

# Sélection et décryptage

## L'innovation en cancérologie à travers la presse scientifique et médicale

### Des nouvelles de la course aux armements\*

La guerre est ouverte dans le pays du cancer du poumon... On sait depuis 15 ans que 15 à 20 % de ces cancers présentent des mutations activatrices du gène *EGFR*, déterminantes pour la prolifération cellulaire, et dont les plus fréquentes sont la mutation L858R et les délétions au niveau de l'exon 19. L'industrie pharmaceutique a su inventer des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK), le géfitinib et l'erlotinib, capables de détruire les cellules porteuses de ces mutations, car elles ne sont pas seulement oncogéniques mais également sensibilisantes vis-à-vis de ces agents [1, 2]. Mais les cellules cancéreuses ont su développer un bouclier contre ces nouvelles armes thérapeutiques : la mutation T790M. Quelques cellules bien cachées, invisibles à l'œil de la PCR (*polymerase chain reaction*) classique, étaient déjà munies de ce bouclier lors du traitement, qui les sélectionne et ne peut les empêcher de proliférer. L'industrie a alors su inventer un nouveau missile capable de percer ce bouclier : un nouvel ITK, l'osimertinib, capable de franchir l'obstacle que constitue le groupement méthyle de la méthionine à la pénétration du géfitinib ou de l'erlotinib dans l'ancre où vient se loger l'adénosine triphosphate (ATP), substrat universel des kinases. Comme lors de toute guerre, on s'attendait bien sûr à ce que les cellules cancéreuses développent un nouveau bouclier anti-missile afin de résister à l'osimertinib, et on en a identifié plusieurs. C'est le sujet de cette petite revue...

Rappelons qu'il a été montré en 2017, dans un grand essai randomisé de phase III, que l'osimertinib était plus actif que la combinaison platine - pémétréxed chez les patients en récurrence de cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) ayant été traités par un ITK de première génération et présentant une mutation T790M dans leur tumeur [3] ; le pourcentage de réponses passe de 31 à 71 % et la survie sans progression (SSP) est plus que doublée (10,1 mois contre 4,4). Utilisé dès la première ligne, avant l'émergence de la mutation T790M, l'osimertinib s'est montré supérieur aux ITK de première génération, permettant d'obtenir une SSP de 18,9 mois contre 10,2 [4], avec en outre une meilleure tolérance et une activité contre les métastases cérébrales que n'atteignent pas les autres ITK [5]. L'osimertinib est ainsi en passe de devenir le standard thérapeutique des patients ayant un CBNPC avancé ou métastatique présentant une mutation activatrice, sans tenir compte de la mutation T790M.

Malgré ces beaux succès, les tumeurs récidivent et les mécanismes de résistance émergent... Ils interviennent à plusieurs niveaux :

- le niveau de l'EGFR, bien sûr, qui concerne un quart à un tiers des patients résistants, avec de nouvelles mutations dont la plus fréquente est la C797S, qui ne permet plus la liaison covalente de l'osimertinib avec l'EGFR, gage de son activité prolongée ; mais aussi des mutations dans la partie *gatekeeper* de l'EGFR (L792X, G796X) ou au niveau de la boucle d'activation (L718Q, G724S, S768I) ; ou encore l'amplification du gène *EGFR* ;
- le niveau des autres récepteurs à activité tyrosine kinase qui viennent pallier le blocage de l'EGFR : amplification, parfois mutations activatrices des gènes *ERBB2* ou *MET* ; fusions oncogéniques des gènes *ALK*, *ROS1*, *FGFR3*, *NTRK3* ou *RET* ;
- le niveau des voies de signalisation en aval de l'EGFR : voie des MAP kinases avec des mutations oncogéniques des gènes *KRAS* ou *BRAF* ; voie de la PI3 kinase avec amplification du gène *PIK3CA* ;
- le niveau du cycle cellulaire, aboutissement des voies de signalisation de la prolifération, avec amplification des cyclines D1, D2 ou E1 (gènes *CCND1*, *CCND2*, *CCNE1*), ou encore de la kinase cycline-dépendante 6 (gène *CDK6*), ainsi qu'avec des mutations invalidantes du gène *CDKN2A* (qui code la protéine p16).

Notons que les mécanismes de résistance intrinsèque à l'osimertinib (c'est-à-dire survenant d'emblée) sont à peu de chose près les mêmes. La présence conjointe en *trans*, sur les allèles du gène *EGFR*, de la mutation C797S qui est responsable de la résistance à l'osimertinib mais conserve la sensibilité aux ITK de première génération, et de la mutation T790M, qui a les conséquences exactement opposées (résistance aux ITK de première génération et sensibilité à l'osimertinib), pose la question de la prescription conjointe des deux types d'ITK. Mais devant le caractère exceptionnel de cette situation, il n'a pas encore été répondu de façon formelle à cette question. Sans compter que si les deux mutations surviennent en *cis*, on peut s'attendre à une résistance croisée entre ITK de première génération et osimertinib...

Bien évidemment, des ITK de quatrième génération sont en développement pour combattre la mutation C797S, afin de disposer d'un missile anti-(bouclier-antimissile-anti-[bouclier-antimissile]). Et ainsi de suite dans cette fuite en avant... On peut ainsi traiter les patients porteurs de la triple mutation L858R-T790M-C797S avec l'EAI045, molécule toutefois inactive si la mutation oncogénique primaire est une délétion de l'exon 19 ; mais on dispose d'une molécule active contre les tumeurs porteuses de la triple mutation del(exon19)-T790M-C797S avec le brigatinib (qui

avait été développé pour le traitement des tumeurs présentant une activation oncogénique du gène *ALK*), ce qui compense... Et pour les tumeurs résistantes à l'osimertinib qui portent une altération oncogénique hors du champ de l'EGFR, on peut envisager d'associer cet anti-EGFR avec un anti-BRAF (comme le vémurafénib), un anti-MET (bientôt sur le marché), un anti-PI3K (qui se fait attendre), ou encore une anti-CDK4/6 (comme le palbociclib). Il reste aux cliniciens à évaluer ces combinaisons dans des conditions contrôlées. Nous ne manquons pas de pistes ni de molécules, mais de patients, peut-être... Nous savons toutefois, quelle que soit la combinaison, quels que soient les progrès de l'analyse génomique, quelles que soient les molécules disponibles, que des résistances émergeront : nous traitons nos patients, certes, mais pourrions-nous les guérir ?

\* Leonetti A, Sharma S, Minari R, Perego P, Giovannetti E, Tiseo M. Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2019, sous presse. Doi : 10.1038/s41416-019-0573-8.

## RÉFÉRENCES

1. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004 ; 304 : 1497-500.
2. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004 ; 350 : 2129-39.
3. Mok TS, Wu YL, Ahn MJ, et al. Osimertinib or platinum-pemetrexed in EGFR T790M-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2017 ; 376 : 629-40.
4. Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J, et al. Osimertinib in untreated EGFR -mutated advanced non-small cell lung cancer. *N Engl J Med* 2018 ; 378 : 113-25.
5. Wu YL, Ahn MJ, Garassino MC, et al. CNS efficacy of osimertinib in patients with T790M-Positive advanced non-small-cell lung cancer: data from a randomized phase III trial (AURA3). *J Clin Oncol* 2018 ; 36 : 2702-9.

