



lequel aucune réponse immunitaire n'était mise en place puisque le système immunitaire du patient était supposément incapable de détecter ce virus. Depuis quelques années, de plus en plus d'études montrent que, plutôt que d'être un virus silencieux, le VHB peut mettre en place de nombreux mécanismes d'inhibition de l'immunité, à la fois innée et adaptative [10]. Les cellules immunitaires des patients infectés par le VHB seraient donc capables de détecter le virus et pourraient, en cas de levée de l'inhibition induite par le virus, mettre en place une réponse immunitaire efficace. Les données obtenues par Pallet *et al.* sont encourageantes pour le développement de thérapies innovantes visant

la réactivation du système immunitaire chez les patients infectés. **◇**

### gMDSs act as metabolic regulators of hepatitis B virus immunopathology

#### LIENS D'INTÉRÊT

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

#### RÉFÉRENCES

1. Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. *J Clin Virol* 2005 ; 34 (suppl 1) : S1-3.
2. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 2006 ; 1 : 23-61.
3. Pallett LJ, Gill US, Quaglia A, *et al.* Metabolic regulation of hepatitis B immunopathology by myeloid-derived suppressor cells. *Nat Med* 2015 ; 21 : 591-600.

4. Sinclair LV, Rolf J, Emslie E, *et al.* Control of amino-acid transport by antigen receptors coordinates the metabolic reprogramming essential for T cell differentiation. *Nat Immunol* 2013 ; 14 : 500-8.
5. Das A, Hoare M, Davies N, *et al.* Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2008 ; 205 : 2111-24.
6. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 2012 ; 12 : 253-68.
7. Chen S, Akbar SMF, Abe M, *et al.* Immunosuppressive functions of hepatic myeloid-derived suppressor cells of normal mice and in a murine model of chronic hepatitis B virus. *Clin Exp Immunol* 2011 ; 166 : 134-42.
8. Ferrari C. HBV and the immune response. *Liver Int* 2015 ; 35 (suppl 1) : 121-8.
9. Wieland S, Thimme R, Purcell RH, *et al.* Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 6669-74.
10. Busca A, Kumar A. Innate immune responses in hepatitis B virus (HBV) infection. *Viral J* 2014 ; 11 : 22.
11. Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, *et al.* Dégradation spécifique de l'ADN nucléaire responsable de la persistance du virus de l'hépatite B. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 724-6.

## NOUVELLE

### Le facteur nétrine-1 régule la reprogrammation cellulaire vers l'état pluripotent

Patrick Mehlen<sup>1</sup>, Fabrice Laval<sup>2</sup>

► En 2006, l'équipe de Shynia Yamanaka a présenté un protocole de génération de cellules souches pluripotentes induites (iPS) [1]. Ces chercheurs ont démontré que l'expression exogène de quatre facteurs de transcription, le cocktail OSKM (Oct4, *octamer-binding transcription factor 4* ; Sox2, *SRY [sex determining region Y]-box 2* ; Klf4, *Kruppel-like factor 4* ; c-Myc), dans une cellule somatique différenciée, est suffisante pour induire une reprogrammation épigénétique globale conduisant à l'émergence de cellules, les cellules iPS, OSKM ayant éteint le génome somatique et réactivé le circuit pluripotent [12] (→). Au delà de la prouesse technique, ce procédé ouvre d'incroyables perspectives en terme de médecine régénérative. Dans le cas de pathologies tissulaires

(→) Voir la Nouvelle de L. Lapasset *et al.*, *m/s* n° 11, novembre 2010, page 902

dégénératives, des cellules iPS peuvent être générées *in vitro* de manière autologue à partir de cellules isolées des patients (sang, peau, etc.) et induites à se redifférencier dans le lignage endommagé avant leur transplantation. Il est même possible de combiner cette approche avec la correction d'une anomalie génétique dans les cellules iPS. Cependant, le processus est encore limité par sa très faible efficacité et par la qualité hétérogène des clones de cellules iPS obtenus, notamment en terme de potentiel de différenciation.

