

Un peu moins de répit pour les cancers du foie ?

Jean Rosenbaum, Ludovic Ménard, Valérie Haurie, Danièle Taras

Inserm U889, Université Victor Segalen-Bordeaux 2,
146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France.
jean.rosenbaum@gref.u-bordeaux2.fr

Malgré d'importants progrès récents, les mécanismes moléculaires de la carcinogenèse hépatique restent très imparfaitement connus. Plus encore, les perspectives thérapeutiques sont extrêmement minces. C'est pour cette raison que notre équipe a décidé de rechercher de nouveaux acteurs de la carcinogenèse hépatique, et de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles, à l'aide d'une étude comparative du protéome de quatre carcinomes hépatocellulaires (CHC) et du foie péri-tumoral correspondant [1]. Ce travail a permis de mettre en évidence de nombreuses protéines dont l'expression est dérégulée dans les CHC, et parmi elles, la reptine (encore appelée RUVBL2, TIP48 ou TIP49b). Jusqu'alors, la reptine avait été étudiée essentiellement dans des organismes modèles où elle avait été détectée dans des complexes de haut poids moléculaire impliqués dans

le remodelage de la chromatine, la régulation transcriptionnelle, ou la réparation de l'ADN, comme INO80 [2] ou TIP60 [3]. La reptine a une importante homologie avec la pontine ; ces deux protéines sont proches de l'hélicase bactérienne RuvB et appartiennent à la famille des AAA+ ATPases. Elles interagissent l'une avec l'autre en formant des dodécamères contenant un hexamère de chaque protéine [4]. Notre attention avait été attirée par l'interaction de ces protéines avec deux oncogènes importants pour le CHC, la β -caténine [5] et c-myc [6]. La plupart des travaux montraient que la reptine se comportait comme un antagoniste de l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine/TCF-LEF alors que la pontine avait une activité agoniste ; cependant, récemment d'autres travaux ont révélé que la reptine était nécessaire à l'effet répresseur de la β -caténine sur

l'expression du gène anti-métastatique KAI-1/CD82 [7].

Rôle de la reptine dans les carcinomes hépatocellulaires

Dans notre travail [8], nous avons d'abord examiné en détail l'expression de la reptine dans les CHC provenant de la collection de CHC réalisée à Bordeaux dans le cadre du Centre de Ressources Biologiques sur le CHC (<http://chc.isped.u-bordeaux2.fr/>). L'étude faite sur 96 cas de CHC par RT-PCR en temps réel, en collaboration avec l'équipe de Jessica Zucman-Rossi (INSERM U674), a confirmé la surexpression de la reptine dans la majorité des tumeurs. En utilisant les annotations de ces tumeurs, nous avons pu démontrer qu'un taux élevé de reptine était un facteur indépendant de mauvais pronostic. Les taux de reptine n'étaient en revanche pas influencés par la pré-

