

## L'expression de la granulysine améliore la réponse antiparasitaire des lymphocytes T chez les souris

Afin de confirmer le rôle *in vivo* de la granulysine, les auteurs ont analysé son impact chez les souris atteintes de différentes parasitoses. Les rongeurs n'exprimant pas la granulysine, des animaux transgéniques ont été obtenus par insertion dans leur génome du gène humain et de ses séquences régulatrices, limitant ainsi son expression aux CTL et aux cellules NK (*natural killer*). Les souris *GNLY*<sup>+/-</sup> survivent plus longtemps que les souris sauvages à une infection parasitaire par *Trypanosoma cruzi*, et la parasitémie est diminuée. Ces résultats confirment les résultats obtenus *in vitro* et démontrent que la granulysine est impliquée dans la réponse immunitaire antiparasitaire *in vivo*. De plus, les résultats obtenus dans ce modèle montrent que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> contribuent majoritairement à cette protection.

### Perspectives

Dans ce travail, Dotiwala *et al.* ont mis en évidence le rôle coopératif du trio perforine/granzyme B/granulysine dans

la lutte contre les parasites intracellulaires exercée par les CTL et identifié un nouveau type de mort cellulaire, baptisé microptose, induit par l'action du granzyme B et largement dépendant des ROS. Cette étonnante observation d'un type de mort cellulaire qui pourrait s'apparenter à une mort cellulaire programmée chez un parasite ouvre la voie à de nouvelles perspectives de recherches fondamentale et thérapeutique. En effet, la description précise des cascades moléculaires impliquées dans l'induction de la microptose pourrait conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques exploitables pour la lutte antiparasitaire. De plus, les résultats montrent que des souris exprimant la granulysine survivent mieux aux infections parasitaires : cette observation est en contradiction avec des résultats antérieurs suggérant que la sécrétion d'IFN- $\gamma$  plutôt que l'effet cytotoxique des cellules T CD8<sup>+</sup>, permet de contrôler les infections par *T. cruzi*, et remet en cause la pertinence de ces résultats chez l'homme. De plus, étant donné l'activité de la granulysine sur les membranes pauvres en cholestérol, cette réponse immune dépendante de l'induction de

microptose pourrait également s'appliquer à d'autres protozoaires et à d'autres parasites multicellulaires. Dans tous les cas, de futures études seront clairement nécessaires afin d'élucider ces différents points.  $\diamond$

## Perforin, granzyme and granulysin association to kill intracellular parasites

### LIENS D'INTÉRÊT

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

### RÉFÉRENCES

1. De Alencar BC, Persechini PM, Haolla FA, *et al.* Perforin and gamma interferon expression are required for CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. *Infect Immun* 2009 ; 77 : 4383-95.
2. Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 2008 ; 26 : 389-420.
3. Pena SV, Hanson DA, Carr BA, *et al.* Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *J Immunol* 1997 ; 158 : 2680-8.
4. Walch M, Dotiwala F, Mulik S, *et al.* Cytotoxic cells kill intracellular bacteria through granulysin-mediated delivery of granzymes. *Cell* 2014 ; 157 : 1309-23.
5. Dotiwala F, Mulik S, Polidoro RB, *et al.* Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites. *Nat Med* 2016 ; 22 : 210-6.

## NOUVELLE

## EGFR, régénération et carcinogenèse hépatiques : quelle responsabilité ?

Julia Giraud<sup>1</sup>, Mathurin Fatou<sup>1</sup>, Olivier Dellis<sup>2</sup>

<sup>1</sup> M1 Biologie Santé, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France ;

<sup>2</sup> Inserm UMR-S 1174, équipe signalisation calcique, bâtiment 443, rue des Adèles, 91405 Orsay, France.  
olivier.dellis@u-psud.fr  
julia.giraud@gmail.com  
fatou.mathurin@gmail.com

> Le carcinome hépatocellulaire est le septième cancer le plus répandu dans le monde. Plusieurs facteurs environnementaux, comme la consommation d'alcool ou les infections par les virus des hépatites B

ou C, favorisent son apparition, ce qui en fait une priorité de santé publique. En effet, une régénération prolongée des hépatocytes, souvent en relation avec une hépatopathie chronique, engendre des lésions génétiques et épigénétiques des cellules et un déséquilibre de la balance apoptose – prolifération des hépatocytes qui facilitent l'émergence d'une tumeur.