#### Identifier les mécanismes protégeant la cellule somatique contre la dédifférenciation et la reprogrammation

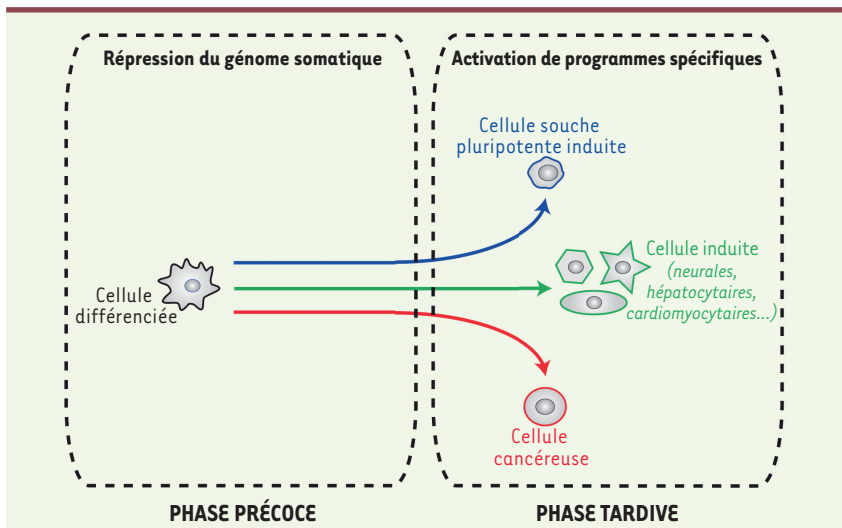
La reprogrammation pluripotente est un processus stochastique complexe qui nécessite, entre autres, d'effacer

<sup>1</sup>Laboratoire Apoptose, Cancer et Développement – équipe labellisée La Ligue, LabEx DEVweCAN, centre de recherche en cancérologie de Lyon, Inserm U1052-CNRS UMR5286, université de Lyon, centre Léon Bérard, 28, rue Laennec, 69008 Lyon, France.

<sup>2</sup>Laboratoire Reprogrammation cellulaire et oncogénèse – équipe ATIP/Avenir, centre de recherche en cancérologie de Lyon, Inserm U1052-CNRS UMR5286, université de Lyon, centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France. [patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr](mailto:patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr) [fabrice.laval@lyon.unicancer.fr](mailto:fabrice.laval@lyon.unicancer.fr)

la signature épigénétique de la cellule somatique et d'établir l'épigénome pluripotent, divisant le processus en deux grandes phases (Figure 1) [13] (→). La phase tardive, principalement caractérisée par la réactivation des réseaux moléculaires de pluripotence, est bien caractérisée. Les mécanismes responsables de l'initiation de la dédifférenciation de la cellule somatique restent en revanche mal connus. Pourtant, cette étape de perte d'identité des cellules somatiques peut être considérée comme le socle commun à un certain nombre de stratégies de reprogrammation développées pour générer des cellules souches

(→) Voir la Synthèse de L. David et J. De Vos, *m/s* n° 4, avril 2013, page 405



**Figure 1.** Les 2 grandes phases du processus de reprogrammation cellulaire. La reprogrammation implique la perte d'identité et la dédifférenciation de la cellule somatique (phase précoce) puis l'acquisition d'une nouvelle identité et de nouvelles propriétés (phase tardive). Ces étapes sont communes à divers types de reprogrammation et pourraient également se mettre en place au cours du processus oncogénique.

pluripotentes, mais également des cellules neurales, endothéliales, cardiomyocytaires ou hépatocytaires (Figure 1) [2]. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires gouvernant la perte d'identité d'une cellule somatique est donc importante pour améliorer les conditions de génération de cellules reprogrammées et accélérer leur utilisation clinique.

