m/s
médecine/sciences

MARS 2020
numéro 3
p 191 > 294
volume 36

> www.medecinesciences.org

REVUES

Sphère orale et environnement

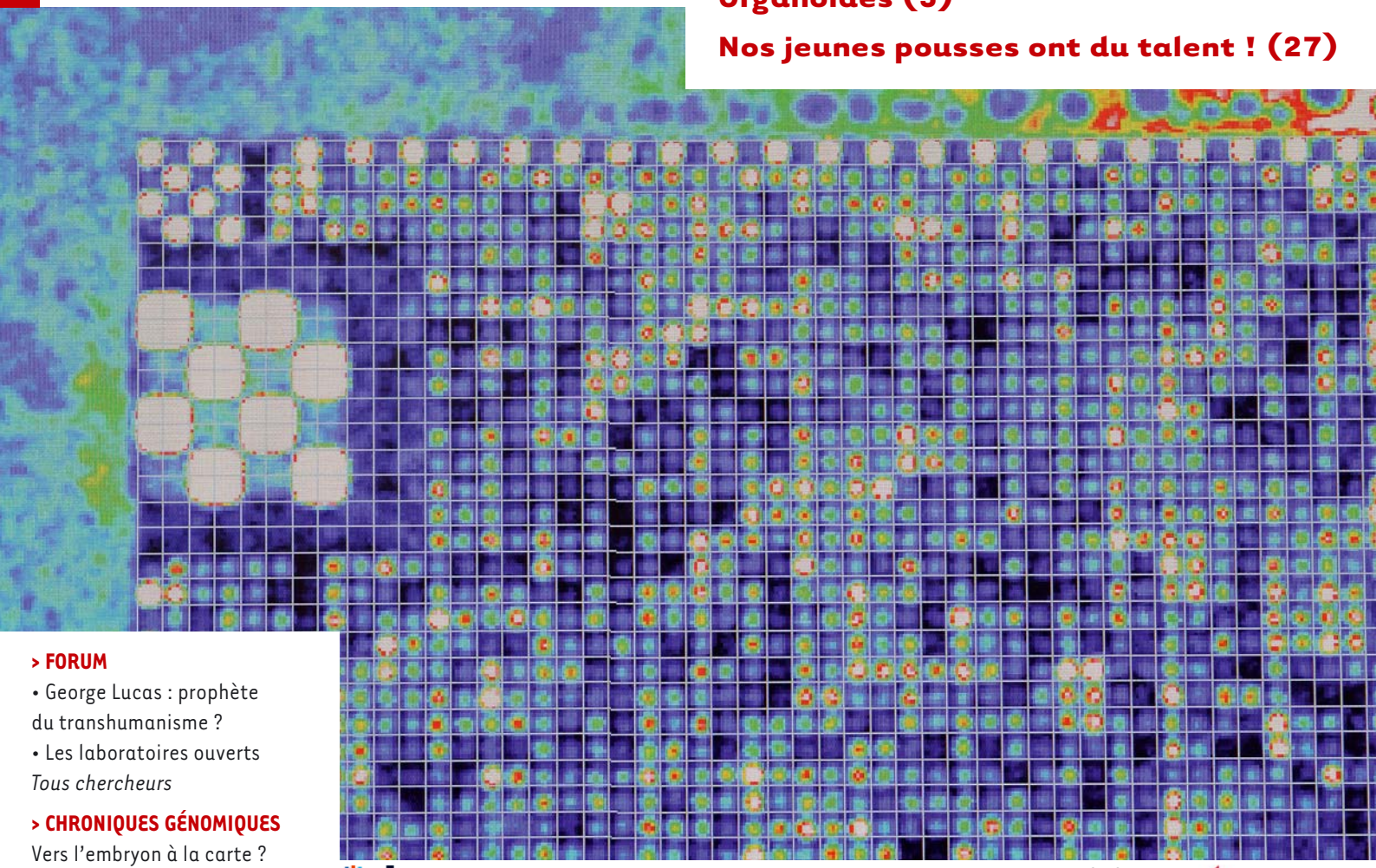
Syndromes de surcroissance

SEP et immunomodulateurs

Virus endogènes et immunité

Organoïdes (5)

Nos jeunes pousses ont du talent ! (27)



> FORUM
• George Lucas : prophète du transhumanisme ?
• Les laboratoires ouverts
Tous chercheurs

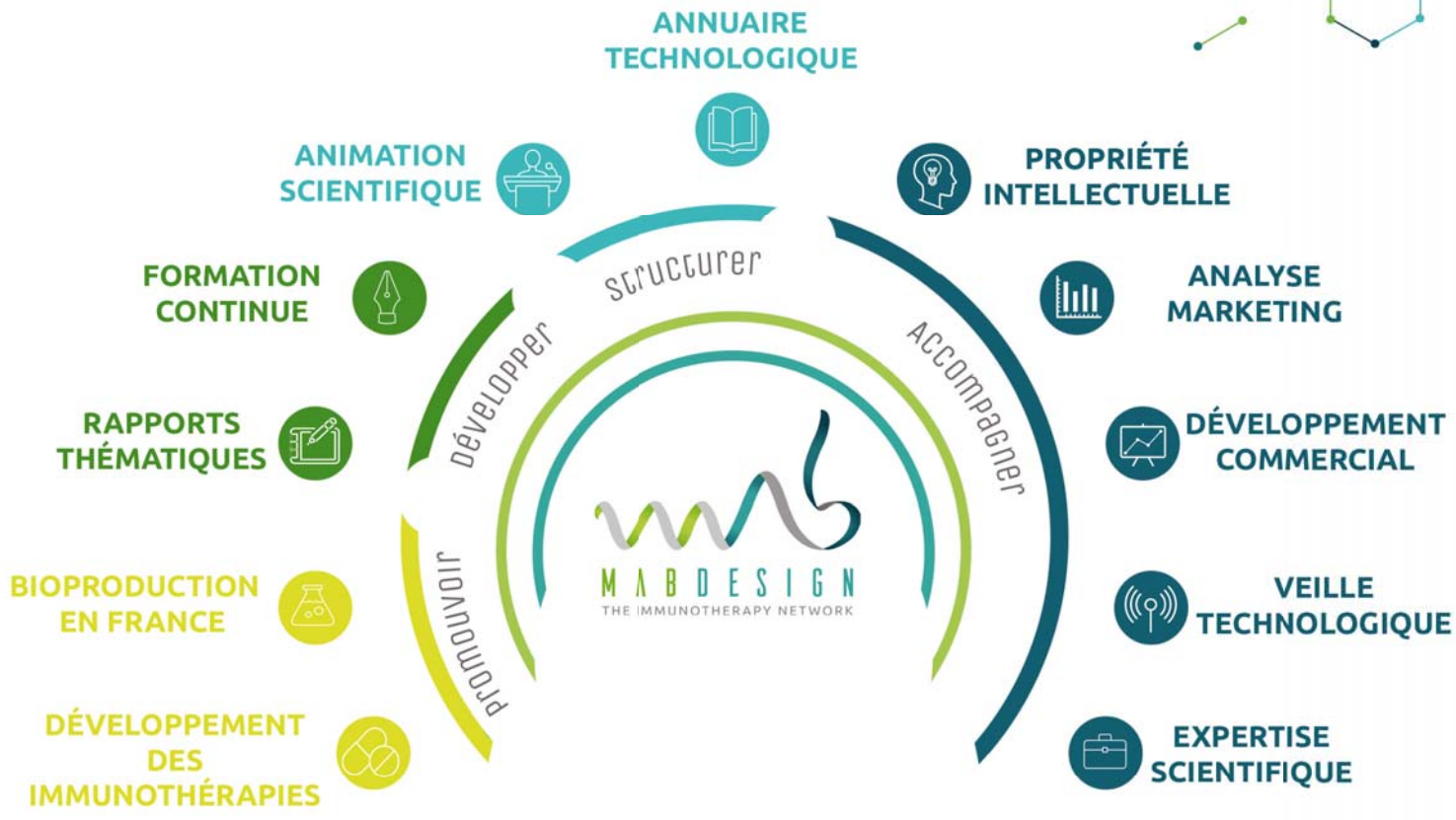
> CHRONIQUES GÉNOMIQUES
Vers l'embryon à la carte ?