### Quel rôle pour l'EGFR dans la régénération et la carcinogenèse hépatiques ?

Un nombre abondant de publications montrent que la voie de l'EGFR (*epidermal growth factor receptor*) intervient dans la régénération du foie [1-4]. Cependant, les mécanismes l'impliquant dans la carcinogenèse restent largement méconnus.

Cette Nouvelle fait partie d'une série de 15 Nouvelles rédigées par les étudiants du Master « Biologie Santé » de l'université Paris-Saclay, qui paraîtront dans les numéros 6-7, 8-9 et 10 (2016) de *médecine/sciences*.



Une des inconnues réside dans le rôle respectif de la voie EGFR, d'une part sur la survie cellulaire, d'autre part sur la prolifération cellulaire [1]. Une seconde inconnue est celle de l'importance d'autres acteurs moléculaires – tels que le HGF (*hepatocyte growth factor*) et son récepteur c-Met – dans ces deux fonctions de survie et de prolifération, car leur mode d'action n'est que partiellement caractérisé [5].

C'est à ces deux questions qu'une équipe de Barcelone apporte des réponses nouvelles en exploitant un modèle animal original d'étude de la voie EGFR *in vivo* [6].

### Un nouveau modèle de souris inactivant sélectivement l'activité catalytique du récepteur de l'EGF

Pour étudier le rôle de l'EGFR dans la régénération et la carcinogenèse hépatiques, un nouveau modèle de souris transgénique a été développé [6]. L'ADNc codant l'EGFR, tronqué de son domaine intracellulaire kinase ( $\Delta$ EGFR), a été introduit dans un chromosome bactérien (RP23-279P6) sous le contrôle du promoteur de l'albumine, ce qui permet son expression spécifiquement dans les hépatocytes. Ce chromosome a été ensuite injecté dans les pronucléus d'un œuf fécondé d'une souris, puis l'embryon transféré dans l'utérus d'une souris pseudogestante. Les souris transgéniques ainsi obtenues ont été croisées avec des souris sauvages, produisant des descendants F1 hétérozygotes. Contrairement aux techniques précédemment utilisées (par exemple l'inactivation du gène), cette stratégie permet d'explorer spécifiquement le rôle de l'activité catalytique : en effet,  $\Delta$ EGFR agit comme un dominant négatif en se combinant aux récepteurs EGFR endogènes sans modifier leur expression, ni leur capacité de fixer le ligand endogène.

### L'inactivation de l'EGFR induit un retard de prolifération, mais n'empêche pas la régénération du foie

Les effets de  $\Delta$ EGFR ont été évalués chez des animaux ayant subi une hépa-

tectomie partielle et chez des animaux sauvages. Cette ablation des 2/3 du foie induit la prolifération des hépatocytes. Dès 6 h après l'hépatectomie, et contrairement à ce qui est observé chez les animaux sauvages, la phosphorylation des protéines AKT et ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) est réduite dans les hépatocytes  $\Delta$ EGFR, démontrant la perturbation de la voie de signalisation correspondante. Il existe un retard de prolifération, qui se traduit par une diminution du nombre d'hépatocytes deux jours après hépatectomie chez les souris  $\Delta$ EGFR, retard qui se corrige après trois jours. Ce retard témoigne du fait que si la voie EGFR intervient dans la prolifération cellulaire des hépatocytes, elle n'est pas la seule.