Jacques Robert

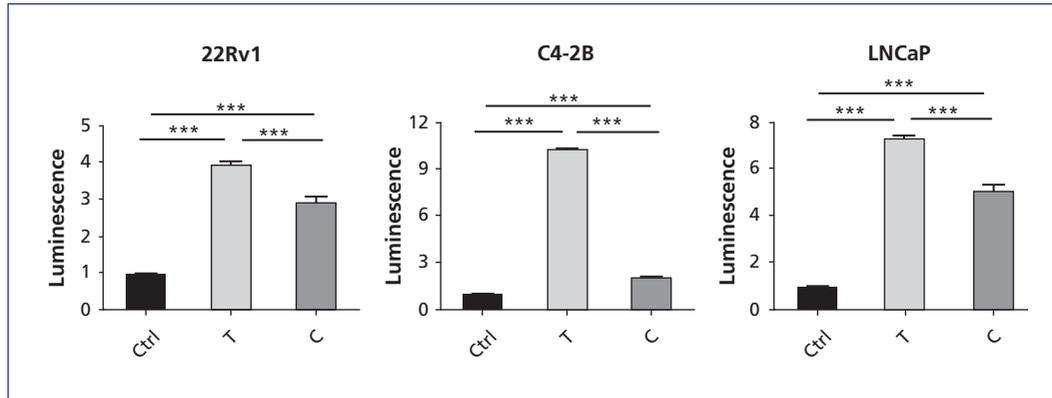
## Comment un SNP peut être en cause dans de multiples phénomènes\*

J'ai déjà relaté dans une brève l'histoire d'un SNP (*single nucleotide polymorphism*) associé au risque de cancer de la prostate et localisé dans le site de liaison d'un facteur de transcription [1]. En voici un autre. Mon objectif n'est pas de chercher et de présenter tous les polymorphismes associés au cancer de la prostate, mais de montrer comment une variation « de rien du tout » peut avoir des conséquences importantes. Bien sûr, quand un SNP est localisé dans la partie codante d'un gène, on pense inévitablement que la protéine correspondante est en cause, de par son expression ou son activité ; mais rien ne prouve que c'est le cas, et l'existence de SNP aux conséquences multiples et complexes n'est pas forcément l'apanage de ceux qui sont localisés dans des régions improbables. Peut-être faudrait-il chercher ailleurs que sous le lampadaire pour découvrir qu'un SNP d'une zone codante exerce un effet à distance, tout comme celui dont j'ai analysé le comportement l'an passé et celui qui est le sujet de la présente brève.

Ce SNP, rs55958994, découvert lors d'études GWAS (*genome-wide associations studies*) comme étant associé, parmi une centaine d'autres, au cancer de la prostate, est localisé en 12q13, dans le premier intron du gène *KRT8*, qui code l'une des nombreuses kératines des tissus épithéliaux. Sa fréquence allélique est de 8 à 12 %, c'est-à-dire qu'environ un sujet sur 100 porte cette variation à l'état homozygote. Les auteurs de l'article ont cherché à savoir par quel mécanisme il pouvait être associé au cancer de la prostate de façon très significative. On sait que des SNP de la région 8q24, comme rs1447295, rs16901979 et rs6983267, sont situés dans des *enhancers* qui régulent l'expression du gène *MYC*.

Pour savoir si tel était le cas du rs55958994, les auteurs ont cloné des fragments des deux allèles et les ont placés sous la dépendance du promoteur du gène de la luciférase, selon un procédé classique, dans trois lignées de cancer de la prostate ainsi que dans des lignées d'autres types de cancers. Effectivement, dans tous les cas, les deux allèles augmentent l'activité du promoteur, de façon plus marquée pour le variant (allèle T) que pour le sauvage (allèle C) (*figure 1*). Ils ont ensuite réalisé le *knock-out* homozygote de la région intronique contenant le polymorphisme, en utilisant la technique de CRISPR/Cas9. Cette extinction entraîne, dans trois clones distincts obtenus à partir de la lignée de cancer de la prostate 22Rv1, une diminution de 50 % de leur efficacité de clonage en agar et de 75 % de leur capacité migratoire (*figure 2*). Le profil d'expression des gènes de la lignée sauvage et de la lignée KO montre que plus de 2 500 gènes sont sous-exprimés après cette extinction ; ils sont essentiellement impliqués dans la signalisation intracellulaire, l'organisation de la matrice extracellulaire et la migration cellulaire. La séquence clonée porteuse du SNP est donc bien un *enhancer*.

Ensuite, à l'aide d'une technique de « capture chromosomique », les auteurs ont identifié 1 845 sites d'interaction potentielle de l'*enhancer* avec un autre gène, dont la plupart (85 %) sont situés en *cis*, c'est-à-dire sur le même chromosome, et moins de 15 % en *trans*, sur un autre chromosome. Huit gènes candidats émergent de la combinaison des approches (transcriptomique et capture chromosomique) ; deux sont localisés en *trans* (*CDH23* et *SIPA1*) et six en *cis* (*CNTN1*, *KRT8*, *FAIM2*, *KRT7*, *ITGA5* et *KRT18*) ; ce sont des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (*SIPA1* [*signal-induced*]).



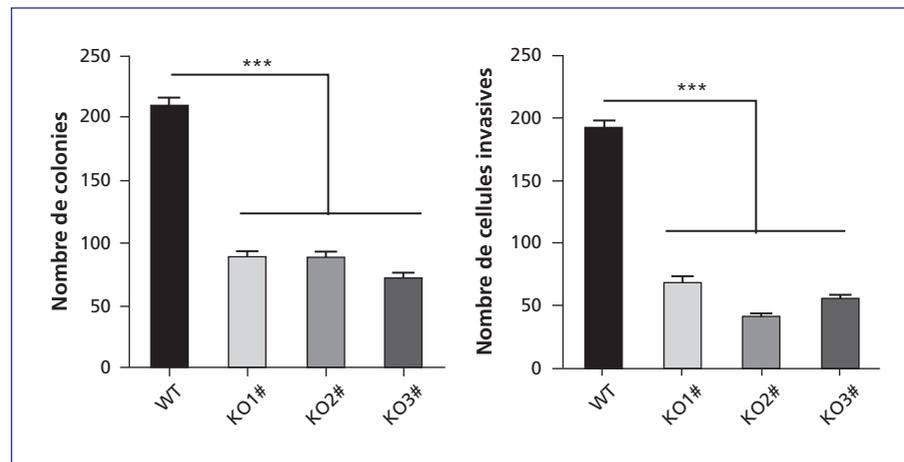
**Figure 1.** Activité de l'enhancer sur l'expression du gène de la luciférase dans trois lignées de cancer de la prostate. Cet enhancer augmente la luminescence cellulaire de façon plus importante lorsqu'il porte l'allèle T que lorsqu'il porte l'allèle C du SNP rs55958994. \*\*\* $p < 0,001$ .

**Figure 1.** Enhancer activity on the expression of luciferase gene in three cancer cell lines. The enhancer significantly increases cell luminescence in the presence of the T allele relative to the C allele of the SNP rs55958994. \*\*\* $p < 0.001$ .

proliferation-associated 1)), l'adhésion (*CDH23* [cadhérine 23], *KRT7/8/18* [kératines], *ITGA5* [intégrine  $\alpha_5$ ], *CNTN1* [contactine 1]) ou l'inhibition de l'apoptose (*FAIM2* [*Fas apoptotic inhibitory molecule 2*]), et les auteurs ont vérifié par RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) qu'ils étaient éteints dans les clones KO (figure 3). Ces gènes sont ainsi suspectés d'être des cibles directes de l'enhancer contenant le SNP, mais sont-ils responsables de l'augmentation du risque de cancer ? Pour répondre à cette question, les auteurs ont réintégré ces gènes dans la lignée ayant subi l'extinction de la région portant le SNP, et ils montrent que pour trois d'entre eux (*CNTN1*, *ITGA5* et *CDH23*), la prolifération cellulaire et la migration sont bien réduites (figure 4). Ce sont donc ces trois-là qui portent la responsabilité de l'augmentation du risque de cancer lié au polymorphisme de l'enhancer. Les gènes *CTNN1* et *ITGA5* sont, sur le chromosome 12,

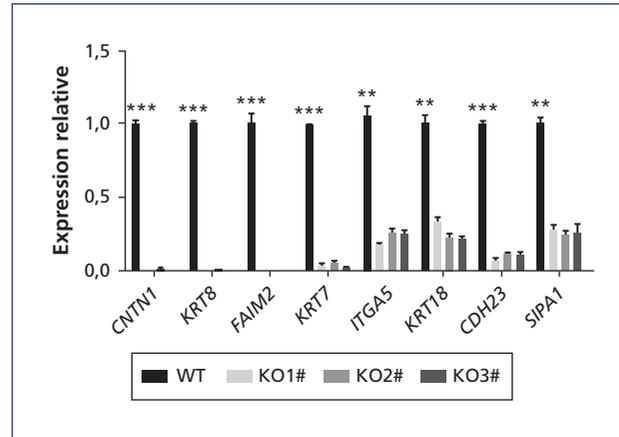
respectivement distants de 12 et 1,5 Mb de l'intron du gène *KRT8* qui porte l'enhancer, et le gène *CDH23* est porté par le chromosome 10 : c'est dire si l'action de l'enhancer se fait sentir à longue distance de ses cibles !