Inserm

25 €

edp sciences

REJOIGNEZ
LE RÉSEAU DE L'IMMUNOTHÉRAPIE !



Bât. L'Initial
17, rue Crépet
69007 Lyon
Tel. 04 78 02 39 88
contact@mabdesign.fr
www.mabdesign.fr

MABDESIGN
THE IMMUNOTHERAPY NETWORK

Revue internationale de biologie et de médecine

Depuis janvier 2018, sont disponibles en accès libre sur le site de la revue tous les articles des chercheurs, auteurs de *m/s*, qui se déclarent correspondants d'une des 65 institutions françaises (organismes de recherche ou universités) (voir le lien ci-dessous) qui ont adhéré à l'accord national négocié en France par EDP Sciences et le ministère de la Recherche
https://www.edpsciences.org/en/national-open-access-agreement-in-france/list-of-member-institutions-in-2018

SOMMAIRE

ÉDITORIAL

195 Un objectif de santé publique : le vieillissement durable
Éric Gilson

LE MAGAZINE

NOUVELLES

197 La macro-architecture en lobules du tissu adipeux humain définit des niches influençant le devenir des cellules progénitrices
Nathalie Boulet, Jean Galitzky

200 Le traitement antioxydant protège contre l'emphysème mais favorise la survenue et la progression du cancer du poumon
Marielle Breau, David Bernard, Fatima Mechta-Grigoriou, Serge Adnot

203 Coordination de la décapsidation et de l'import nucléaire de VIH-1 par la transportine-1
Juliette Fernandez, Nathalie J. Arhel

206 La réponse interféron : un grand pouvoir implique de grandes responsabilités
Ghizlane Maarifi, Nikaïa Smith, Sébastien Nisole

209 Mécanotransduction par les cavéoles : un rôle inédit de l'ATPase EHD2
Christophe Lamaze, Stéphanie Torrino

212 Cocaïne en « dents de scie » : modéliser une consommation pathologique de drogue chez le rat
Florence Allain, Anne-Noël Samaha

216 Stress au travail et usage chronique de benzodiazépines : résultats prospectifs issus de la cohorte CONSTANCES
Guillaume Airagnes

218 Comment le stress précoce altère le comportement à l'âge adulte
Anne Teissier, Patricia Gaspar

222 Rôle de l'hepcidine dans les infections cutanées
Mariangela Malerba, Carole Peyssonnaux

M/S REVUES

225 La sphère orale, cible et marqueur de l'exposition environnementale. I. Défauts du développement dentaire
Sylvie Babajko, Véronique Gayrard, Sophia Houari, Ai Thu Bui, Robert Barouki, Karen Niederreither, Jean-Baptiste Fini, Elisabeth Dursun, Xavier Coumoul

231 La sphère orale, cible et marqueur de l'exposition environnementale. II. Maladies diagnostiquées chez l'adulte
Sylvie Babajko, Géraldine Lescaille, Loredana Radoï, Ai Thu Bui, Vanessa Baaroun, Emile Boyer, Sandrine Delbosc, Hélène Chardin, Robert Barouki, Xavier Coumoul

PHOTO DE COUVERTURE : *Scan par fluorescence d'une puce à ADN permettant d'identifier le génotype de l'ensemble des marqueurs d'un génome. Équipe génétique et biothérapies des maladies dégénératives du système nerveux et endocrinien. Unité de recherche 986 Inserm, Génomique, facteurs environnementaux et biothérapie des maladies endocriniennes et neurologiques, 94270 Le Kremlin Bicêtre, France. © Inserm/ Delapierre Patrick.*

@ms_MedSci

DIRECTEUR DE LA PUBLICATION
Gilles Bloch
Président-Directeur général de l'Inserm

RÉDACTION
RÉDACTEUR EN CHEF
Jean-Luc Teillaud (Paris)

RÉDACTEUR EN CHEF ADJOINT
Thierry Jouault (Paris-Lille)

SECRÉTAIRE GÉNÉRAL DE LA RÉDACTION
François Flori (Paris)

ADJOINT À LA RÉDACTION
Jean-Pierre Hardelin (Paris)

CONSEILLER SCIENTIFIQUE
Hervé Chneiweiss (Paris)

DIRECTRICE ÉDITORIALE
Martine Krief-Fajnzylberg

CONSEILLERS ET REPRÉSENTANTS DE L'INSERM
Suzy Mouchet
Michel Pohl

EDP Sciences
17, avenue du Hoggar
91944 Les Ulis Cedex, France
Tél. : 06 09 34 98 84
Fax : 01 49 85 03 45
francois.flori@edpsciences.org

Indexée dans
PubMed/Medline
Current Contents, série Life Sciences
EMBASE/Excerpta Medica
PASCAL
CABS
BIOSIS

Revue internationale de biologie et de médecine

235 Les syndromes de surcroissance segmentaire et les stratégies thérapeutiques
Quitterie Venot, Guillaume Canaud

243 La sclérose en plaques et les médicaments immunomodulateurs des récepteurs de la sphingosine 1-phosphate
Franck Talmont, Anastassia Hatzoglou, Olivier Cuvillier

253 Les rétrovirus endogènes : un rôle clé dans la programmation des lymphocytes T CD4
Véronique Adoue, Olivier Joffre

ORGANOÏDES (5)

261 L'émergence des modèles miniatures de foie gras humain en 3D générés en laboratoire
Alexandra Collin de l'Hortet, Hélène Gilgenkrantz

FORUM

DÉBATS

264 George Lucas : prophète du transhumanisme ?
Bettina Couderc

271 Les laboratoires ouverts *Tous Chercheurs*
Jean Thimonier, Annick Brun-Jacob, Marion Mathieu, Jonas Durand, Pascale Frey-Klett, Constance Hammond

PARTENARIAT *MÉDECINE/SCIENCES* – ÉCOLES DOCTORALES – MASTERS (27)

Master Biobanks et Complex Data Management
(sous la coordination de Sophie Sibéril)