### Disséquer les interactions des facteurs OSKM avec le génome de la cellule somatique pour mieux comprendre la génération des cellules reprogrammées

Au cours des étapes précoces de la reprogrammation, un paramètre essentiel est l'efficacité des facteurs OSKM à se lier et à remodeler la chromatine de leurs gènes cibles. Par une approche d'immunoprécipitation de chromatine couplée à un séquençage haut débit (ChIP-seq) dans les cellules différenciées (fibroblastes) et pluripotentes (iPS), l'équipe de Kenneth Zaret a démontré l'existence de 264 régions génomiques DBR (pour « régions différenciellement liées ») qui sont inaccessibles à OSKM dans les premiers jours de la reprogrammation dans la cellule

différenciée, alors qu'elles sont occupées par les 4 facteurs dans la cellule pluripotente [3].

À partir de cette observation, nous avons émis l'hypothèse suivante : puisque le remodelage épigénétique des régions DBR est rendu difficile par certaines barrières épigénétiques, la régulation des gènes localisés dans ces régions pourrait ne pas se mettre en place correctement, conduisant à des niveaux d'expression incompatibles avec la reprogrammation cellulaire. Nous avons ainsi sélectionné les 705 gènes localisés dans les régions DBR et identifiés comme des freins potentiels à la génération des cellules iPS. La liste de candidats a ensuite été restreinte aux gènes associés à la mort cellulaire programmée (ou apoptose), une barrière connue à la reprogrammation cellulaire. Cette méthode nous a permis d'obtenir une liste de 32 candidats parmi lesquels de nombreux membres de la voie de signalisation nétrine-1 : les gènes codant le ligand nétrine-1 et ses récepteurs DCC (*deleted in colorectal carcinoma*) [14] (→), Unc5B et Unc5D (*Unc-5 netrin receptor B/D*). La nétrine-1

(→) Voir la Nouvelle de L. Broutier et M. Castets, m/s n° 5, mai 2012, page 465

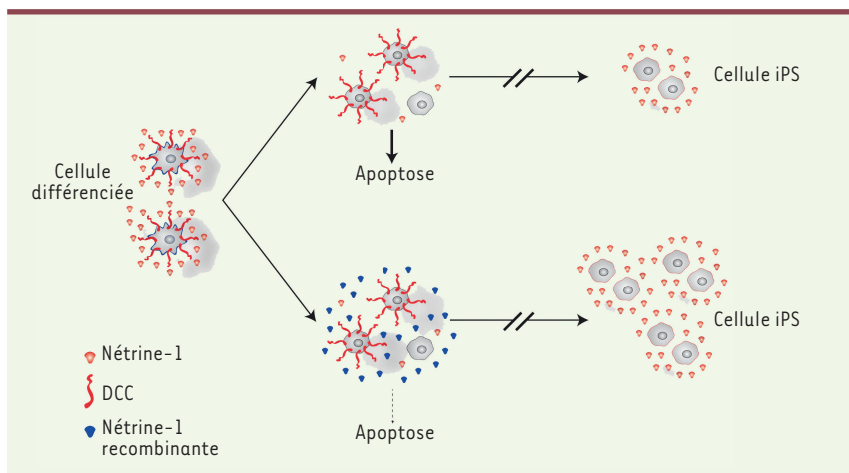
est une protéine sécrétée, de la famille des laminines, initialement impliquée dans la navigation des neurones [4] (→) et plus récemment (→) Voir la Synthèse de P. Mehlen et N. Rama, m/s n° 3, mars 2007, page 311

tumorale, par blocage de l'apoptose induite par ses récepteurs à dépendance<sup>1</sup> DCC et Unc5H. L'implication de ce type de molécules dans la reprogrammation cellulaire vers l'état pluripotent n'avait jusque-là pas été décrite.