Revenant au SNP, les auteurs ont reconstruit par mutagenèse dirigée dans la lignée 22Rv1, les deux allèles C (sauvage) et T (variant associé au risque). Comme attendu, ils observent dans la lignée portant l'allèle T une augmentation de l'expression des gènes *CDH23* et *CNTN1*, mais pas du gène *ITGA5* (figure 5). Dans les lignées reconstruites, on observe bien une différence de phénotype : la lignée porteuse de l'allèle T présente une efficacité de clonage supérieure, une capacité migratoire plus élevée, une augmentation de la population de cellules souches  $CD44^+/CD24^-$ . Et, comme ils l'avaient fait pour les lignées porteuses ou non de la délétion de l'enhancer, ils ont étudié

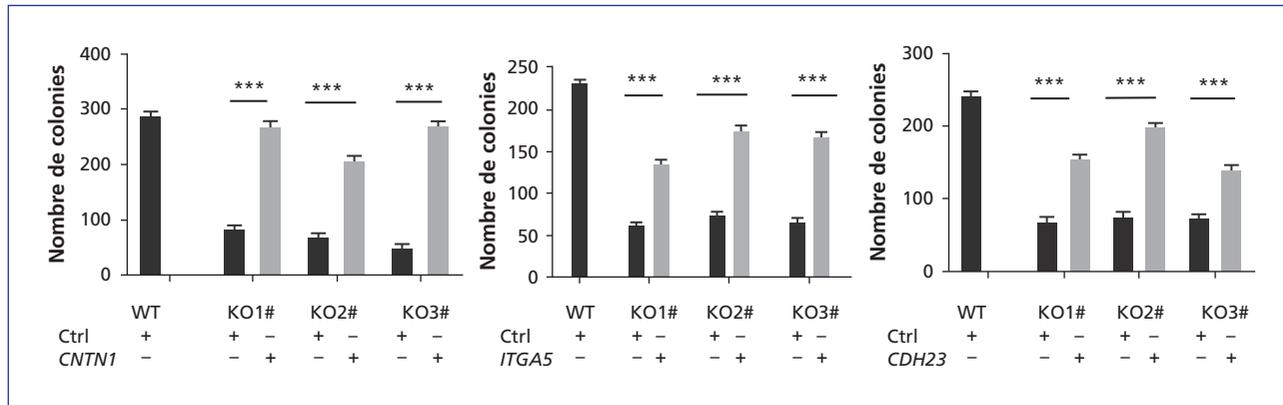


**Figure 2.** L'extinction de la région enhancer entraîne, dans trois clones distincts obtenus à partir de la lignée de cancer de la prostate 22Rv1, une diminution de 50 % de leur efficacité de clonage en agar et de 75 % de leur capacité migratoire. \*\*\* $p < 0,001$ .

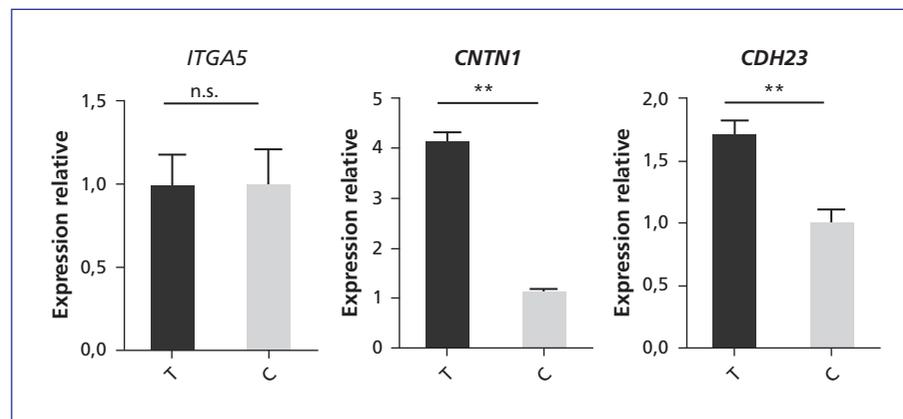
**Figure 2.** Knock-out of the enhancer region, based on three distinct clones obtained from the prostate cancer cell line 22Rv1, leads to a 50% decrease in cloning efficiency on agar and a 75% decrease in capacity to migrate. \*\*\* $p < 0.001$ .



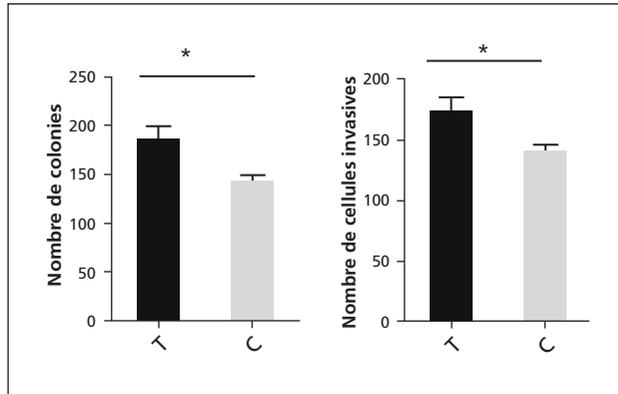
**Figure 3.** Expression évaluée par RT-PCR des huit gènes identifiés par capture chromosomique et transcriptomique dans les cellules de la lignée cancer de la prostate 22Rv1 ayant subi l'extinction de la région *enhancer*. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .  
**Figure 3.** RT-PCR of the eight genes identified by chromosomal and transcriptome capture analysis in the prostate cancer cell line 22Rv1 after knock-out of the enhancer region. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figure 4.** Efficacité de clonage des cellules de la lignée de cancer de la prostate 22Rv1 après extinction de la région *enhancer* dans trois clones distincts et réintroduction des gènes *CNTN1*, *ITGA5* et *CDH23*. \*\*\* $p < 0,001$ .  
**Figure 4.** Cloning efficiency of prostate cancer 22Rv1 cells following knock-out of the enhancer region for three distinct clones and reintroduction of the *CNTN1*, *ITGA5* and *CDH23* genes. \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figure 5.** Expression des gènes *CNTN1*, *ITGA5* et *CDH23* dans la lignée de cancer de la prostate 22Rv1 porteuses, après mutagenèse dirigée, de l'allèle T (variant à risque) ou C (type sauvage) du SNP rs55958994. \*\*\* $p < 0,01$ .  
**Figure 5.** Expression of *CNTN1*, *ITGA5*, and *CDH23* genes in prostate cancer 22Rv1 cells with a mutated T (risk variant) or C (wild-type) allele of the SNP rs55958994. \*\*\* $p < 0.01$ .



**Figure 6.** Efficacité de clonage et invasivité des cellules de la lignée de cancer de la prostate 22Rv1 porteuses, après mutagenèse dirigée, de l'allèle T (variant à risque) ou C (type sauvage) du SNP rs55958994. \* $p < 0,05$ .

**Figure 6.** Cloning efficiency and invasiveness of prostate cancer 22Rv1 cells with a mutated T (risk variant) or C (wild-type) allele of the SNP rs55958994. \* $p < 0.05$ .

le profil d'expression des gènes des deux lignées porteuses des allèles T et C : ils retrouvent beaucoup de gènes communs aux deux études, en particulier deux de nos trois gènes (*CNTN1* et *CDH23*), dont ils confirment la surexpression dans la lignée porteuse de l'allèle T alors qu'ils étaient, comme nous l'avons vu, sous-exprimés dans la lignée ayant subi le KO de l'*enhancer*. Et le gène *ITGA5*, lui, n'est toujours pas affecté de surexpression.

Cet article apporte une démonstration claire que les *enhancers* peuvent jouer sur des gènes situés à des distances *a priori* considérables de leur emplacement dans la séquence de l'ADN, mais qui se rejoignent physiquement par l'intermédiaire des protéines médiatrices qui se lient aux facteurs de transcription. En outre, cet article montre que la séquence précise de l'*enhancer* est cruciale : un simple SNP, si on peut utiliser ce pléonasse, peut modifier considérablement ses propriétés et participer ainsi à l'activité d'oncogènes ou de gènes supresseurs de tumeurs.