NOUVELLES

274 Les biobanques, des structures essentielles à la recherche médicale
Thomas Liney, Alexandre Mitov, Gbago Laurent Onivogui, Nicole Arrighi

277 Impact de la phase pré-analytique sur la qualité des échantillons collectés dans les biobanques
Marion Amalfitano, Qifeng Dong, Aissata Keita

279 Bioéthique : l'existence des contraintes légales et réglementaires des biobanques
Zeineb Messaoudi, Nisrine Soltani, Nicole Arrighi

282 *Biobankonomics* et pérennité financière des biobanques
Hadi Sqalli, Nora El Awadi, Caroline Rancati

285 Étude du système de gestion de l'information (*biobank information management system*) pour les annotations clinico-biologiques des biobanques
Caroline Le Queau, Wendy Ann Phillips, Apoorva Srinivasan

CHRONIQUES GÉNOMIQUES

289 Scores polygéniques : vers l'embryon à la carte ?
Bertrand Jordan

COMITÉ ÉDITORIAL
Antoine Bril (Paris)
Paul Czernichow (Paris)
Laurent Dollé (Bruxelles)
Carine Franc (Villejuif)
Marie Gaille (Paris)
Hélène Gilgenkrantz (Paris)
Bruno Giros (Montréal)
Marcel Goldberg (Paris)
Bruno Goud (Paris)
Jacques Haiech (Strasbourg)
Frédéric Jaisser (Paris)
Xavier Jeunemaitre (Paris)
Bertrand Jordan (Marseille)
Anne-Marie Moulin (Paris)
Anna Salvetti (Lyon)
Sophie Sibéril (Paris)
Alain Tedgui (Paris)

COMITÉ SCIENTIFIQUE
Joël Bockaert (Montpellier)
Denis Duboule (Genève)
Gérard Friedlander (Paris)
Thierry Galli (Paris)
Simone Gilgenkrantz (Nancy)
Michel Goldman (Bruxelles)
Jean-Pierre Grünfeld (Paris)
Axel Kahn (Paris)
Jean-Claude Kaplan (Paris)
Jean-François Lacronique (Paris)
Arnold Munnich (Paris)
Jean-Paul Ortonne (Nice)
Marc Peschanski (Évry)
Jacques Piette (Liège)
Jacques Pouysségur (Nice)
Bernard Rossier (Lausanne)
Guy Rousseau (Bruxelles)
Philippe Sansonetti (Paris)
Germain Trugnan (Paris)
Gilbert Vassart (Bruxelles)
Éric Vivier (Marseille)

Ce numéro de *médecine/sciences* est soutenu par une bourse accordée par l'Institut la Conférence Hippocrate-Groupe de Recherche Servier

International journal of biology and medicine

CONTENTS

EDITORIAL

195 A public health goal: sustainable aging
Éric Gilson

THE MAGAZINE

NEWS

197 Lobular architecture of human adipose tissue defines niches shaping progenitor cell fates
Nathalie Boulet, Jean Galitzky

200 Antioxidant treatment promotes lung cancer while protecting against lung emphysema
Marielle Breau, David Bernard, Fatima Mechta-Grigoriou, Serge Adnot

203 Transportin-1 orchestrates HIV-1 uncoating and nuclear entry
Juliette Fernandez, Nathalie J. Arhel

206 Interferon response: with great power comes great responsibility
Ghizlane Maarifi, Nikaïa Smith, Sébastien Nisole

209 Caveolae mechanotranduction: a new role for the EHD2 ATPase
Christophe Lamaze, Stéphanie Torrino

212 Cocaine peaks and troughs. Modeling pathological drug use in rats
Florence Allain, Anne-Noël Samaha

216 Job stress and benzodiazepines long-term use: prospective findings from the CONSTANCES cohort
Guillaume Airagnes

218 How early life impacts emotional behaviour in adulthood
Anne Teissier, Patricia Gaspar

222 Role of hepcidin in cutaneous infections
Mariangela Malerba, Carole Peyssonnaux

M/S REVIEWS

225 Oral cavity as a target and a marker of environmental exposures: developmental dental defects
Sylvie Babajko, Véronique Gayrard, Sophia Houari, Ai Thu Bui, Robert Barouki, Karen Niederreither, Jean-Baptiste Fini, Elisabeth Dursun, Xavier Coumoul

231 Oral cavity as a target and a marker of environmental exposures: diseases diagnosed during adulthood
Sylvie Babajko, Géraldine Lescaille, Loredana Radoï, Ai Thu Bui, Vanessa Baaroun, Emile Boyer, Sandrine Delbosc, Hélène Chardin, Robert Barouki, Xavier Coumoul

médecine/sciences a été le fruit d'une coopération entre le gouvernement de la République française et le gouvernement du Québec, à la suite d'une recommandation de la Commission permanente de coopération franco-québécoise.

médecine/sciences est membre du *Committee on Publication Ethics* (COPE)
www.publicationethics.org

CRÉDITS PHOTOS :
p. 225 : © Inserm - Bertrand Kerebel ;
p. 231 : © Inserm - Bertrand Kerebel ;
p. 235 : © Guillaume Canaud ;
p. 243 : © Inserm - Alice Lieury ;
p. 253 : © Olivier Joffre ;
p. 261: © Inserm U49 ;
p. 264 : © tous droits réservés ;
p. 271 : © Constance Hammond ;
p. 289 : © tous droits réservés.

Soumission électronique *médecine/sciences*

***médecine/sciences* est dotée d'une gestion éditoriale automatisée, *via* le système informatique Fontisworks (http://msc.fontismedia.com). Tous les manuscrits, brèves, nouvelles, éditoriaux, synthèses, ou textes du forum, doivent être soumis par voie électronique, et nos experts doivent également soumettre leur évaluation par voie électronique.**

La marche à suivre est très simple : le nouvel utilisateur accède à la page d'accueil du site de soumission en ligne de *médecine/sciences* à l'adresse suivante : http://msc.fontismedia.com et clique sur le bouton « accès auteur » (ou « accès expert ») dans la liste de liens figurant sur l'écran qui s'affiche. Si l'utilisateur est un auteur, il sera d'abord invité à créer son compte en s'enregistrant. Il recevra un mail de confirmation contenant son mot de passe. L'enregistrement ne s'effectue qu'une seule fois, lors de la toute première utilisation. À chaque connexion suivante, il suffit de cliquer directement sur « auteur » pour s'identifier, saisir le nom d'utilisateur (mail) et le mot de passe pour entrer dans le système. Une fois dans le système, l'auteur souhaitant soumettre un manuscrit suit le cheminement indiqué pour saisir les différentes informations afférant à la soumission, ainsi que pour télécharger les fichiers de son manuscrit.

Les experts, eux, seront d'abord sollicités par mail, et devront, dans une première étape, accepter ou refuser l'expertise en entrant dans le système *via* « l'accès expert », en indiquant leur identifiant (adresse e-mail) et le numéro du manuscrit qui leur aura été indiqué dans le mail de sollicitation. Puis, comme précédemment, suivre les informations pour télécharger le manuscrit à évaluer, puis, dans un second temps, déposer leur expertise.