### Les niveaux du ligand nétrine-1 contrôlent la reprogrammation vers l'état pluripotent

Nous avons montré que le profil d'expression de la nétrine-1 est biphasique lors de la reprogrammation de fibroblastes embryonnaires de souris (MEF, *mouse embryonic fibroblasts*). Les premiers jours du processus s'accompagnent d'une diminution transitoire de l'expression de la nétrine-1, suivie d'une réexpression dans les cellules reprogrammées. Le mécanisme épigénétique responsable de cette répression momentanée repose sur le recrutement du complexe répressif NuRD (*nucleosome remodeling deacetylase*) sur le promoteur de la nétrine-1 par les facteurs Oct4 et Klf4. Les travaux de l'équipe de recherche de Jacob Hanna ont en effet montré que le recrutement antagoniste de ce complexe épigénétique répressif sur des gènes à activer dans les cellules iPS est un frein majeur à la reprogrammation [5]. Nous avons ensuite démontré que cette répression de la nétrine-1 induit une apoptose médiée par le récepteur DCC au cours de la reprogrammation (Figure 2). DCC fait en effet partie de la famille des récepteurs à dépendance capables d'être actifs en l'absence de leur ligand, en induisant un signal apoptotique *via* le clivage de leur domaine intracellulaire. Ainsi, les difficultés rencontrées par les facteurs OSKM pour remodeler et activer l'expression du gène *nétrine-1* activent

<sup>1</sup> Récepteurs qui bloquent l'apoptose lorsqu'ils sont liés à leur ligand, mais induisent l'apoptose en absence de leur ligand.



**Figure 2. La nétrine-1 contrôle le processus de reprogrammation cellulaire.** La phase précoce de la génération des cellules iPS est accompagnée d'un déficit en nétrine-1 endogène qui induit l'apoptose et limite la génération des cellules reprogrammées (schéma du haut). L'apport exogène de nétrine-1 recombinante protège les cellules contre l'apoptose et augmente ainsi l'efficacité de génération des cellules iPS (schéma du bas). DCC : *deleted in colorectal carcinoma*; iPS : cellules souches pluripotentes induites.

un programme de mort cellulaire en début de reprogrammation. Nous nous sommes dès lors demandé si le déficit endogène en nétrine-1 pouvait être compensé par le traitement des cellules avec une forme recombinante de cette protéine ajoutée au milieu de culture. Cette approche, non invasive, pourrait ainsi limiter l'apoptose et améliorer les conditions de génération des cellules iPS, sans avoir recours à de nouveaux transgènes. Ce traitement simple permet en effet de multiplier d'un facteur 5 à 15 le nombre de colonies reprogrammées obtenues à partir de cellules somatiques murines et humaines (Figure 2). Des analyses moléculaires combinées à des tests fonctionnels ont permis de démontrer que les cellules générées en présence de cette molécule recombinante présentent des propriétés d'autorenouvellement et de différenciation similaires aux cellules contrôles [6]. De futurs travaux devront démontrer en quoi l'addition de nétrine-1, ou d'un mimétique de nétrine-1, pourrait devenir une approche complémentaire ou alternative aux procédés de reprogrammation actuellement testés cliniquement chez l'homme dans plusieurs pays.

### Une analogie entre la reprogrammation cellulaire et l'oncogenèse : une histoire de dédifférenciation et d'acquisition de plasticité cellulaire