\* Qian Y, Zhang L, Cai M, et al. The prostate cancer risk variant rs55958994 regulates multiple gene expression through extreme long-range chromatin interaction to control tumor progression. *Sci Adv* 2019 ; 5(7) : eaaw6710. Doi : 10.1126/sciadv.aaw6710.

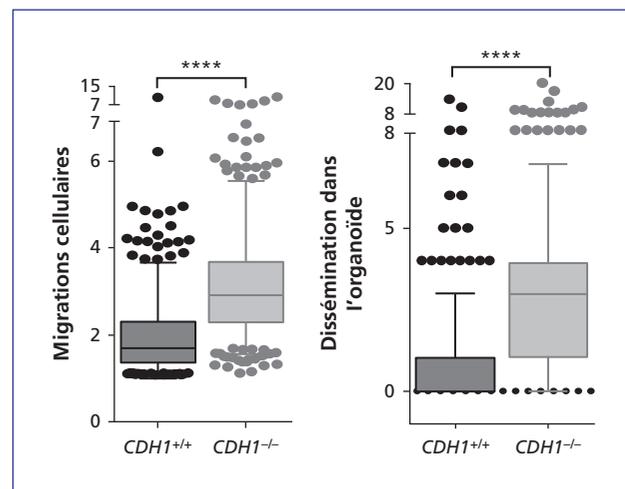
Jacques Robert

## La E-cadhérine, un suppresseur de tumeurs indispensable à la métastase des cancers du sein\*

La E-cadhérine est considérée depuis longtemps comme un suppresseur de tumeur et de nombreux travaux ont postulé, sur la base d'observations *in vitro*, que migration et métastase surviennent après la perte de cette protéine d'adhésion. Toutefois, les cancers canauxiers invasifs du sein expriment la E-cadhérine tant dans la tumeur primitive que dans la métastase, ce qui remet en question son rôle suppresseur de tumeurs – ou au moins de métastases. C'est cette incohérence que les auteurs ont voulu comprendre. Ils ont cherché pour cela quels étaient les requis génétiques de la E-cadhérine pour la dissémination métastatique dans une série de modèles murins et humains de cancers canauxiers du sein, d'origine luminaire ou basale.

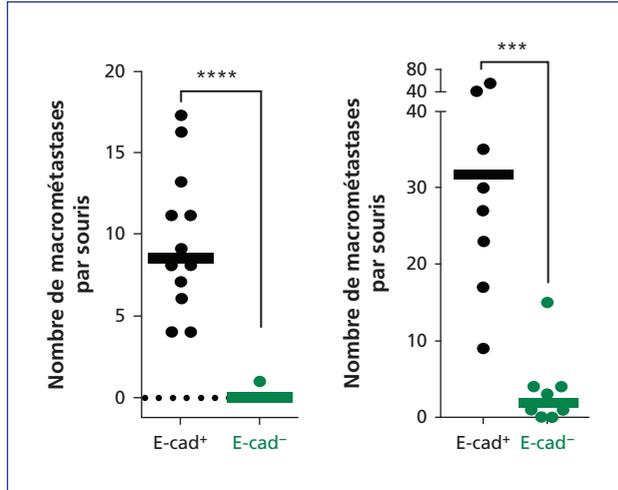
Sans entrer dans le détail de la construction génétique de leurs modèles, on peut cerner un certain nombre de résultats importants. La perte de la E-cadhérine inhibe bien *in vitro*, comme on s'y attendait, l'invasion et la dissémination des cellules à travers une matrice tridimensionnelle de collagène (figure 1). On s'attendrait donc à ce que le gène *CDH1* soit un suppresseur de métastases *in vivo* ; mais la métastase n'est pas seulement une affaire d'invasivité et de propension des cellules à se disperser : l'invasion n'est qu'une étape précoce dans la formation des métastases, et elle peut fort bien ne pas être l'étape limitante. Précisément, en transplantant de façon orthotopique les cellules *CDH1<sup>+/+</sup>* ou *CDH1<sup>-/-</sup>*, les auteurs observent une formation beaucoup plus

faible de métastases pulmonaires (micrométastases et macrométastases) lorsque les cellules n'expriment plus la E-cadhérine (figure 2).



**Figure 1.** *In vitro*, la perte de la E-cadhérine entraîne une augmentation de l'invasion et de la dissémination des cellules cultivées en organoïdes. \*\*\*\* $p < 0,0001$  (test de Mann-Whitney, bidirectionnel).

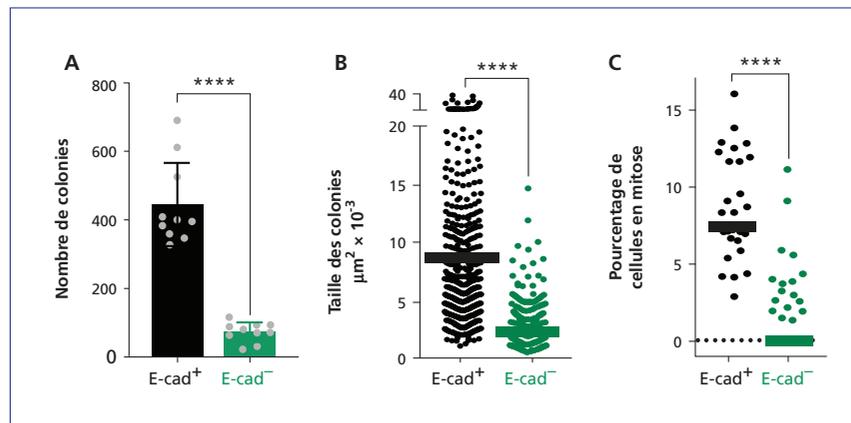
**Figure 1.** Loss of E-cadherin *in vitro* leads to an increase in invasion and dissemination of cells grown as organoids. \*\*\*\* $p < 0.0001$  (two-sided Mann-Whitney test).



**Figure 2.** *In vivo*, la perte de la E-cadhérine dans les cellules xenogreffées de façon orthotopique entraîne une diminution de la formation des macro-métastases et des micro-métastases pulmonaires chez la souris. \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*\* $p < 0,0003$  (test de Mann-Whitney, bidirectionnel).

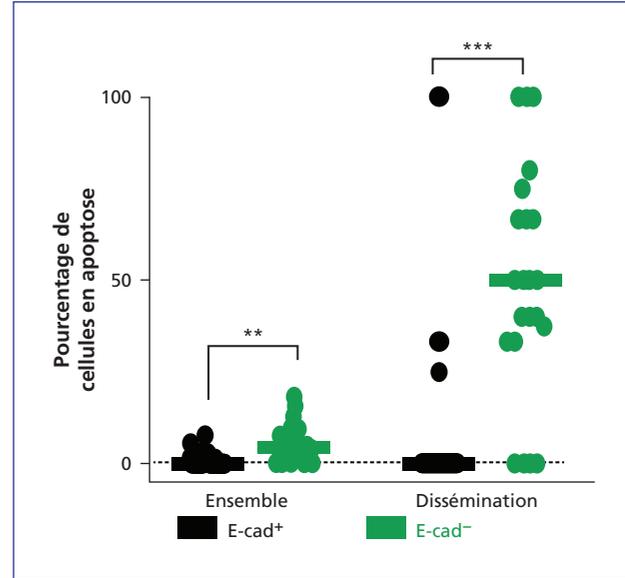
**Figure 2.** Loss of E-cadherin *in vivo* in cells xenografted orthotopically leads to a decrease in lung macro-metastases and micro-metastases in mice. \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\* $p < 0.0003$  (two-sided Mann-Whitney test).