Tous les documents nécessaires à la soumission en ligne sont accessibles sur la page de garde du site *M/S* de Fontismedia.

Les auteurs qui ne pourraient pas soumettre leur manuscrit *via* fontismedia auront la possibilité de le soumettre par e-mail au secrétariat de *Médecine/Sciences*.

Toute information complémentaire et toute aide pourront être apportées par le secrétariat général de la rédaction de *M/S* (francois.flori@edpsciences.org)

REVUE PRODUITE ET HÉBERGÉE PAR
EDP Sciences
17, avenue du Hoggar
91944 Les Ulis Cedex, France
Tél. : 06 09 34 98 84
Fax : 01 49 85 03 45
francois.flori@edpsciences.org

IMPRIMEUR
Corlet, Imprimeur, S.A.
ZI route de Vire,
14110 Condé-sur-Noireau, France
N° 83406

INFOGRAPHIE, MISE EN PAGE
Desk
25, boulevard de la Vannerie
53940 St-Berthevin, France

SERVICE ABONNEMENTS
EDP Sciences
17, avenue du Hoggar
PA de Courtabœuf
91944 Les Ulis Cedex A, France
Tél. : 01 69 18 75 75
Fax : 01 69 86 06 78
subscribers@edpsciences.org

Copyright© « Médecine/Sciences-Inserm ». Publication périodique mensuelle. Tous droits de reprographie à des fins de vente, de location, de publicité ou de promotion réservés à l'éditeur.
Commission paritaire n° 1122 T 81597
Dépôt légal :
à parution
ISSN n° 07670974
ISSN électronique n° 1958-5381

International journal of biology and medicine

235 Segmental overgrowth syndromes and therapeutic strategies
Quitterie Venot, Guillaume Canaud
243 Multiple sclerosis and modulators of sphingosine 1-phosphate receptors
Franck Talmont, Anastassia Hatzoglou, Olivier Cuvillier
253 Endogenous retroviruses: friend or foe of the immune system?
Véronique Adoue, Olivier Joffre

ORGANOIDS (5)

261 Emergence of 3D human fatty liver models engineered in the laboratory
Alexandra Collin de l'Hortet, Hélène Gilgenkrantz

FORUM

DEBATES

264 George Lucas: prophet of transhumanism?
Bettina Couderc
271 The open labs *Tous Chercheurs*
Jean Thimonier, Annick Brun-Jacob, Marion Mathieu, Jonas Durand, Pascale Frey-Klett, Constance Hammond

PARTNERSHIP *MÉDECINE/SCIENCES* - DOCTORAL SCHOOLS-MASTERS (27)

Master Biobanks and Complex Data Management
(coordinated by Sophie Sibéril)

NEWS

274 Introduction into the world of biobanks in human health
Thomas Liney, Alexandre Mitov, Gbago Laurent Onivogui, Nicole Arrighi
277 Impact of the pre-analytical phase on the quality of samples collected in biobanks
Marion Amalfitano, Qifeng Dong, Aissata Keita
279 Legal and ethical considerations for the use of biobanks
Zeineb Messaoudi, Nisrine Soltani, Nicole Arrighi
282 Biobankonomics: the sustainability indicators of biobanks
Hadi Sqalli, Nora El Awadi, Caroline Rancati
285 Practical use of biobank information management system (BIMS) for clinico-biological annotations in biobanks
Caroline Le Queau, Wendy Ann Phillips, Apoorva Srinivasan

TALES OF THE GENOME

289 Polygenic scores: towards designer babies?
Bertrand Jordan

This issue of *médecine/sciences* is supported by a grant of Institut la Conférence Hippocrate-Servier Research Group

INDEX DES ANNONCEURS : *MabDesign, 2e couv. - Premup, p. 215. - IReSP, p. 224. - EDP Sciences, p.230. - 32nd European academy of childhood disability, p. 234. - Myobase, p. 252. - SFM/Filnemus, p. 270, p. 288. - Spinal Muscular Atrophy Paris Évry 2020, p. 260. - Global Registry for Col-6 related dystrophies, p. 242. - Parresia, p. 292. - Bulletin d'abonnement, p. 294. - Prix Ruban rose 2020, 3e couv. - JNI 2020, 4e couv.*

médecine/sciences 2020 ; 36 : 195-6

Éditorial

Un objectif de santé publique : le vieillissement durable

Éric Gilson

> Le vieillissement est généralement vu par les biologistes comme une diminution progressive de la fonctionnalité des organes, pouvant aboutir à la mort. Il s'accompagne d'une augmentation de la susceptibilité de développer de nombreux cancers et maladies dégénératives pouvant toucher la quasi-totalité des organes (maladies neurodégénératives, cardio-vasculaires, métaboliques, pulmonaires et articulaires pour n'en citer que quelques unes). Savoir si le vieillissement est un processus programmé, comme l'est le développement, dont il pourrait constituer l'épilogue, ou simplement une accumulation aléatoire de dommages est une question polémique. En d'autres termes, existe-t-il une biologie propre du vieillissement ou simplement des situations physiopathologiques liées à la dégénérescence des organes et des systèmes ? Cette question est fondamentale pour le traitement médical du vieillissement, car s'il existait une biologie propre du vieillissement, elle pourrait nous éclairer sur les déterminants biologiques communs à de nombreuses maladies. Il serait alors possible d'intervenir sur ces déterminants pour prévenir simultanément l'apparition de nombreuses maladies dans la population générale. Cette approche révolutionnerait la médecine et notre société.

Les progrès récemment accomplis par la communauté biomédicale dans le domaine du vieillissement sont impressionnants et dessinent les contours de ce qui apparaît comme une biologie propre du vieillissement. Son concept « central » repose sur le fait que la cellule peut vieillir : on dit qu'elle devient sénescente et que cette sénescence est en grande partie responsable du vieillissement de l'organisme. Les travaux de recherche sur la sénescence cellulaire ont abouti à la description d'une série de dysfonctionnements moléculaires responsables du vieillissement : instabilité génomique, raccourcissement télomérique, altérations épigénétiques, perte de la protéostase, dérégulation du métabolisme énergétique, dysfonctionnement mitochondrial, épuisement des cellules souches et communication intercellulaire altérée [1]. Tous ces dysfonctionnements contribuent à l'accumulation des cellules sénescentes dans nos tissus, plaçant la sénescence au cœur de la biologie propre du vieillissement et suscitant une nouvelle stratégie pharmacologique, appelée sénothérapie, qui consiste à empêcher ou réverser l'accumulation de cellules sénescentes dans nos tissus pour prévenir et soigner les maladies du vieillissement. Cependant, à l'inverse, la sénescence peut être aussi bénéfique pour certaines étapes du développement, ainsi que pour la réparation tissulaire et la protection contre le cancer. Les futurs traitements sénolytiques devront donc respecter les « bonnes » cellules sénescentes et agir au bon moment et au bon endroit.