De manière intéressante, la nétrine-1 est un facteur pro-oncogénique dans

plusieurs types de tumeurs *via* son rôle de facteur de survie. Dans ces pathologies, le ligand protège les cellules de la mort cellulaire programmée induite par ses récepteurs [7-9]. Notre étude, en révélant que cette barrière oncogénique limite également la reprogrammation cellulaire, vient s'ajouter à d'autres travaux qui démontrent une analogie entre les processus de reprogrammation pluripotente et la tumorigenèse : (1) les 4 facteurs de reprogrammation sont en effet des oncogènes reconnus [10]. Oct4 gouverne l'initiation des tumeurs germinales. Sox2 agit comme un facteur de survie dans les cancers pancréatiques et Klf4 est impliqué dans le cancer du sein. Enfin, c-Myc contribue au processus de transformation de fibroblastes en coopération avec d'autres oncogènes et est fréquemment amplifié dans les cancers humains ; (2) certains freins à la reprogrammation pluripotente sont des barrières oncogéniques reconnues, comme la mort cellulaire et la sénescence ; (3) des régulateurs chromatinien jouant un rôle essentiel dans la reprogrammation pluripotente ont des fonctions établies en oncogenèse ; enfin, (4) l'arrêt prématuré de la reprogrammation pluripotente *in vivo* conduit à la tumorigenèse [11]. Comme décrit dans la Figure 1, ces arguments laissent penser que des mécanismes similaires pourraient rendre une cellule permissive à un remodelage épigéné-

tique global et réfractaire à la mort cellulaire au début de la reprogrammation pluripotente et de l'oncogenèse. Ainsi, l'étude des phases précoces de la reprogrammation pluripotente pourrait permettre de mieux appréhender l'initiation du processus tumoral. ♦

### The netrin-1 cue regulates somatic cell reprogramming to pluripotency

#### LIENS D'INTÉRÊT

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

#### RÉFÉRENCES

1. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006 ; 126 : 663-76.
2. Lin C, Yu C, Ding S. Toward directed reprogramming through exogenous factors. *Curr Opin Genet Dev* 2013 ; 23 : 519-25.
3. Soufi A, Donahue G, Zaret KS. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell* 2012 ; 151 : 994-1004.
4. Mehlen P, Rama N. Nétrine-1 et guidage axonal : signalisation et traduction asymétrique. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 311-6.
5. Rais Y, Zviran A, Geula S, et al. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature* 2013 ; 502 : 65-70.
6. Ozmadenci D, Feraud O, Markossian S, et al. Netrin-1 regulates somatic cell reprogramming and pluripotency maintenance. *Nat Commun* 2015 ; 6 : 7398.
7. Fitamant J, Guenebaud C, Coissieux MM, et al. Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 4850-5.
8. Mazelin L, Bernet A, Bonod-Bidaud C, et al. Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* 2004 ; 431 : 80-4.
9. Castets M, Broutier L, Molin Y, et al. DCC constrains tumor progression via its dependence receptor activity. *Nature* 2012 ; 482 : 534-7.

## RÉFÉRENCES

10. Suva ML, Riggi N, Bernstein BE. Epigenetic reprogramming in cancer. *Science* 2013; 339 : 1567-70.
11. Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, et al. Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell* 2014; 156 : 663-77.
12. Lapasset L, Milhavel O, Lemaitre JM. La reprogrammation vers la pluripotence peut-elle effacer la mémoire d'une vie antérieure ? *Med Sci (Paris)* 2010; 26 : 902-3.
13. David L, John De Vos J. La reprogrammation, un jeu de hasard ? *Med Sci (Paris)* 2013; 29 : 405-10.
14. Broutier L, Castets L. *DCC : come back* d'un gène suppresseur de tumeur controversé. *Med Sci (Paris)* 2012; 28 : 465-8.

## NOUVELLE

### Lymphocytes T et cellules myéloïdes coopèrent au sein de la tumeur après vaccination

Maxime Thoreau, Nadège Bercovici, Alain Trautmann

Institut Cochin, université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité, CNRS UMR 8104, Inserm U1016, département Infection, Immunité, Inflammation, 22, rue Méchain, 75014 Paris, France. [maxime.thoreau@live.fr](mailto:maxime.thoreau@live.fr)