Pour expliquer cette apparente contradiction entre les résultats *in vitro* et *in vivo*, les auteurs ont alors recherché quel était le rôle de la E-cadhérine sur la survie et la prolifération cellulaires. De façon inattendue, la perte de la E-cadhérine décroît fortement l'efficacité de clonage des cellules : la perte de la E-cadhérine entraîne une réduction du nombre de colonies d'un facteur 6 (figure 3A), de la taille des colonies d'un facteur 4 (figure 3B)



**Figure 3.** La perte de la E-cadhérine entraîne une réduction de la formation des colonies obtenues *ex vivo* après xénogreffe des cellules génétiquement modifiées chez la souris. Réduction du nombre de colonies d'un facteur 6 (A), de la taille des colonies d'un facteur 4 (B) et de la fraction des cellules en mitose d'un facteur 7 (C). \*\*\*\* $p < 0,0001$  (test de Mann-Whitney, bidirectionnel).

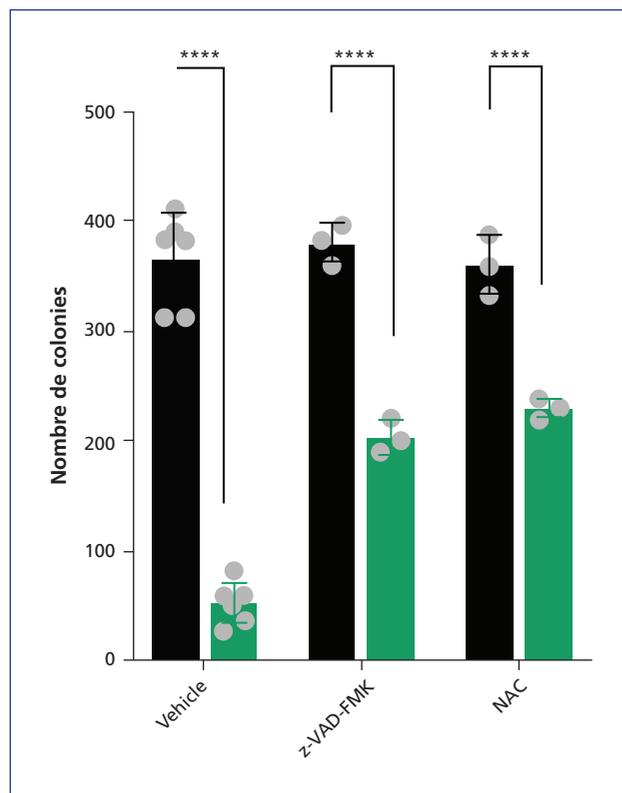
**Figure 3.** Loss of E-cadherin leads to a decrease in colony formation from cells obtained *ex vivo* from genetically modified cell xenografts in mice, showing a six-fold decrease in the number of colonies (A), a four-fold decrease in colony size (B), and a seven-fold decrease in the fraction of mitotic cells (C). \*\*\*\* $p < 0.0001$  (two-sided Mann-Whitney test).



**Figure 4.** La perte de la E-cadhérine entraîne une augmentation de la mort apoptotique des cellules dans l'ensemble de la tumeur (à gauche) comme dans les cellules en cours de dissémination (à droite). \*\* $p = 0,0016$ , \*\*\* $p < 0,0004$  (test de Mann-Whitney, bidirectionnel).

**Figure 4.** Loss of E-cadherin leads to an increase in apoptotic cell death, both in the bulk of the tumour (left) and disseminating cells (right). \*\* $p < 0.0016$ , \*\*\* $p < 0.0004$  (two-sided Mann-Whitney test).

et de la fraction des cellules en mitose d'un facteur 7 (figure 3C). Afin de valider ces résultats, les auteurs ont multiplié les modèles d'étude et sont retombés sur les mêmes conclusions : la perte de la E-cadhérine accroît l'invasion et réduit la métastase.



**Figure 5.** L'utilisation d'un inhibiteur de l'apoptose (z-VAD-FMK) ou d'un antioxydant (N-acétylcystéine, NAC) permet de restaurer partiellement la formation des colonies à partir de cellules n'exprimant plus la E-cadhérine (en vert) par rapport aux cellules l'exprimant (en noir). \*\*\*\* $p < 0,0001$  (test de Mann-Whitney test, bidirectionnel).

**Figure 5.** Use of an inhibitor of apoptosis (z-VAD-FMK) or an antioxidant (N-acetylcysteine) allows partial restoration of colony formation from cells which no longer express E-cadherin (green) relative to those expressing E-cadherin (black). \*\*\*\* $p < 0.0001$  (two-sided Mann-Whitney test).

La comparaison des profils d'expression génique des cellules  $CDH1^{+/+}$  et  $CDH1^{-/-}$  ne révèle pas de différences significatives dans l'expression des transcrits classiques de la transition épithélio-mésenchymateuse : il n'y a pas de perte des propriétés épithéliales des cellules ni de gain de propriétés mésenchymateuses. Toutefois, un certain nombre de gènes voient leur expression augmentée dans les cellules ayant perdu la E-cadhérine ; ce sont des gènes associés à un bon pronostic dans les cancers du sein humains (*Fgl1*, *Foxj1* et *Bmp2*). D'autres gènes sont en revanche surexprimés ; ce sont des gènes connus pour être pro-métastatiques (*Il33* et *Stfa3*). La E-cadhérine apparaît bien ainsi comme un promoteur de métastases. Sur les 127 gènes différenciellement exprimés, 35 codent des protéines impliquées dans l'apoptose : 24 gènes pro-apoptotiques sur 26 sont surexprimés, six gènes anti-apoptotiques sur neuf sont sous-exprimés. Il en résulte une augmentation de l'apoptose des cellules ayant perdu la E-cadhérine (figure 4). La E-cadhérine est donc une protéine de survie cellulaire. L'utilisation d'une molécule inhibitrice de l'apoptose ou d'un antioxydant le confirme *in vitro* (figure 5).

Les auteurs font enfin l'hypothèse que l'activation de la voie du  $TGF\beta$  est impliquée dans les effets pro-métastatiques de la perte de la E-cadhérine. À l'appui de cette hypothèse, ils rapportent diverses observations : les cellules  $CDH1^{-/-}$  expriment les facteurs de transcription SMAD2/3 dans le noyau, alors qu'ils restent confinés dans le cytoplasme des cellules témoins. Il reste toutefois bien du travail à faire pour étayer cette hypothèse. Bien sûr, comme tout biologiste, les auteurs essaient en conclusion de proposer des approches thérapeutiques, en postulant que l'inhibition de la survie cellulaire médiée par la E-cadhérine pourrait avoir un potentiel thérapeutique... Mais ceci est une autre histoire !

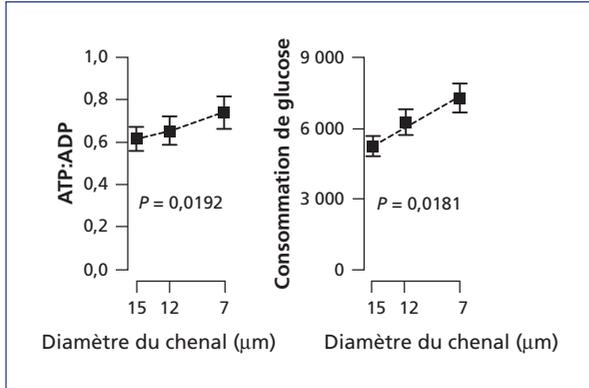
\*Padmanaban V, Krol I, Suhail Y, et al. E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer. *Nature* 2019 ; 573 : 439-44. Doi : 10.1038/s41586-019-1526-3.