Le raccourcissement de l'ADN télomérique[1] est le seul type de dysfonctionnement cellulaire observé lors du vieillissement qui soit également clairement programmé au cours du développement, avec une inhibition somatique de la télomérase en fin d'embryogenèse [2]. Le rôle clé de ce raccourcissement dans le vieillissement est d'ailleurs illustré par le fait que les patients porteurs de mutations dans les gènes de maintenance des télomères ont des télomères bien plus courts que ceux de la population générale, à âge égal, et souffrent d'un syndrome progeroïde (téloméropathies)[2]. De plus, dans la population générale, les télomères courts sont associés à un risque augmenté de mortalité, quelle que soit la cause de celle-ci.

Mais le raccourcissement de l'ADN télomérique n'est pas seulement la conséquence de l'incapacité de notre machinerie conventionnelle de réplication à dupliquer fidèlement les deux brins de la molécule d'ADN parentale ; il est aussi le résultat d'un mécanisme spécifique, couplé à la réplication de nos extrémités de chromosome, qui entraîne la dégradation de l'extrémité du brin 5' d'une des deux chromatides sœurs. Ce mécanisme associe la fixation de l'exonucléase Apollo au télomère par l'intermédiaire de la sous-unité du complexe Shelterin appelée TRF2 (*TTAGGG repeat binding factor 2*)[1], elle-même fixée sur l'ADN télomérique double brin [3]. Il existe donc un mécanisme spécifique, sélectionné au cours de l'évolution, pour amplifier le raccourcissement de l'ADN télomérique lié à la réplication terminale, suggérant qu'un raccourcissement progressif peut conférer un avantage évolutif. Soulignons d'ailleurs qu'une patiente exprimant une protéine Apollo incapable d'interagir avec TRF2 présente une forme sévère

[1] Les extrémités naturelles de chromosomes, appelées télomères, sont formées d'une répétition en tandem de petits motifs d'ADN (5'-TTAGGG chez tous les vertébrés) qui sert de substrat à une transcriptase inverse, la télomérase, qui compense l'érosion réplicative de nos extrémités de chromosome, et de site de fixation pour le complexe protéique Shelterin qui stabilise les télomères en les empêchant d'être reconnus comme des cassures accidentelles.

[2] La dyskératose congénitale est le syndrome progéroïde de référence des téloméropathies avec ses formes sévères qui sont les syndromes de Hoyeraal-Hreidarsson et de Revesz. D'autres types de téloméropathies regroupent le syndrome de Coats plus, les anémies aplasiques et les fibroses pulmonaires idiopathiques.

https://doi.org/10.1051/medsci/2020038

de téloméropathie [4]. De toutes ces données émerge donc la vision qu'un raccourcissement progressif des télomères, normalement contrôlé, peut être bénéfique au cours du développement embryonnaire, voire au cours de la vie adulte et du vieillissement. Cela pourrait s'expliquer par les propriétés onco-suppressives du raccourcissement de l'ADN télomérique. Cette question reste cependant largement sans réponse. Il existe par ailleurs de plus en plus d'évidences montrant que les télomères et les mitochondries sont fonctionnellement liés, couplant le statut télomérique au métabolisme énergétique [5]. Une hypothèse intéressante qui en découle est que la taille des télomères serve de rhéostat au métabolisme au cours du développement et du vieillissement.

L'idée apparaît donc que le raccourcissement somatique des télomères est un programme génétique *per se,* liant développement et vieillissement. Mais combien de temps pouvons-nous vivre ? Le taux de mortalité par année jusqu'à l'âge de 100 ans a fortement diminué depuis le milieu du XIXe siècle dans les sociétés industrielles mais est demeuré constant au-delà, avec une espérance de vie maximale plafonnant autour de 120 ans (Jeanne Calment a atteint 122 ans) [6]. Il apparaît donc que les avancées socio-économiques et médicales n'ont pas permis de faire reculer significativement le taux de mortalité annuel au-delà de 100 ans, suggérant l'existence d'une barrière biologique intrinsèque qui limite la vie humaine au-delà cet âge. La nature de cette barrière est inconnue. Que le programme télomère contribue à cette barrière est une hypothèse séduisante.

Si la taille de nos télomères à la naissance et leur vitesse de raccourcissement dans les cellules somatiques sont en partie déterminées génétiquement, des situations de stress, y compris psychologiques, peuvent accélérer leur raccourcissement et contribuer à un vieillissement prématuré [2]. Par exemple, les adultes ayant été victimes de sévices dans leur enfance présentent des télomères plus courts que la taille normalement observée, et des signes de vieillissement prématuré. Ces résultats indiquent que, pour limiter l'apparition de maladies chroniques invalidantes dans la population âgée, pour obtenir un vieillissement que l'on pourrait qualifier de durable, il est essentiel de mieux comprendre les relations entre les processus biologiques du vieillissement, les histoires de vie, le comportement, le contexte socio-économique et l'environnement. Un message donc à méditer par nos décideurs politiques. Un premier pas a été fait par l'Inserm dont un des programmes transversaux est consacré au vieillissement (consortium AGEMED « *from aged cells to medical applications* »), qui réunit plus de vingt équipes françaises représentant toutes les disciplines biologiques liées au vieillissement. Nous avons besoin maintenant d'élargir ce spectre disciplinaire par des approches holistiques et intégratives et de créer les conditions de coalitions internationales ambitieuses pour proposer à la société des solutions pour un vieillissement durable. ◊

A public health goal: sustainable aging

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 2013 ; 153 : 1194-217.
2. Blackburn EH, Epel ES. Telomeres and adversity: Too toxic to ignore. *Nature* 2012 ; 490 : 169-71.
3. Ye J, Lenain C, Bauwens S, *et al*. TRF2 and Apollo cooperate with topoisomerase 2alpha to protect human telomeres from replicative damage. *Cell* 2010 ; 142 : 230-42.
4. Touzot F, Callebaut I, Soulier J, *et al*. Function of Apollo (SNM1B) at telomere highlighted by a splice variant identified in a patient with Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ; 107 : 10097-102.
5. Robin J, Jacome Burbano MS, Peng H, *et al*. Mitochondrial function in skeletal myofibers is controlled by a TRF2-SIRT3 axis over lifetime. *Aging Cell* 2020 Jan 28 : e13097. doi: 10.1111/acel.13097.
6. Burger O, Baudisch A, Vaupel JW. Human mortality improvement in evolutionary context. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; 109 : 18210-4.