L'EGF jouant un rôle important dans l'atténuation des effets négatifs du TGF $\beta$  (*transforming growth factor*) sur la prolifération [7], les auteurs se sont intéressés à certaines protéines intervenant dans cette voie. Dans les cellules du foie des souris  $\Delta$ EGFR, la phosphorylation de la protéine Smad3, témoin de l'activation de la voie TGF $\beta$ , est accrue par rapport aux cellules du foie de souris sauvages, de même que les transcrits TGF $\beta$ . En revanche, les taux d'ARNm de l' $\alpha_2$ -macroglobuline, molécule inhibant les effets de TGF $\beta$ , sont faibles. Ces résultats confirment des résultats antérieurs suggérant que la voie EGFR inhibe les actions de la voie TGF $\beta$  et augmente par conséquent la réponse proliférative après hépatectomie partielle.

Une apoptose accrue n'explique pas le délai de prolifération chez les souris  $\Delta$ EGFR : la protéine pro-apoptotique Bim (*Bcl-2-like protein 1*) n'est pas surexprimée chez ces souris, et la protéine anti-apoptotique Bclx<sub>L</sub> (*B-cell lymphoma extra large*) n'est pas non plus sous exprimée. L'EGFR serait exclusivement impliqué dans la prolifération cellulaire hépatique *via* la modulation de l'activation de l'expression des gènes régulateurs du cycle cellulaire induite par la voie TGF $\beta$ . Cette hypothèse a pu être confirmée par l'observation d'une

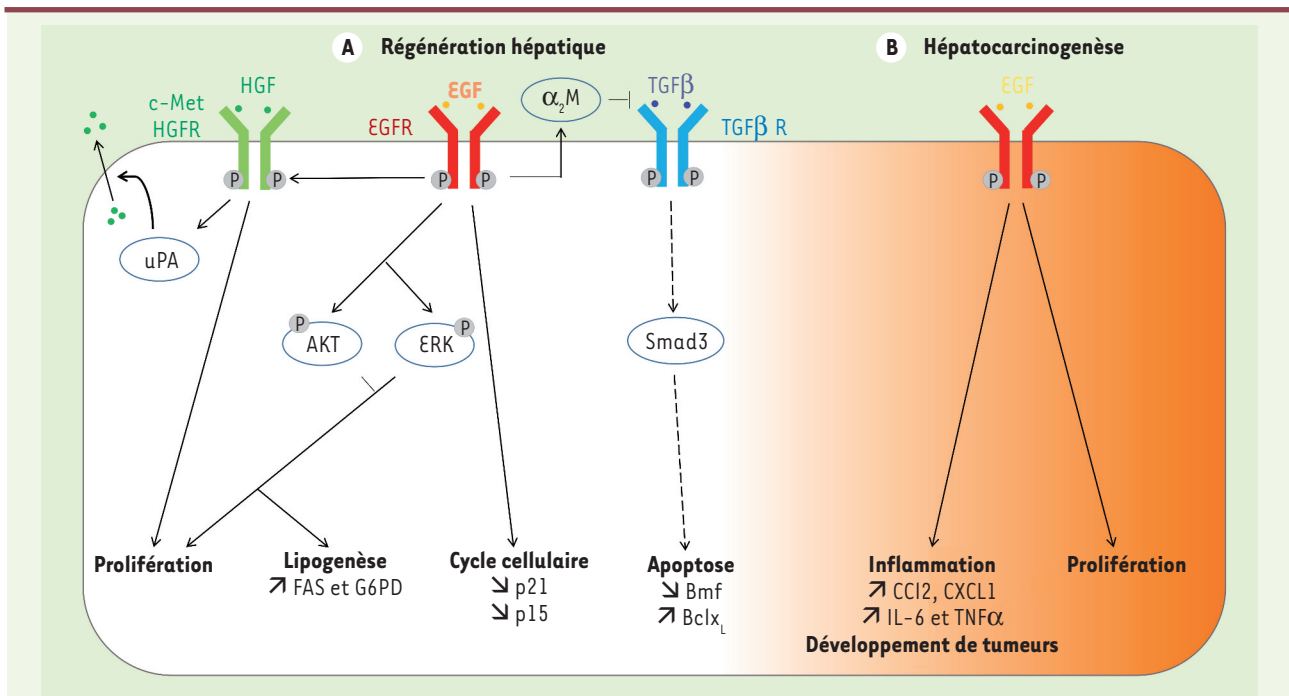
expression élevée des gènes *Cdkn2b* et *Cdkn1a*, codant respectivement p15 et p21, protéines inhibitrices de l'entrée en phase S du cycle cellulaire, ce qui peut expliquer le retard de prolifération des hépatocytes (*Figure 1*).

