features of human mesothelioma. *Cancer Res.* 2005; 65: 8090-8095.
- Lecomte C et al.** Similar tumor suppressor gene alteration profiles in asbestos-induced murine and human mesothelioma. *Cell Cycle.* 2005; 4: 1862-1869.

Sekido Y. Genomic abnormalities and signal transduction dysregulation in malignant mesothelioma cells. *Cancer Sci.* 2010; 101: 1-6.

Revue de la littérature

Robinson BW, Musk AW, Lake RA. Malignant mesothelioma. *Lancet.* 2005; 366: 397-408.

Autres publications identifiées

Jean D et al. Syntenic relationships between genomic profiles of fiber-induced murine and human malignant mesothelioma. *Am J Pathol.* 2011; 178: 881-894.

Plusieurs modèles murins de mésothéliome exposés à l'amiante ont été développés dans le passé afin de mieux comprendre les mécanismes de cancérogenèse. À partir de ces modèles pour certains génétiquement modifiés sur des gènes d'intérêt (NF2, P16/CDKN2A notamment), certaines altérations génomiques ont été identifiées. Afin de mieux les préciser, les auteurs de cet article ont analysé les altérations génomiques communes aux mésothéliomes murins et humains par CGH array (16 et 35 cas, respectivement). L'altération chromosomique de la région 9p21 chez l'Homme, caractérisée le plus souvent par une délétion bi-allélique, est très fréquemment rencontrée dans ces 2 espèces, ce qui est en accord avec les délétions au locus CDKN2A/CDKN2B retrouvées fréquemment dans le mésothéliome humain et dans les modèles murins. Les pertes chromosomiques des régions 1p36.3-p35 et 13q14-q33 et les gains des régions 5p15.3-p13 sont fréquemment retrouvés dans les 2 espèces. Cependant, les auteurs mettent en évidence quelques différences entre les 2 espèces, comme l'absence des altérations récurrentes dans les régions chromosomiques murines correspondant au chromosome 22 humain. La comparaison des régions fréquemment altérées entre les patients exposés à l'amiante et ceux non exposés montre que la perte de la région chromosomique 14q11.2-q21 est retrouvée de façon statistiquement significative chez les sujets antérieurement exposés à l'amiante, ce qui est le cas dans les modèles murins de mésothéliome induit par une exposition à des fibres. Les auteurs mettent ainsi en évidence des similitudes entre le mésothéliome murin et humain contribuant ainsi à une meilleure compréhension de l'influence de l'exposition des fibres dans la physiopathologie du mésothéliome. Ces auteurs valident par la même occasion le modèle murin qui, selon eux, pourrait être employé dans de futurs tests thérapeutiques pré-cliniques.

Maeda M et al. Reduction of CXCR3 in an *in vitro* model of continuous asbestos exposure on a Human T-cell Line, MT-2. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010 (sous presse).

Afin de déterminer comment l'exposition à des fibres d'amiante engendre une diminution de la réponse immunitaire anti-tumorale, les auteurs de cet article ont employé un modèle *in vitro* de lignée cellulaire de lymphocytes humains T immortalisés par le virus HTLV-1, les cellules MT-2, exposées à de faibles doses d'amiante en continu. Les auteurs mettent en évidence que les cellules MT-2 exposées pendant plus de 8 mois étaient résistantes à l'apoptose et qu'elles

comportaient une diminution de l'expression membranaire du récepteur aux chimiokines CXCR3 et une diminution de production de l'interferon- γ (IFN- γ). Afin de confirmer ces résultats, les auteurs ont employé des lymphocytes humains T CD4+ fraîchement isolés de sujets sains, de sujets porteurs de plaques pleurales ou atteints d'un mésothéliome. Ils retrouvent une expression de CXCR3 et d'IFN- γ diminuée de façon statistiquement significative dans les lymphocytes T CD4+ des sujets porteurs de plaques pleurales ou atteints de mésothéliome par rapport aux sujets témoins, avec une diminution plus marquée chez les sujets atteints d'un mésothéliome. L'autre point important est que les sujets atteints d'un mésothéliome avec des lymphocytes T CD4+ et CXCR3+ avaient tendance à avoir une augmentation de la quantité de ligand CXCL10/IP10 dans le plasma. Les auteurs ont donc montré dans cet article une réduction de la réponse immunitaire anti-tumorale chez les patients exposés à l'amiante et que les protéines CXCR3, IFN- γ , et CXCL10/IP10 pourraient être des biomarqueurs diagnostiques.

Ou WB et al. AXL regulates mesothelioma proliferation and invasiveness. *Oncogene.* 2010; 30: 1643-1652

Les auteurs de cet article ont mieux caractérisé les mécanismes de prolifération et d'invasion du mésothéliome. L'activation des récepteurs des TK (tyrosine kinases) et du récepteur de l'EGF (epidermal growth factor) a été décrite dans certains sous-groupes de mésothéliome, ce qui a fait suggérer que les TK pourraient être une cible thérapeutique dans cette pathologie particulièrement chimiorésistante. Les auteurs ont utilisé une approche protéomique par purification d'immunoaffinité de la phosphotyrosine associée à de la spectrométrie de masse pour caractériser l'activation du récepteur TK dans des lignées cellulaires de mésothéliome. L'expression des protéines d'intérêt a ensuite été recherchée dans des tumeurs mésothéliales provenant de biopsies. L'expression et l'activation de la protéine AXL, de la famille des récepteurs TK sont connues pour leurs propriétés oncogénétiques dans d'autres cancers. La protéine AXL est exprimée et fortement activée dans 89 % (8/9) des lignées et dans 50 % (6/12) des tumeurs mésothéliales. Aucune mutation somatique du gène AXL n'a été retrouvée, mais tous les mésothéliomes exprimaient un transcrite alternatif d'AXL comportant une délétion dans l'exon 10, et 86 % (6/7) des lignées exprimaient le ligand d'AXL, GAS6 (growth arrest-specific 6). D'après des expériences montrant la modulation de la phosphorylation de la tyrosine AXL par l'absence de GAS6 sur un modèle génétiquement modifié dépourvu d'expression du ligand GAS6 et par l'administration exogène de GAS6, l'expression de GAS6 était fonctionnelle. L'inactivation de la protéine AXL par l'emploi d'un ARNsh spécifique supprime la migration des cellules tumorales mésothéliales et leur prolifération avec un arrêt du cycle cellulaire en G1. L'emploi de l'inhibiteur d'AXL, le DP-3975, inhibe la migration et la prolifération des cellules tumorales mésothéliales avec une forte activation d'AXL. La réponse engendrée par le DP-3975 a été caractérisée par l'inhibition des voies de signalisation PI3-Kinase/AKT/mTOR et RAF/MAPK.

Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

Asbestos, DNA repair gene, Mesothelioma, Tumor suppressor gene.