E. Gilson
Université Côte-d'Azur, Inserm, CNRS
Institut de Recherche sur le Cancer et le Vieillissement
(*Institute for Research on Cancer and Aging*, Nice IRCAN)
FHU OncoAge, Département de Génétique
CHU, Nice, France.
eric.gilson@unice.fr

TIRÉS À PART
E. Gilson

Tarifs d'abonnement *m/s* - 2020

Abonnez-vous à *médecine/sciences*

> Grâce à *m/s*, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement page 294 dans ce numéro de *m/s*

médecine/sciences 2020 ; 36 : 197-224

NOUVELLE

La macro-architecture en lobules du tissu adipeux humain définit des niches influençant le devenir des cellules progénitrices

Nathalie Boulet, Jean Galitzky

Inserm UMR 1048, équipe 1,
Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (I2MC), Université de Toulouse, BP84225,
31432 Toulouse Cedex 4, France.
jean.galitzky@inserm.fr

> Les tissus adipeux jouent un rôle primordial dans la gestion des réserves énergétiques de l'organisme en assurant, grâce aux adipocytes, le stockage et la libération des lipides. Les tissus adipeux sont localisés dans des dépôts anatomiques principalement sous-cutanés (Sc) et viscéraux (Vs). Chez l'homme, la répartition corporelle de ces dépôts est déterminante pour la santé : un développement excessif de tissu adipeux Vs, qui caractérise l'obésité « centrale », est en effet associé à un risque élevé de développer des complications cardio-métaboliques [1]. Les mécanismes cellulaires et moléculaires de cette association restent cependant à déterminer. Le concept d'« expansibilité » des dépôts adipeux développé par Vidal Puig postule qu'un défaut de mise en réserve des lipides en excès dans le tissu adipeux Sc conduit à leur accumulation dans les organes métaboliquement actifs tels que le muscle, le foie et le pancréas [2]. Ces dépôts ectopiques sont toxiques et contribuent à la résistance à l'insuline. En parallèle, l'hypothèse portale propose que l'activité élevée de libération des acides gras du tissu adipeux Vs dans le sang expose le foie à de fortes quantités de lipides arrivant par la veine porte, ce qui conduit à une résistance hépatique à l'insuline [3]. La capacité des dépôts adipeux à gérer les lipides en excès apparaît donc déterminante. L'hypertrophie[1] et l'hyperplasie[2] adipocytaire sont les deux mécanismes qui permettent d'augmenter la capacité de stockage d'un dépôt adipeux. L'augmentation de la quantité de triglycérides dans la vacuole lipidique des adipocytes conduit à leur hypertrophie, dont la limite dépend des contraintes physiques liées à la matrice extracellulaire qui les entoure [4]. L'augmentation du nombre d'adipocytes provient de la différenciation en adipocytes de cellules progénitrices présentes dans les dépôts (adipogenèse). Nos études ont montré que les cellules progénitrices du tissu adipeux Sc humain qui ont la capacité de se différencier en adipocytes *in vitro* sont caractérisées par l'expression du marqueur de surface CD34 et l'absence des marqueurs CD45 et CD31 [5]. Ces cellules ont aussi la capacité d'exprimer des marqueurs des myofibroblastes, dont αSMA (*smooth muscle actin*), lorsqu'elles sont stimulées par TGFβ (*transforming growth factor β*) *in vitro* [6]. Plus récemment, nous avons mis en évidence, à l'aide des marqueurs membranaires MSCA1 (*mesenchymal stem cell antigen 1* ou phosphatase alcaline tissulaire non-spécifique) et CD271 (ou NGFR/p75NTR, récepteur du facteur de croissance neurale NGF), que la population native des cellules progénitrices humaines est constituée d'au moins trois sous-populations [7], ce qui soulève plusieurs questions. Ces sous-populations représentent-elles des cellules avec des potentialités de différenciation différentes ou correspondent-elles à des états distincts au cours de la différenciation adipocytaire ou myofibroblastique ? Les dépôts adipeux Sc et Vs possèdent-ils des sous-populations équivalentes de cellules progénitrices ? Enfin, cette hétérogénéité des progéniteurs est-elle liée à des localisations particulières définissant des niches spécifiques ?

Notre étude, réalisée par des approches de tri cellulaire, de cytométrie en flux, d'imagerie en trois dimensions sur des territoires adipeux appariés Sc et Vs (omentum[3]) d'individus de poids normal ou obèses, a révélé l'hétérogénéité fonctionnelle de ces sous-populations de progéniteurs associée à une organisation spatiale particulière dans les dépôts adipeux [8]. Ces caractéristiques pourraient expliquer les disparités observées entre développement excessif des

[1] L'hypertrophie cellulaire est une augmentation du volume d'une cellule en rapport avec une augmentation de la taille et du nombre de ses constituants.

[2] L'hyperplasie désigne une augmentation du volume d'un tissu ou d'un organe due à l'augmentation du nombre de ses cellules.

[3] L'omentum, ou épiploon, correspond à deux feuillets de péritoine (la membrane séreuse qui tapisse l'abdomen, le pelvis et les viscères) accolés.

https://doi.org/10.1051/medsci/2020039

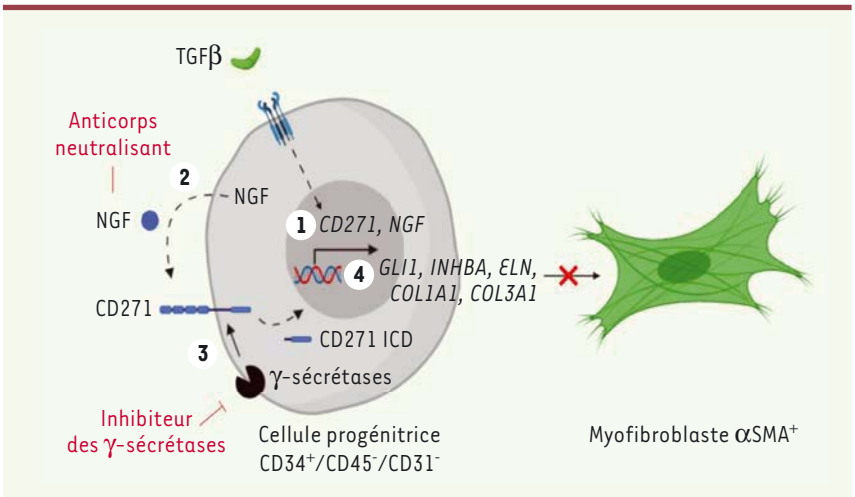


Figure 1. ***Rôle de l'axe CD271/NGF dans la différenciation myofibroblastique.*** En réponse au TGFβ, les expressions de CD271 et de son ligand NGF augmentent ① dans les cellules progénitrices CD34⁺/CD45⁻/CD31⁻. NGF active son récepteur CD271 ② et induit le clivage de ce dernier par les complexes γ-sécrétases ③. La libération de la partie intracellulaire (*intracellular domain*, ICD) de CD271 conduit à l'expression de marqueurs myofibroblastiques ④ (*GLI1*, *INHBA*, *ELN*, *COL1A1*, *COL3A1*, αSMA). La différenciation myofibroblastique peut être inhibée par un anticorps anti-NGF neutralisant ainsi que par un inhibiteur des complexes γ-sécrétases.

masses grasses, leur localisation, et le risque cardio-métabolique.