Le fait que la prolifération cellulaire soit simplement retardée, mais pas abolie, chez les souris  $\Delta$ EGFR hépatectomisées, signifie que la voie EGFR est nécessaire à la réponse à l'hépatectomie étant donné qu'elle libère des signaux mitogènes. Néanmoins, la récupération au bout de 3 jours suggère l'intervention d'autres molécules. C'est effectivement le cas : les ARNm codant le facteur de croissance hépatique HGF et l'uPA (*urokinase-type plasminogen*) – qui permet la libération de l'HGF de la matrice extracellulaire – sont fortement exprimés chez les souris  $\Delta$ EGFR, et le taux de phosphorylation du récepteur c-Met l'est également. Cette suractivation de la voie HGF-cMet compense ainsi la défaillance de la voie EGFR chez les souris  $\Delta$ EGFR.

La cinétique de récupération de la masse du foie après hépatectomie partielle est la même chez les souris transgéniques sauvages et  $\Delta$ EGFR, ce qui renforce l'hypothèse de l'intervention compensatrice d'autres voies de signalisation impliquées dans la prolifération. Ce retard de prolifération induit par l'inactivation de l'EGFR n'empêche donc pas la récupération de la masse totale du foie.

### L'inactivation de l'EGFR retarde l'apparition de tumeurs

L'injection de diéthyl-nitrosamine (DEN, carcinogène chimique) chez les souris nouveau-nés sauvages ou  $\Delta$ EGFR induit le développement ultérieur d'un carcinome hépatique. Si le nombre de tumeurs et de lésions préneoplasiques chez les souris  $\Delta$ EGFR est inférieur à celui chez des souris sauvages 9 mois après le traitement par la DEN, cette différence disparaît après 12 mois. L'inactivation de l'EGFR ne fait donc que retarder l'apparition des tumeurs, mais n'en abolit pas le développement.



**Figure 1. Vue d'ensemble des rôles de l'EGFR dans la régénération et la carcinogénèse hépatiques.** **A.** En situation physiologique lors de la régénération hépatique, l'EGFR permet la prolifération cellulaire via l'activation de la voie HGF/c-Met, des voies AKT et ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) et via la diminution du taux de p21 et de p15 inhibitrices de l'entrée en phase S du cycle cellulaire. De plus, l'activation de ces kinases stimule l'expression des gènes intervenant dans la biosynthèse des acides gras, soit FAS (*fatty acid synthase*) et G6PD (glucose-6-phosphate déshydrogénase). Enfin, l'EGFR aurait un rôle antiapoptotique via l' $\alpha_2$ -macroglobuline ( $\alpha_2M$ ) inhibitrice de la signalisation de la voie TGF $\beta$ , qui induirait une expression accrue de la protéine antiapoptotique Bcl<sub>L</sub> et une baisse du taux de la protéine proapoptotique Bmf. **B.** En situation pathologique lors d'une hépatocarcinogénèse, l'EGFR a une action proinflammatoire en induisant le recrutement des chimiokines CCL2 et CXCL1 et des cytokines IL-6 (interleukine-6) et TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*), ce qui contribue à induire le développement de tumeurs. EGFR : *epidermal growth factor receptor* ; HGF : *hepatocyte growth factor* ; HGFR : récepteur de l'HGF ; TGF $\beta$  : *transforming growth factor beta* ; TGF $\beta$  R : récepteur du TGF $\beta$  ; uPA : *urokinase-type plasminogen* ;  $\alpha_2M$  : *alpha-2-macroglobuline* ; Smad3 : *mothers against decapentaplegic homolog 3* ; Bmf : *Bcl-2-like protein 1* ; Bcl<sub>L</sub> : *B-cell lymphoma-extra large* ; CCL2 : *chemokine ligand 2* ; CXCL1 : *chemokine [C-X-C motif] ligand 1*.