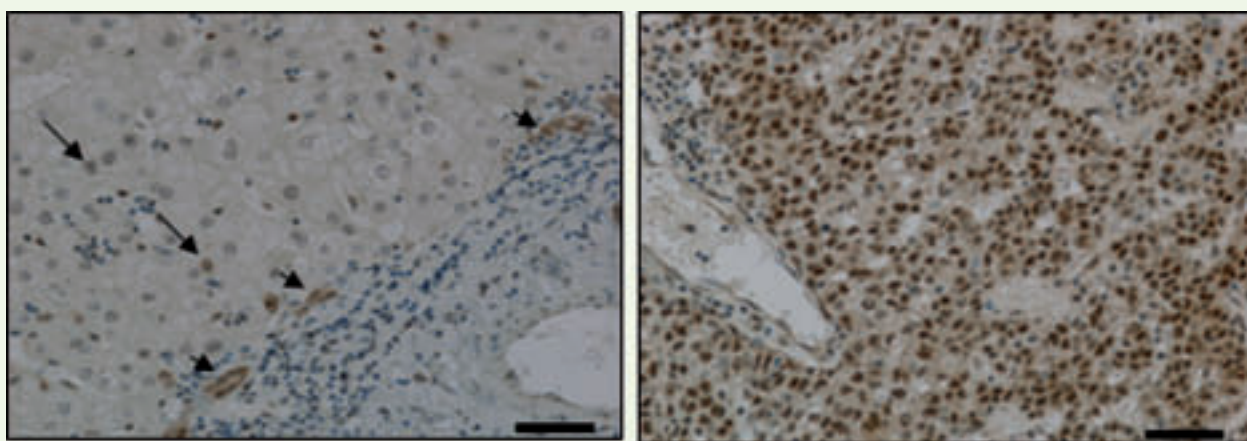


Figure 1. Mise en évidence de la surexpression de la reptine dans un CHC par immunohistochimie. La partie gauche représente une partie non tumorale du foie qui présente un faible marquage dans le noyau de certains hépatocytes (flèches) et un marquage intense dans les cellules épithéliales biliaires (têtes de flèches) en périphérie d'une bande fibreuse. La tumeur (à droite) présente un marquage intense de toutes les cellules tumorales dans le noyau et dans le cytoplasme. La barre indique 50 μ m.

sence d'une mutation activatrice de la β -caténine et n'étaient pas non plus corrélés au taux d'expression de c-myc. Afin d'analyser le rôle de la reptine dans la carcinogenèse hépatique, nous avons modulé son expression dans des cellules de CHC en culture. L'expression de la reptine a été diminuée de façon très efficace par transfection transitoire de petits ARN interférents. Cette diminution entraîne un arrêt de croissance des cellules avec un double blocage du cycle cellulaire en G1 et en G2/M. Celui-ci est suivi d'une mort apoptotique, associée à l'activation conformationnelle des protéines pro-apoptiques Bax et Bak et de la caspase 3. La déplétion de la reptine s'accompagne aussi d'une augmentation de l'expression au niveau transcriptionnel de nombreuses protéines pro-apoptiques (Bad, Bak, Bid, BclXs).

Ces résultats suggéraient que la reptine était nécessaire à la croissance et à la survie des cellules de CHC. Nous avons alors conduit les expériences réciproques en surexprimant la reptine dans ces cellules à l'aide d'un vecteur lentiviral codant la reptine avec une étiquette Flag. Malgré l'obtention par cette méthode d'un taux élevé d'ARNm de la reptine, il n'a pas été possible de surexprimer très efficacement la protéine : cette discordance, qui démontre l'existence d'un contrôle post-transcriptionnel, fait l'objet actuellement de travaux dans le laboratoire. En dépit de la surexpression limitée, les cellules exprimant la Flag-reptine démontrent des avantages nets par rapport aux cellules témoins. Elles ont ainsi une capacité de croissance accrue en agar mou

et sont plus résistantes que les témoins à l'apoptose induite par le céramide. Enfin, injectées sous la peau de souris immunodéprimées, elles forment des tumeurs plus rapidement progressives. Ainsi toutes les données concordent pour indiquer que la surexpression de la reptine dans les CHC pourrait jouer un rôle important dans la progression tumorale, notamment en protégeant les cellules tumorales de l'apoptose. Le mécanisme intime de cet effet, et notamment le lien éventuel avec la β -caténine et c-myc, reste à préciser.

Relocalisation de la reptine dans le cytoplasme des cellules tumorales

De façon inattendue, nous avons aussi mis en évidence par immunohistochimie une relocalisation partielle de la reptine dans le cytoplasme des cellules tumorales, alors qu'elle était exclusivement nucléaire dans les hépatocytes normaux (Figure 1). Ces résultats suggèrent que la reptine pourrait jouer un rôle spécifique dans le cytoplasme des cellules tumorales. Une hypothèse est qu'elle pourrait y séquestrer un facteur pro-apoptotique avec lequel elle interagit, comme Hint-1 [9] ou ATF-2 [10]. Notre équipe tente d'élucider le mécanisme du trafic nucléo-cytoplasmique de la reptine ainsi que ses fonctions cytoplasmiques.