Des sous-populations de cellules progénitrices avec des potentialités et des origines distinctes

Des approches de tri cellulaire réalisé sur des cellules natives révèlent qu'indépendamment du dépôt adipeux, la sous-population de cellules exprimant MSCA1 (MSCA1⁺) représente les progéniteurs les plus engagés dans la voie adipogénique. En effet, les analyses de données de séquençage d'ARN (Ampliseq) montrent que les progéniteurs MSCA1⁺ ont un enrichissement en transcrits des gènes impliqués dans les voies du métabolisme adipocytaire, et une capacité adipogénique élevée en comparaison avec les autres sous-types, tandis que les cellules qui n'expriment pas MSCA1 et expriment CD271 (MSCA1⁻/CD271⁺) présentent un enrichissement en transcrits des gènes impliqués dans les voies de signalisation activées par le TGFβ et dans la fibrose. *In vitro*, en présence de TGFβ, les progéniteurs MSCA1⁻/CD271⁺ présentent un fort potentiel myofibroblastique, caractérisé par l'expression de marqueurs tels que αSMA, l'inhibine βA (INHBA) et le facteur de transcription GLI1 (*glioma-associated oncogene homolog 1*), et par la synthèse de collagènes. De plus, nos résultats suggèrent que le récepteur CD271, marqueur des progéniteurs des myofibroblastes, est également, avec son ligand NGF, un acteur de la différenciation myofibroblastique induite par le TGFβ *(Figure 1)*. Ainsi, les deux sous-populations de cellules identifiées par l'expression, soit de MSCA1, soit de CD271, représentent respectivement des progéniteurs adipogéniques et myofibroblastiques.

L'analyse transcriptomique de la sous-population de cellules n'exprimant ni MSCA1 ni CD271 (MSCA1⁻/CD271⁻) indique un enrichissement en transcrits de gènes impliqués dans la pluripotence des cellules souches embryonnaires, tels que *CD24*, décrit comme identifiant les progéniteurs adipocytaires murins les plus immatures [9]. Il reste à confirmer si ces cellules sont les précurseurs des sous-populations MSCA1⁻/CD271⁺ et MSCA1⁺. Bien que ce sous-type cellulaire semble correspondre aux cellules les plus immatures dans les deux dépôts, il a une origine développementale différente selon la localisation adipeuse. En effet, les cellules MSCA1⁻/CD271⁻ du tissu adipeux Vs présentent un enrichissement en transcrits épithéliaux et mésothéliaux (gènes *WT1*, *LRRN4*, *MSLN*, gènes de kératines), qui n'est pas retrouvé dans celles du tissu adipeux Sc.

Modulations différentes de ces sous-populations cellulaires avec l'obésité selon le territoire

Par des approches de cytométrie en flux réalisées sur des dépôts Sc et Vs appariés chez des individus de poids normal et chez des individus obèses, nous avons pu montrer que les sous-populations de cellules progénitrices ne sont pas réparties de manière similaire selon la localisation tissulaire et selon le statut d'obésité. En effet, le tissu adipeux Sc d'individus de poids normal contient majoritairement des progéniteurs MSCA1⁻/CD271⁻, alors que leur tissu adipeux Vs est principalement composé de progéniteurs MSCA1⁻/CD271⁺. Chez les individus obèses, le nombre de progéniteurs MSCA1⁺ est augmenté d'un facteur 10 (en moyenne) et celui des progéniteurs MSCA1⁻/CD271⁺ d'un facteur 3 dans le tissu adipeux Sc, alors que le nombre de progéniteurs de chacun des trois sous-types reste inchangé dans le tissu adipeux Vs. Enfin, les progéniteurs isolés du tissu adipeux Sc de patients obèses ont une potentialité adipogénique plus élevée et myofibroblastique plus faible que ceux du tissu adipeux Vs. L'ensemble de ces résultats suggère que les progéniteurs du tissu adipeux Sc s'orientent préférentiellement vers la voie adipogénique avec le développement excessif de la masse grasse dans l'obésité, alors que ceux du tissu adipeux Vs s'engagent préférentiellement vers la voie myofibroblastique. Ainsi, les capacités d'hyperplasie adipocytaire du tissu adipeux Vs seraient limitées et pourraient contribuer aux risques cardio-métaboliques associés à l'obésité centrale.

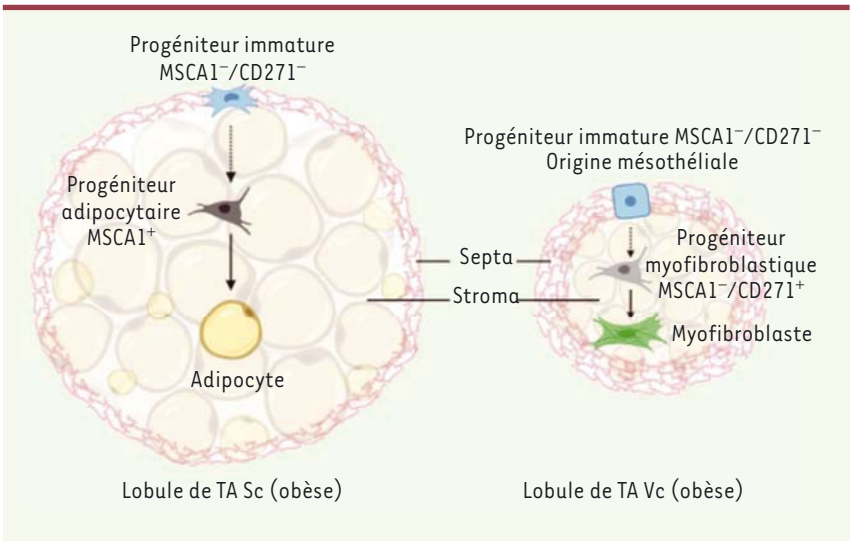


Figure 2. ***Hétérogénéité des lobules des tissus adipeux sous-cutané et viscéral chez l'individu obèse.*** Les lobules de tissu adipeux sont recouverts d'une membrane de tissu conjonctif, le septa, et contiennent les adipocytes dans le stroma. Le tissu adipeux viscéral (Vs) présente des lobules plus petits que le tissu adipeux sous-cutané (Sc), un septum plus dense qui contient des progéniteurs immatures MSCA1⁻/CD271⁻ d'origine mésothéliale, et de nombreux progéniteurs myofibroblastiques MSCA1⁻/CD271⁺. Le tissu adipeux Sc contient dans son stroma davantage de petits et de gros adipocytes, ainsi que de progéniteurs adipocytaires MSCA1⁺ que le tissu adipeux Vs, et, dans ses septa, des progéniteurs immatures MSCA1⁻/CD271⁻, dont l'origine reste à déterminer.

Caractérisation histologique des lobules des tissus adipeux Sc et Vs chez le sujet obèse

Le tissu adipeux humain est organisé en lobules, qui représentent les unités structurales de ce tissu. Cependant la composition matricielle et l'organisation cellulaire de cette unité structurale du lobule, ainsi que les différences potentielles entre les dépôts n'ont pas fait l'objet d'études approfondies. Nos travaux sur la macro-architecture de tissus adipeux Sc et Vs d'individus obèses ont révélé que les lobules du tissu adipeux Sc sont de plus grande taille que ceux du tissu adipeux Vs, et que leur structure matricielle est moins dense. En effet, nous avons montré, par imagerie 3D, la présence de deux compartiments matriciels : le stroma (tissu conjonctif situé à l'intérieur du lobule) et les septa inter-lobulaires (membranes de tissu conjonctif entourant les lobules). Les septa des lobules du tissu adipeux Vs sont plus denses et contiennent des fibres de collagène et d'élastine de diamètre plus important et plus rectilignes que ceux des lobules du tissu adipeux Sc. La faible densité des septa des lobules du tissu adipeux Sc est associée à une répartition des diamètres adipocytaires en faveur des petits (nouvellement formés) et des gros (hypertrophiés) adipocytes.