L'inflammation jouant un rôle dans l'hépatocarcinogénèse, les auteurs ont étudié certains marqueurs inflammatoires chez ces souris. Après traitement par le DEN, et en comparaison des souris sauvages, les souris  $\Delta$ EGFR n'expriment aucun marqueur fort de macrophages dans le foie, et les taux d'ARNm codant les cytokines pro-inflammatoires IL-6 (interleukine-6) et TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*) dans le stroma péri-tumoral, et les chimiokines CCL2 (*chemokine ligand 2*) et CXCL1 (*chemokine ligand 1*) sont faibles. De plus, aucune fibrose ne se développe. Si ces observations distinguent le foie des souris sauvages de celui des souris  $\Delta$ EGFR initialement, aucune différence n'est plus perceptible

après 12 mois, démontrant, comme pour la prolifération cellulaire et l'émergence des tumeurs, que le déclenchement de l'inflammation n'est que retardé chez les souris  $\Delta$ EGFR.

### Conclusions

L'ensemble de ces résultats montre qu'au cours des phases initiales de la régénération hépatique, le rôle de l'EGFR serait de privilégier la prolifération cellulaire et non d'empêcher la mort cellulaire, ce qui précise des résultats précédemment obtenus [8]. Ce processus se ferait via la régulation de la voie TGF $\beta$  et des kinases impliquées dans le cycle cellulaire. Cependant, le nombre de protéines pro- et antiapoptotiques testé est faible, ce

qui ne permet pas d'exclure totalement un rôle dans la survie.

L'absence de récepteur de l'EGF dont l'activité catalytique est fonctionnelle certes cause un retard dans la régénération et la carcinogénèse hépatocellulaires, probablement rapidement compensé par l'intervention d'autres voies de signalisation, telle que celle de l'HGF/Met, comme en témoigne l'augmentation de la phosphorylation de c-Met chez les souris  $\Delta$ EGFR. Cependant, le ou les mécanismes associés à une absence initiale de carcinogénèse (s'agit-il d'un dysfonctionnement de l'apoptose ou du processus de néoangiogénèse dans l'environnement de la tumeur ?) n'ont pas été étudiés.



Au-delà de la caractérisation des acteurs moléculaires des voies EGFR et HGF/c-Met intervenant dans la prolifération cellulaire, ce modèle de souris transgénique ΔEGFR pourrait aider au développement d'une stratégie thérapeutique utile dans les maladies hépatiques chroniques et la carcinogénèse du foie. ♦

### EGFR, liver regeneration and carcinogenesis: not the only culprit

#### LIENS D'INTÉRÊT

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

#### RÉFÉRENCES

1. Berasain C, Avila MA. The EGFR signalling system in the liver: from hepatoprotection to hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol* 2014; 40 : 9-23.
2. Michalopoulos GK. Liver Regeneration after partial hepatectomy. *Am J Pathol* 2010; 176 : 2-13.
3. Riehle KJ, Dan YY, Campbell JS, Fausto N. New concepts in liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 (suppl 1) : 203-12.
4. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *J Hepatol* 2012; 57 : 692-4.