Depuis quelques années, l'immunothérapie anti-tumorale est considérée comme un traitement d'avenir [12] (→). À la différence des traitements standards en oncologie, cette approche permettrait de mettre en place une mémoire immunitaire, c'est-à-dire une protection à long terme de l'organisme contre les cellules tumorales. La plupart des recherches dans ce domaine se concentrent sur deux notions : le potentiel cytotoxique des lymphocytes T CD8 [1] et l'inhibition de ces réponses T par les cellules myéloïdes (monocytes/macrophages), considérées comme des cellules pro-tumorales [2]. Les essais de traitements dérivés de ces notions visent à réduire le potentiel « suppresseur » des cellules myéloïdes et à stimuler la réponse T cytotoxique. Dans des modèles murins de tumeurs, de tels traitements ne provoquent, la plupart du temps, que des ralentissements de la croissance tumorale et non des régressions. Leur efficacité reste donc limitée. Notre objectif a été de nous placer dans un contexte de régression tumorale, dans lequel la réponse immune est vraiment efficace, et d'analyser les rôles et les cinétiques d'infiltration intra-tumorale des populations immunitaires impliquées dans cette régression.

#### Mimer une réponse antivirale peut provoquer une régression tumorale

Nous avons induit la régression de tumeurs murines TC1<sup>1</sup> transplantées, en nous inspirant des travaux de W. Coley. Au début du XX<sup>e</sup> siècle, ce pionnier de l'immunothérapie avait en effet observé des régressions de tumeurs chez ses patients après injection de bactéries inactivées [3]. Nous avons donc mimé une réponse anti-infectieuse, capable de provoquer une fonte de la masse tumorale, à l'aide d'un vaccin composé d'une sous-unité de la toxine de Shiga<sup>2</sup> couplée à un peptide long (E7), exprimé par les cellules tumorales TC1 [4]. Ce vaccin a été combiné à l'interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) afin de mimer une infection virale [5] au niveau du foyer tumoral. Après 8 jours de ce traitement combiné, la régression est systématiquement amorcée [6].

#### La coexistence intra-tumorale des lymphocytes T CD8 et des cellules myéloïdes est nécessaire à la régression

L'analyse d'un infiltrat tumoral à un instant donné ne fournit aucune information sur les caractéristiques dynamiques de la réponse immune. En outre, la rareté des

prélèvements de tumeurs humaines en régression ne permet pas de bien documenter les réponses immunitaires efficaces. Le modèle murin que nous avons choisi permet d'analyser en détail la cinétique de la réponse immunitaire induite à la suite d'une vaccination anti-tumorale. Dans ce modèle, le couplage de l'antigène E7 à une sous-unité B non toxique d'un mutant de toxine Shiga favorise une présentation croisée par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC, *major histocompatibility complex*) de classe I [4]. En considérant ce résultat, ainsi que le rôle des lymphocytes T CD8 dans l'élimination des pathogènes lors d'infections bactériennes ou virales, nous nous attendions à observer une forte augmentation du nombre de ces cellules lors de la réponse immune. Ce fut en effet le cas, à ceci près que l'infiltration massive par des lymphocytes T CD8 débutait 8 jours après la vaccination, après que la tumeur ait amorcé sa régression. Cette observation a été déterminante dans la suite de notre exploration.

L'analyse de l'infiltrat myéloïde révèle que les cellules myéloïdes, déjà présentes en nombre non négligeable dans les tumeurs en progression, infiltrèrent fortement la tumeur trois jours avant les lymphocytes. Leur abondance, avant la phase de régression et l'infiltration tardive des lymphocytes T CD8, amène à s'interroger sur les rôles respectifs de chacune de ces

<sup>1</sup> Les cellules tumorales TC1 expriment l'oncogène E7 du papillomavirus humain HPV16.

<sup>2</sup> Toxine sécrétée par certaines souches de bactéries *Escherichia coli* inhibant la synthèse protéique dans les cellules cibles, principalement les cellules endothéliales intestinales, rénales et cérébrales.