Jacques Robert

## Le chemin le plus court vers la métastase est celui qui coûte le moins d'énergie\*

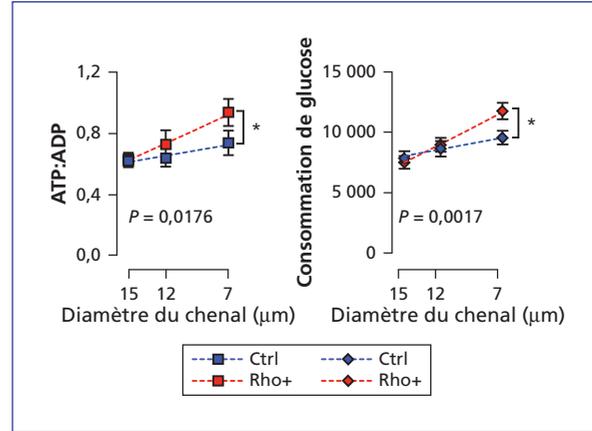
Une importante barrière physique s'oppose à la métastase : la matrice extracellulaire (MEC). Pour que des cellules puissent fuir le site original de la tumeur, la MEC doit être rompue, désorganisée ; des pores doivent s'y ouvrir, des chenaux y serpenter, par où passe une première cellule, puis d'autres qui en profitent et envahissent progressivement les tissus voisins – ce qui, au passage, explique le peu de succès des inhibiteurs de métalloprotéases dans le traitement des cancers. Mais pour naviguer ainsi dans le micro-environnement tumoral, les cellules malignes doivent consommer de l'énergie pour remodeler leur cytosquelette, pour poursuivre la dégradation de la MEC, pour se déplacer. Les auteurs

montrent dans cet article que les cellules, lorsqu'elles disposent de choix directionnels divers pour migrer, utilisent celui qui offre le moindre coût énergétique. Ce coût est fonction de la compliance de la MEC, c'est-à-dire de sa rigidité, et de la capacité des cellules à s'adapter, par leur changement de forme, à cet environnement hostile. Les auteurs ont créé des micropistes tridimensionnelles de collagène, en Y, pour mimer les chenaux ouverts dans la MEC dans lesquels migreront les cellules malignes. Après des essais de calibration de 5 à 20  $\mu\text{m}$ , ils observent que les cellules originaires de cancer du sein (lignée MDA-MB-231) touchent les parois de ces chenaux pour un diamètre de 11  $\mu\text{m}$ , et ne peuvent le franchir de ce diamètre de 6  $\mu\text{m}$ .



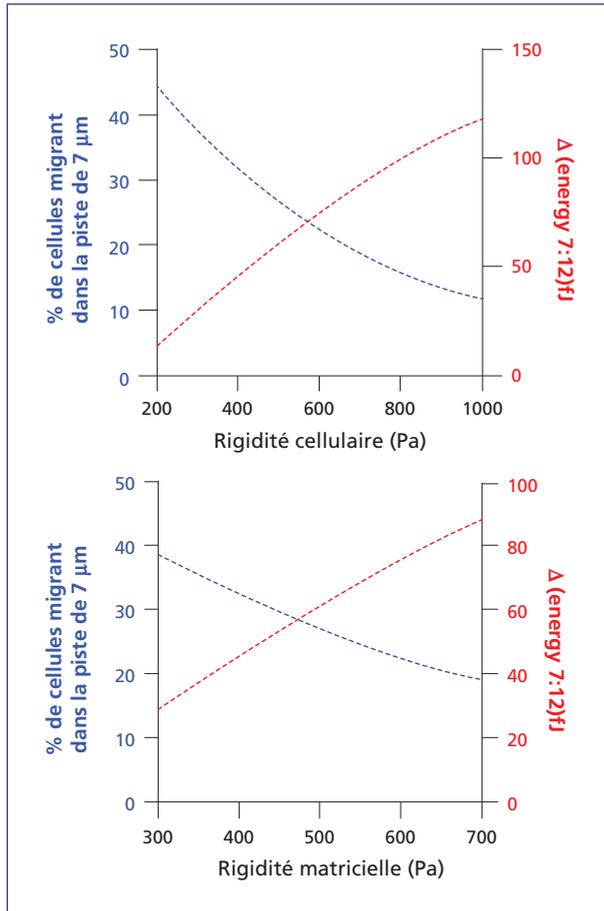
**Figure 1.** Augmentation du rapport ATP:ADP et de la consommation de glucose lorsque diminue le diamètre du chenal par où passent les cellules.

**Figure 1.** Increase in ATP:ADP ratio and glucose uptake relative to a decrease in diameter of the channel through which cells pass.



**Figure 3.** Exemple de résultat de la manipulation pharmacologique de la rigidité cellulaire sur le rapport ATP:ADP et la consommation de glucose : utilisation d'un activateur de RHOA.

**Figure 3.** An example of pharmacological manipulation of cell stiffness on the ATP:ADP ratio and glucose uptake: use of a RHOA activator.

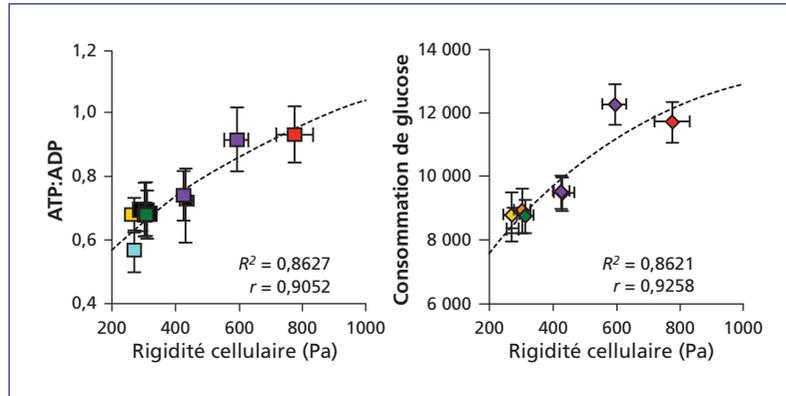


**Figure 2.** Résultats de la modélisation biophysique : le pourcentage de cellules « choisissant » le chenal de 7 μm diminue et le besoin en énergie augmente en fonction de la rigidité cellulaire ou matricielle.

**Figure 2.** Results of biophysical modelling: the percentage of cells "choosing" the 7-μm channel decreases and the energy requirement increases as a function of cell or matrix stiffness.

Les auteurs ont donc construit une micro-piste d'un diamètre de 15 μm dans la branche verticale et de 7 et 12 μm dans les branches latérales. Les cellules sont 70 % à choisir la branche de 12 μm, et plusieurs arguments montrent qu'elles le font de façon active. Elles modifient à la fois leur morphologie et celle de la matrice de collagène. Le remodelage du cytosquelette d'actine nécessite de l'énergie : cela est montré par l'évaluation du rapport ATP:ADP grâce à une sonde fluorescente, ainsi que par la consommation de glucose, qui augmentent tous deux quand diminue le diamètre du chenal (*figure 1*).

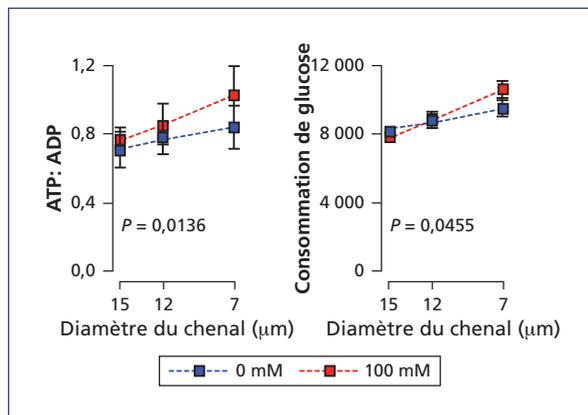
Ces premiers résultats ont permis aux auteurs de construire un modèle biophysique faisant varier la rigidité cellulaire et celle de la MEC dans un chenal de 7 μm de diamètre : le modèle prédit que la progression des cellules est ralentie dans les deux cas et que la consommation d'énergie est augmentée (*figure 2*). Revenant alors à leurs cellules afin de valider le modèle, ils en modifient la rigidité à l'aide de différents agents pharmacologiques ou manipulations génétiques : par exemple, un agent activateur de RHOA augmente la rigidité cellulaire, alors qu'un inhibiteur des kinases associées à RHOA la diminue. Cela leur permet d'obtenir une large gamme de valeurs de la rigidité cellulaire, de 271 à 775 Pa. Le rapport ATP:ADP et la consommation de glucose augmentent quand le diamètre du chenal est rétréci (*figure 3*) et cela est bien corrélé avec le degré de rigidité cellulaire (*figure 4*). Pour faire varier la rigidité de la MEC, les auteurs utilisent un collagène de différents degrés de glycation (0 ou 100 mM). De la même façon, le rapport ATP:ADP et la consommation de glucose augmentent tous deux avec la rigidité de la MEC (*figure 5*). La proportion de cellules se dirigeant vers le chenal de 7 μm diminue avec la rigidité cellulaire comme avec la rigidité de la matrice ; et le rapport ATP:ADP augmente dans les mêmes proportions (*figure 6*).