C'est à notre connaissance la première fois qu'une analyse protéomique comparative de CHC a mis en évidence une protéine dont l'importance physiopathologique potentielle a pu être secondairement démontrée par des expériences de génomique fonctionnelle. La surexpression de la reptine dans un cancer n'avait pas été rapportée directement avant ce travail. Néanmoins, l'analyse de données de transcriptome publiées (<http://www.oncomine.org>) permet de retrouver aussi une surexpression dans 3 autres types de cancers (Figure 2). Globalement, la reptine pourrait être une cible dans le traitement des CHC et peut-être d'autres tumeurs, en particulier dans la mesure où elle porte une activité enzymatique (ATPase) contre laquelle on pourrait trouver des inhibi-

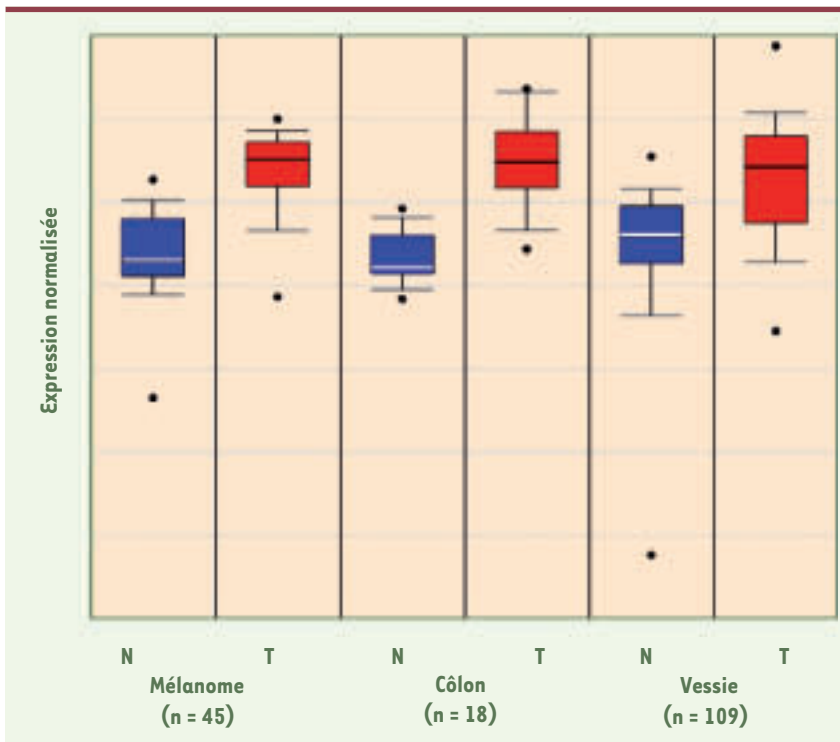


Figure 2. Expression de l'ARNm de la reptine dans divers types de cancers. Le graphe représente les niveaux d'expression normalisés de l'ARNm de la reptine mesurés par la technologie Affymetrix dans des tissus normaux (N) et dans les tumeurs du même tissu (T). Le haut et le bas de chaque boîte représentent les 75^e et 25^e percentiles, respectivement. Les moustaches représentent les écarts maximaux et la ligne horizontale dans la boîte représente la valeur médiane de la distribution. Les données ont été obtenues sur le site Oncomine (<http://www.oncomine.org>) et proviennent des études suivantes : pour le mélanome [11] ; pour le cancer du côlon [12] ; pour le cancer de la vessie [13].



teurs. Nous utilisons actuellement différents modèles animaux afin d'apporter la preuve du concept que la reptine est effectivement une cible attractive. ♦

A little less respite for hepatocellular carcinoma?