5. Factor VM, Seo D, Ishikawa T, et al. Loss of c-Met disrupts gene expression program required for G2/M progression during liver regeneration in mice. *PLoS One* 2010; 5 : e12739.
6. López-Luque J, Caballero-Díaz D, Martínez-Palacián A, et al. Dissecting the role of epidermal growth factor receptor catalytic activity during liver regeneration and hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2016; 63 : 604-19.
7. Carmona-Cuenca I, Herrera B, Ventura JJ, et al. EGF blocks NADPH oxidase activation by TGF-beta in fetal rat hepatocytes, impairing oxidative stress, and cell death. *J Cell Physiol* 2006; 207 : 322-30.
8. Natarajan A, Wagner B, Sibilia M. The EGF receptor is required for efficient liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104 : 17081-6.

## NOUVELLE

### Effet papillon et cancer : ou comment une pression mécanique induite *in vivo* active la tumorigénèse des cellules voisines saines

Camille Kieffer<sup>1</sup>, Ye Wang<sup>1</sup>, Fatma Bagca<sup>1</sup>, Christophe Lamaze<sup>2</sup>

<sup>1</sup> M1 Biologie Santé, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France ;

<sup>2</sup> Institut Curie – Centre de recherche, Paris Sciences et Lettres (PSL research university), équipe dynamique et mécanique membranaires de la signalisation intracellulaire, Inserm U1143, CNRS UMR 3666, Paris, France.

christophe.lamaze@curie.fr

fatma.bagca@u-psud.fr

yzmeredith@gmail.com

ckieffer@ens-cachan.fr

> La prolifération et la différenciation des cellules d'un organisme reposent sur des interactions étroites avec l'environnement tissulaire et cellulaire. De même, une tumeur ne se développe pas de manière indépendante des cellules voisines non tumorales (→).

En effet, au cours du processus de carcinogénèse, les cellules tumorales agissent sur l'ensemble des tissus avoisinants. Ces tissus, en réponse aux facteurs aussi bien chimiques, sécrétés par la tumeur, que mécaniques, sont susceptibles de subir des processus carcinogènes [1]. Les interactions chimiques, telles que la sécrétion de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) ou de FGF (*fibro-*

(→) Voir à ce propos le numéro thématique **Microenvironnements tumoraux : conflictuels et complémentaires**, m/s n° 4, avril 2014

*blast growth factor*) dans les processus d'angiogénèse, sont très étudiées car elles représentent de très larges opportunités thérapeutiques [2]. En revanche, les études concernant les implications des forces mécaniques dans le développement des tumeurs sont moins nombreuses. Elles ont tout de même permis de montrer qu'une pression mécanique sur des cellules tumorales non invasives pouvait aboutir à l'expression d'un phénotype invasif. Ces études ont cependant été limitées à des approches *in vitro* [3]. La problématique soulevée dans l'article de *Nature* publié par les chercheurs de l'institut Curie (Paris) [4] est la suivante : tester si la pression mécanique de croissance tumorale peut engendrer des phénomènes de tumorigénèse dans les tissus sains (non tumoraux) avoisinant la tumeur, au sein d'un organisme *in vivo*. Un groupe de chercheurs a mis au point une approche tout à fait novatrice afin d'étudier les conséquences, sur les tissus avoisinants,

de la pression mécanique générée au cours de la croissance tumorale [4]. Les auteurs ont analysé les voies de transduction activées dans les cellules subissant cette force, et se sont intéressés plus particulièrement à la voie de la  $\beta$ -caténine. Celle-ci a la particularité d'être présente dans les jonctions adhérentes et desmosomales, et d'être un cofacteur transcriptionnel, pouvant potentiellement coupler les propriétés mécaniques et transcriptionnelles des tissus épithéliaux. Sa translocation nucléaire et sa fixation sur les facteurs de transcription TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*) enclenchent alors la transcription de gènes tumorigènes comme *cmyc* et *ccnd1* (codant la cycline D) [5].

#### Une technique innovante induisant des contraintes de pression sur les cellules

L'expérience a consisté à mimer la pression exercée par la croissance des

Cette Nouvelle fait partie d'une série de 15 Nouvelles rédigées par les étudiants du Master « Biologie Santé » de l'université Paris-Saclay, qui paraîtront dans les numéros 6-7, 8-9 et 10 (2016) de *médecine/sciences*.