**Figure 4.** Corrélation entre le rapport ATP:ADP ou la consommation de glucose avec la rigidité cellulaire. Chaque point correspond à une manipulation expérimentale (pharmacologique ou génétique) distincte utilisée pour faire varier la rigidité cellulaire : activateur de RHOA, inhibiteur de la kinase activée par RHOA, etc.

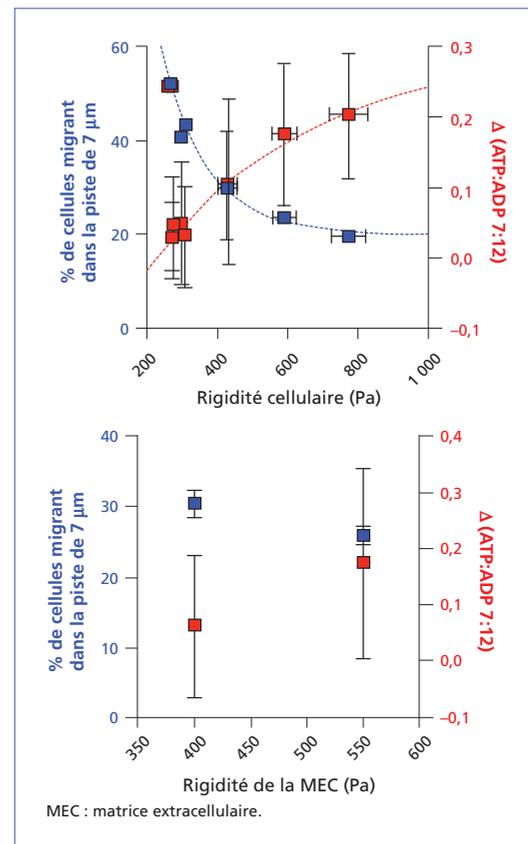
**Figure 4.** Correlation between ATP:ADP ratio or glucose uptake and cell stiffness. Each point corresponds to a distinct experimental manipulation (pharmacological or genetic) to modify cell stiffness: RHOA activator, RHOA-activated kinase inhibitor, etc.

Il s'agit là d'un très beau travail de biologie cellulaire bien éloigné, pour une fois, de la génomique et illustrant bien l'apport de la microfluidique pour résoudre des problèmes qui paraissent simples à première vue (il paraît intuitif que les cellules « choisissent » le chemin le moins consommateur d'énergie) mais qui nécessitent une expérimentation scientifique rigoureuse. La complaisance des cellules cancéreuses vis-à-vis des déformations mécaniques, supérieure à celle des cellules normales, leur confère un avantage sélectif pour les migrations et la métastase ; mais cette complaisance peut varier dans des proportions importantes d'un type de cancer à l'autre, et d'un cancer individuel à un autre dans la même pathologie : cela peut expliquer les différences



**Figure 5.** Résultat de la manipulation de la rigidité matricielle sur le rapport ATP:ADP et la consommation de glucose : utilisation de différentes concentrations de glycation de la MEC (0 et 100 mM).

**Figure 5.** The effect of manipulation of matrix stiffness on ATP:ADP ratio and glucose uptake: use of different concentrations of ECM glycation (0 and 100 mM).



**Figure 6.** Effets de la manipulation expérimentale de la rigidité cellulaire (à gauche) et matricielle (à droite) sur le pourcentage de cellules « choisissant » le chenal de 7 mm (en bleu) et le rapport ATP:ADP (en rouge). Comparer avec les données issues de la modélisation (figure 2).

**Figure 6.** Effects of manipulation of cell stiffness (left) and matrix stiffness (right) on the percentage of cells that “choose” the 7-mm channel (blue) and ATP:ADP ratio (red) (compare with the modelling data in figure 2).

importantes de la propension à métastaser d'un cancer à l'autre. Les besoins en énergie que la cellule manifeste pour migrer dans la MEC peuvent être un facteur limitant à la progression métastatique et sont dépendants à la fois de la rigidité cellulaire et de celle de la MEC : le ciblage du métabolisme cellulaire, que l'on sait de longue date être très particulier dans la cellule cancéreuse, reste d'actualité. Tout autant que contre la

prolifération cellulaire, il pourrait se révéler actif contre le pouvoir métastatique.

\* Zanotelli MR, Rahman-Zaman A, VanderBurgh JA, et al. Energetic costs regulated by cell mechanics and confinement are predictive of migration path during decision-making. *Nat Commun* 2019 ; 10 : 4185. Doi : 10.1038/s41467-019-12155-z.

Jacques Robert

## Les altérations génomiques commandent la dynamique de croissance des cancers : l'exemple de la leucémie lymphoïde chronique\*

Comment les altérations génomiques de chaque cancer peuvent-elles être reliées à l'évolution de ce cancer ? Cette question est un cas particulier d'une question fondamentale en biologie, – comment le génotype commande-t-il le phénotype ? – à laquelle il n'est pas facile de répondre. On sait bien que chaque cancer est unique sur le plan génomique, mais comment faire le lien entre le profil mutationnel unique d'un cancer et la façon dont il évolue chez un patient. L'astuce pour répondre à cette question était sans doute de choisir un modèle de cancer d'évolution très variable, lente chez la majorité des patients mais parfois rapide : la leucémie lymphoïde chronique (LLC), qui offre l'avantage de pouvoir être suivie sur le long terme avant la mise en place d'un traitement grâce à de simples numérations des leucocytes.

Les auteurs ont étudié la dynamique de croissance de la LLC chez 107 patients, qui peut s'étendre sur plusieurs décennies, et ont recherché des *patterns* génomiques associés à cette évolution. Sur une première cohorte de 21 patients, étudiés longitudinalement depuis le diagnostic jusqu'à la mise en place du traitement (de 2,1 à 15,6 ans), ils ont mesuré la leucocytémie, considérée comme représentative de l'état de la maladie, sur un grand nombre de prélèvements (de 4 à 83). Ils ont observé dans dix cas une croissance exponentielle, avec une croissance indéfinie au-delà de 1 000 G/L et une augmentation moyenne de 50 % par an ; dans cinq cas une croissance sigmoïdale (*logistic growth*) avec stabilisation de la numération entre 71 et 264 G/L ; et dans six cas une situation indéterminée lorsque le nombre de prélèvements était insuffisant (*figure 1*). Les patients dont la tumeur croît de façon sigmoïdale passent plus de temps sans traitement que ceux dont la tumeur croît de façon exponentielle (8,3 ans contre 5,6) et ont plus souvent des mutations de la région variable du gène des chaînes lourdes d'immunoglobulines (IGHV), un marqueur classique de bon pronostic.

Sur le plan génomique, les auteurs ont bien sûr utilisé le séquençage d'exome et ont mesuré une fréquence globale de 0,79 mutations par mégabase (0,19 par Mb pour les mutations synonymes, 0,60 par Mb pour les mutations non synonymes et 0,03 par Mb pour les insertions et délétions

[insdel]). Les mutations *driver* connues sont plus fréquemment rencontrées dans les tumeurs de croissance exponentielle (2 à 7, médiane = 4) que dans les tumeurs de croissance sigmoïdale (1 à 4, médiane = 1).