RÉFÉRENCES

- Blanc JF, Lalanne C, Plomion C, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in hepatocellular carcinoma developed in patients with chronic viral hepatitis C. *Proteomics* 2005; 5: 3778-89.
- Shen X, Mizuguchi G, Hamiche A, et al. A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* 2000; 406: 541-4.
- Ikura T, Ogryzko VV, Grigoriev M, et al. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* 2000; 102: 463-73.
- Puri T, Wendl P, Sigala B, et al. Dodecameric structure and ATPase activity of the human TIP48/TIP49 complex. *J Mol Biol* 2007; 366: 179-92.
- Bauer A, Chauvet S, Huber O, et al. Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity. *EMBO J* 2000; 19: 6121-30.
- Wood MA, McMahon SB, Cole MD. An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol Cell* 2000; 5: 321-30.
- Kim JH, Kim B, Cai L, et al. Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes. *Nature* 2005; 434: 921-6.
- Rousseau B, Ménard L, Haurie H, et al. Overexpression and role of the ATPase and putative DNA helicase RuvB-like 2 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007; 46: 1108-18.
- Weiske J, Huber O. The histidine triad protein Hint1 interacts with Pontin and Reptin and inhibits TCF-beta-catenin-mediated transcription. *J Cell Sci* 2005; 118: 3117-29.
- Cho SG, Bhoumik A, Broday L, et al. TIP49b, a regulator of activating transcription factor 2 response to stress and DNA damage. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 8398-413.
- Talantov I, Mazumder A, Yu JX, et al. Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7234-42.
- Graudens R, Boulanger V, Mollard C, et al. Deciphering cellular states of innate tumor drug responses. *Genome Biol* 2006; 7: R19.
- Sanchez-Carbayo C, Socci ND, Lozano J, et al. Defining molecular profiles of poor outcome in patients with invasive bladder cancer using oligonucleotide microarrays. *J Clin Oncol* 2006; 24: 778-89.

NOUVELLE

Nouveau dialogue entre récepteurs et protéines G trimériques « Une danse à corps enlacés »

Céline Galés, Michel Bouvier

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent la plus grande classe de récepteurs membranaires. Ils régulent un large éventail de processus physiologiques et représentent donc des cibles importantes pour le développement de médicaments. Les RCPG assurent la conversion de signaux extracellulaires en messages intracellulaires via des protéines G hétérotrimériques $\alpha\beta\gamma$. Selon le modèle « collisionnel » généralement accepté et déduit d'expériences réalisées dans des systèmes reconstitués, l'activation de la protéine G passe par son recrutement par le RCPG occupé par l'agoniste, suivi de sa dissociation en sous-unités α et dimères $\beta\gamma$ capables d'agir sur leurs effecteurs respectifs [1] (Figure 1A). Bien que différentes techniques biophysiques permettent d'appréhender les changements conformationnels du RCPG ou de la protéine G consécutifs à leur activation [2], la dynamique des réar-

rangements structuraux se produisant à l'interface des deux partenaires est à ce jour encore inconnue.

Nous avons récemment étudié les relations RCPG/protéine G et les mécanismes d'activation de celle-ci en tirant profit du principe biophysique de transfert d'énergie bioluminescente par résonance (BRET) [3]. Ce transfert d'énergie se produit entre une protéine donneuse d'énergie, la luciférase de *Renilla reniformis*, et une protéine acceptrice d'énergie, un variant de la protéine fluorescente verte, GFP [4] lorsque la distance entre partenaires est inférieure à 100Å. Il est très sensible à ce paramètre car son efficacité est fonction de la distance donneur/accepteur à la puissance 6, ce qui fait du BRET un outil de choix pour étudier les interactions protéine-protéine et les changements conformationnels. Ainsi, l'« étiquetage » de RCPG et de sous-unités des protéines G avec les partenaires BRET, nous a permis de

C. Galés : Inserm U858, Équipe 8 « Pharmacologie moléculaire et clinique du système nerveux autonome », I2MR, CHU Rangueil, BP84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France. celine.gales@toulouse.inserm.fr

M. Bouvier : Groupe de recherche universitaire sur le médicament, Université de Montréal, 2900, boulevard Édouard-Montpetit, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada. michel.bouvier@umontreal.ca

mesurer pour la première fois l'interaction et les mouvements entre un RCPG et les protéines G en temps réel dans des cellules vivantes [3]. Ce premier travail, réalisé en utilisant le récepteur β_2 adrénergique et les sous-unités $G\beta_1$ ou $G\gamma_2$, nous a permis de valider l'utilisation des biosenseurs décrits plus haut pour mesurer l'engagement de la protéine G consécutif à l'activation du RCPG. L'activation du RCPG entraîne une augmentation du signal BRET, suggérant un rapprochement entre le RCPG et la protéine G compatible avec le modèle « collisionnel ». Toutefois, en l'absence de stimulation l'observation d'un signal BRET basal spécifique n'excluait pas la possibilité que l'augmentation du BRET reflète un réarrangement moléculaire local au sein d'un complexe RCPG-