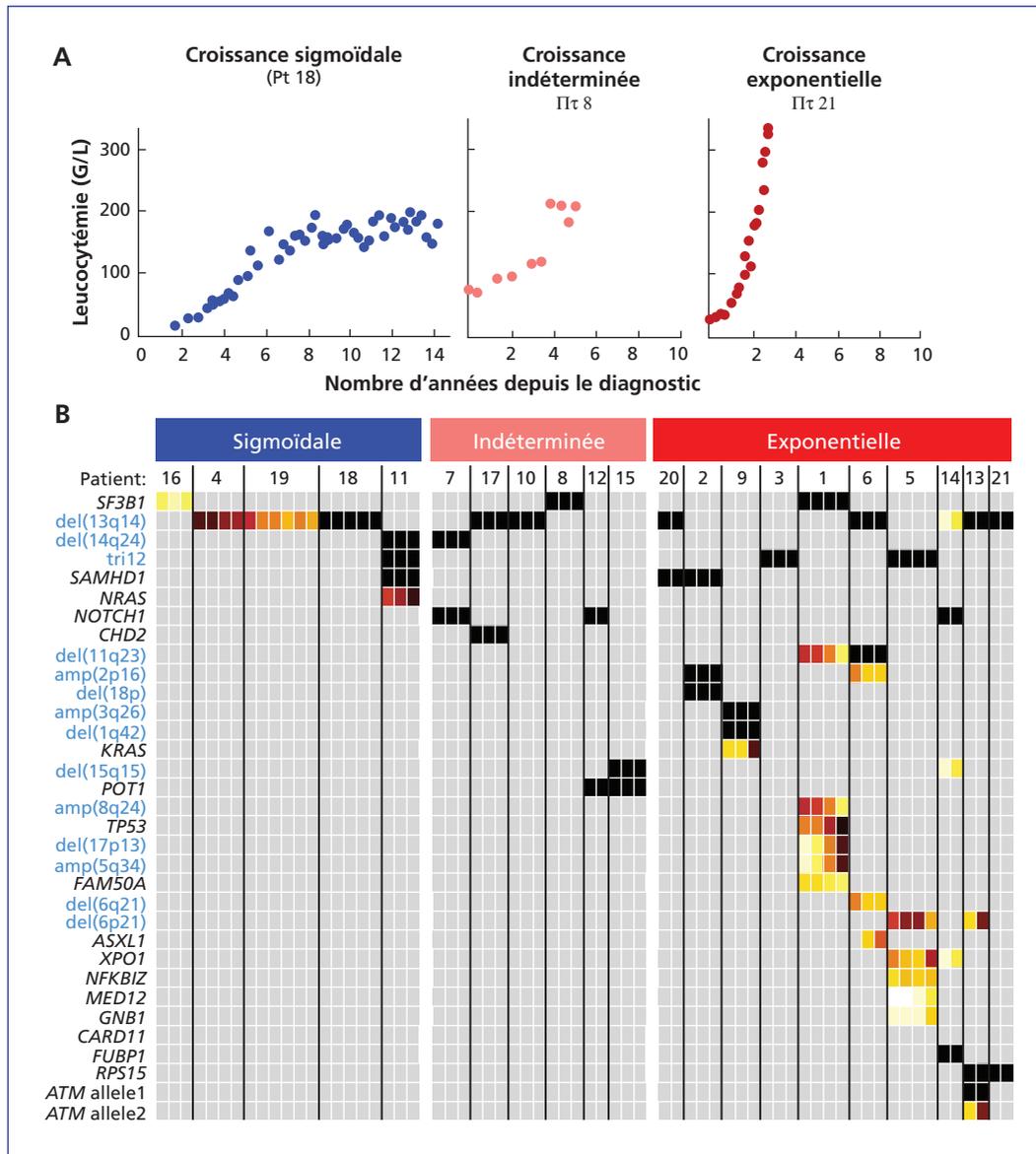
Une deuxième cohorte de 85 patients est venue valider les observations faites sur la première cohorte, avec des résultats sensiblement identiques. Cette extension a surtout servi aux auteurs pour savoir s'il était possible de prévoir l'évolution de la LLC à partir des altérations génomiques. En analyse univariée, les facteurs prédictifs de la mise en place d'un traitement (indicateur de l'aggravation de la maladie) sont le profil de croissance tumorale (exponentielle ou sigmoïdale), le statut mutationnel d'IGHV, la délétion 13q, le nombre de mutations de gènes *driver* et la dernière numération leucocytaire. En analyse multivariée, sortent le profil de croissance tumorale, la délétion 13q et la dernière numération leucocytaire.

Jusqu'à-là, et si le lecteur veut bien me « passer l'expression », les auteurs ont enfoncé quelques portes ouvertes : l'évolution est péjorative quand le nombre de leucocytes augmente de façon exponentielle (on le savait déjà) ; plus une tumeur contient de gènes *driver* porteurs d'une mutation, plus le nombre de leucocytes augmente (on s'en doutait). Il n'est pas besoin, pour suivre l'évolution de la LLC, de génotyper l'exome entier : il suffit d'un bon vieux compteur de cellules... Du titre de l'article et de la revue où il est publié, j'attendais mieux à ce stade de ma lecture.

Que se passe-t-il sous traitement ? Sur les 21 patients de la première cohorte suivis jusqu'à la mise en place du traitement, 12 ont rechuté avec un intervalle médian de 1,88 an entre les deux traitements, et dix d'entre eux ont fait l'objet de nouvelles analyses génomiques. Six patients avaient une augmentation de 10 à 100 % du nombre de cellules porteuses de mutations, avec apparition de nouvelles mutations dans des gènes *driver* de la LLC comme *GNB1*, *CDKN2A*, *ATM* et *BIRC3*. Tous les six avaient, avant le premier traitement, une croissance tumorale de type exponentiel. En revanche, les quatre autres patients avaient conservé l'architecture génomique antérieure et avaient avant traitement une tumeur

de croissance sigmoïdale. Il existe donc une association parfaite entre la croissance de la leucémie avant traitement et son évolution clonale après traitement. Les auteurs détaillent, patient après patient, l'évolution des sous-clones caractérisés par l'apparition de nouvelles mutations, mais rien de généralisable n'apparaît.

Ils vont jusqu'à calculer les différences de croissance des sous-clones afin de montrer que l'apparition de nouvelles mutations de gènes *driver* est un marqueur péjoratif de l'évolution de la maladie, alors que d'autres mutations apparues après traitement sont sans doute *passenger* parce qu'elles ne sont pas liées à cette



**Figure 1.** (A) Évolution du nombre de leucocytes au cours du temps chez trois patients représentatifs d'une croissance sigmoïdale (à gauche), indéterminée (au centre) et exponentielle (à droite). (B) Mutations et variation du nombre de copies de gènes ou de processus *driver* de l'oncogenèse dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC) chez les patients dont l'évolution tumorale est de type sigmoïdal (à gauche), indéterminé (au centre) ou exponentiel (à droite). Les couleurs, du blanc au noir, sont choisies en fonction de la proportion de cellules porteuses de l'altération génomique considérée. On voit que le nombre d'événements génomiques est plus élevé quand la croissance tumorale est rapide.

**Figure 1.** (A) Evolution of the number of leukocytes over time in three patients, representative of sigmoidal (left), indeterminate (centre) and exponential (right) growth. (B) Mutations and variation in the number of gene copies or oncogenic drivers in CLL in patients with sigmoidal (left), indeterminate (middle) or exponential (right) tumour progression. The colours, from white to black, represent the proportion of cells carrying genomic alterations. Note that there are more genomic events when tumour growth is rapid.

progression (raisonnement parfaitement circulaire), mais je n'entrerai pas, pour cet exposé, dans les détails individuels.

En définitive, rien de bien original, rien de bien nouveau. Un article purement descriptif (observationnel) comme les aime bien *Nature*, mais avec des moyens défiant toute concurrence : je n'ai pas compté de façon précise le nombre de séquençages d'exome entier (WES) ou de génome entier (WGS) mais il dépasse la centaine. Même si le séquençage par les techniques massives parallèles est de moins en moins coûteux, la numération globulaire est tout de même plus abordable... J'attendais une identification précise des liens entre l'apparition de telle ou telle mutation et l'évolution de la maladie, mais hélas il n'y a rien de solide à retirer de ce

travail. On en revient à la question que posent tous les patients : « C'est grave, docteur ? ». La réponse proposée par les auteurs est la suivante : « On va étudier le génome de vos cellules malignes au fil du temps, et si on trouve de plus en plus de mutations, alors oui, c'est grave ». Celle que je proposerais est plus simple mais ne sera pas publiée dans *Nature* : « On va surveiller le nombre de vos leucocytes par litre de sang, et s'il augmente rapidement, alors oui, c'est grave ».

\* Gruber M, Bozic I, Leshchiner I, et al. Growth dynamics in naturally progressing chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2019 ; 570 : 474-9. Doi : 10.1038/s41586-019-1252-x.

Jacques Robert