Niches des cellules progénitrices du tissu adipeux

Les deux compartiments matriciels, septa et stroma, délimitent ainsi deux niches de cellules progénitrices. Nos analyses en cytométrie en flux après dissection des deux compartiments des lobules montrent que les progéniteurs MSCA1⁺ ont une localisation préférentielle dans le stroma, alors que les progéniteurs MSCA1⁻/CD271⁻ sont plus nombreux dans les septa. Les progéniteurs myofibroblastiques MSCA1⁻/CD271⁺, quant à eux, sont présents dans les deux compartiments. L'imagerie sur lobule entier confirme la présence de cellules progénitrices dans les deux compartiments. De plus, elle renforce les conclusions de l'analyse transcriptomique en montrant, pour les progéniteurs des septa des lobules du tissu adipeux Vs, une forme et une organisation distinctes qui rappellent celles des cellules épithéliales et mésothéliales.

Ainsi, le lobule du tissu adipeux Sc des individus obèses possède un fort potentiel d'accroissement de taille, avec des septa peu denses et un stroma hypertrophique et hyperplasique riche en progéniteurs MSCA1⁺. A l'inverse, le lobule du tissu adipeux Vs des individus obèses présente un faible potentiel adipogénique et un fort potentiel myofibroblastique porté par les cellules MSCA1⁻/CD271⁺ et probablement impliqué dans le dépôt plus important de matrice extracellulaire dans les septa, limitant ainsi la capacité d'hypertrophie des adipocytes. Ces différences pourraient être dues à l'origine épithéliale/mésothéliale des progéniteurs MSCA1⁻/CD271⁻ présents dans les septa des lobules du tissu adipeux Vs *(Figure 2)*.

Perspectives

Notre étude a révélé l'importance de l'organisation particulière en lobules des tissus adipeux humains. Récemment, des travaux menés chez la souris ont montré que les cellules immatures du tissu adipeux Sc sont présentes dans une zone riche en matrice extracellulaire qui s'apparente aux septa des lobules adipeux humains [10]. Ces cellules observées dans une niche similaire et qui expriment des marqueurs communs aux progéniteurs MSCA1⁻/CD271⁻ humains que nous avons identifiés, sont à l'origine de deux sous-populations de progéniteurs aux potentiels adipogéniques distincts. Bien que la hiérarchie précise des sous-types de progéniteurs reste à déterminer chez l'homme, il est tentant de penser que les progéniteurs MSCA1⁻/CD271⁻ humains pourraient constituer la population cellulaire la plus immature. La caractérisation des signaux, liés à la niche, qui les orientent vers les voies de différenciation adipogénique

et myofibroblastique devrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin de diminuer les risques cardio-métaboliques associés à l'obésité centrale. ◊

Lobular architecture of human adipose tissue defines niches shaping progenitor cell fates

REMERCIEMENTS

Les travaux du groupe Cellules de la fraction stroma-vasculaire des tissus adipeux, de l'UMR 1048, ont bénéficié du soutien financier de l'Inserm, de la société Clarins et du programme Aviesan en partenariat avec la société Sanofi.

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Tchernof A, Despres JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev* 2013 ; 93 : 359-404.
2. Gray SL, Vidal-Puig AJ. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. *Nutr Rev* 2007 ; 65 : S7-12.
3. Bjorntorp P. Portal adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* 1990 ; 10 : 493-6.
4. Reggio S, Rouault C, Poitou C, *et al*. Increased basement membrane components in adipose tissue during obesity: links with TGFbeta and metabolic phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 2016 ; 101 : 2578-87.
5. Sengenes C, Lolmede K, Zakaroff-Girard A, *et al*. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* 2005 ; 205 : 114-22.
6. Bourlier V, Sengenes C, Zakaroff-Girard A, *et al*. TGFβ family members are key mediators in the induction of myofibroblast phenotype of human adipose tissue progenitor cells by macrophages. *PLoS One* 2012 ; 7 : e31274.
7. Esteve D, Boulet N, Volat F, *et al*. Human white and brite adipogenesis is supported by MSCA1 and is impaired by immune cells. *Stem Cells* 2015 ; 33 : 1277-91.
8. Esteve D, Boulet N, Belles C, *et al*. Lobular architecture of human adipose tissue defines the niche and fate of progenitor cells. *Nat Commun* 2019 ; 10 : 2549.
9. Berry R, Rodeheffer MS. Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nat Cell Biol* 2013 ; 15 : 302-8.
10. Merrick D, Sakers A, Irgebay Z, *et al*. Identification of a mesenchymal progenitor cell hierarchy in adipose tissue. *Science* 2019 ; 364 : 6438.

NOUVELLE

Le traitement antioxydant protège contre l'emphysème mais favorise la survenue et la progression du cancer du poumon

Marielle Breau[1], David Bernard[2], Fatima Mechta-Grigoriou[3], Serge Adnot[1]

[1] Inserm U955, Département de physiologie-explorations fonctionnelles, and DHU A-TVB hôpital Henri Mondor, AP-HP, 94010 Créteil, France.
[2] Centre de recherche en cancérologie de Lyon, UMR Inserm U1052/CNRS 5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France.
[3] *Stress and cancer laboratory*, équipe labellisée LNCC, Institut Curie, Inserm, U830, 75005 Paris, France.
serge.adnot@inserm.fr

Antioxydants et cancer du poumon

Une supplémentation en molécules antioxydantes, telles que la N-acétylcystéine (NAC), est souvent prescrite dans les maladies respiratoires chroniques comme la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), du fait de leurs propriétés mucolytiques, antioxydantes, et anti-inflammatoires [1]. Le bénéfice clinique de ces traitements reste cependant à démontrer. Un bénéfice attendu des antioxydants est leur capacité à diminuer le risque de cancer, en diminuant les dommages à l'ADN et les mutations induites par les espèces réactives de l'oxygène [1]. Cependant, plusieurs études cliniques montrent à l'inverse que les antioxydants augmentent le risque de certains cancers, dont le cancer du poumon [3,4]. Une étude récente suggère en outre que les antioxydants pourraient être nocifs dans la progression du cancer du poumon. Chez des souris porteuses d'une mutation du gène *Ras* et développant un cancer du poumon, le traitement par NAC ou la vitamine E accélère la croissance tumorale, bien qu'il réduise, comme attendu, le stress oxydant et les dommages à l'ADN. L'un des mécanismes évoqués serait une diminution de l'activité de la protéine p53 associée à la suppression du stress oxydant [5].

Une limitation de ces études tient au modèle murin de cancer pulmonaire induit par la mutation du gène *Ras*, qui permet d'étudier l'impact des antioxydants sur la progression tumorale, mais pas sur l'initiation du cancer. Ainsi, l'effet potentiel des antioxydants, en particulier NAC, sur l'induction tumorale et l'émergence du cancer pulmonaire restait inconnu. Cette question est pourtant d'un grand intérêt clinique du fait de la prescription courante de NAC chez les patients bronchitiques et fumeurs atteints ou non de BPCO, et à risque de développer un cancer du poumon.

https://doi.org/10.1051/medsci/2020030

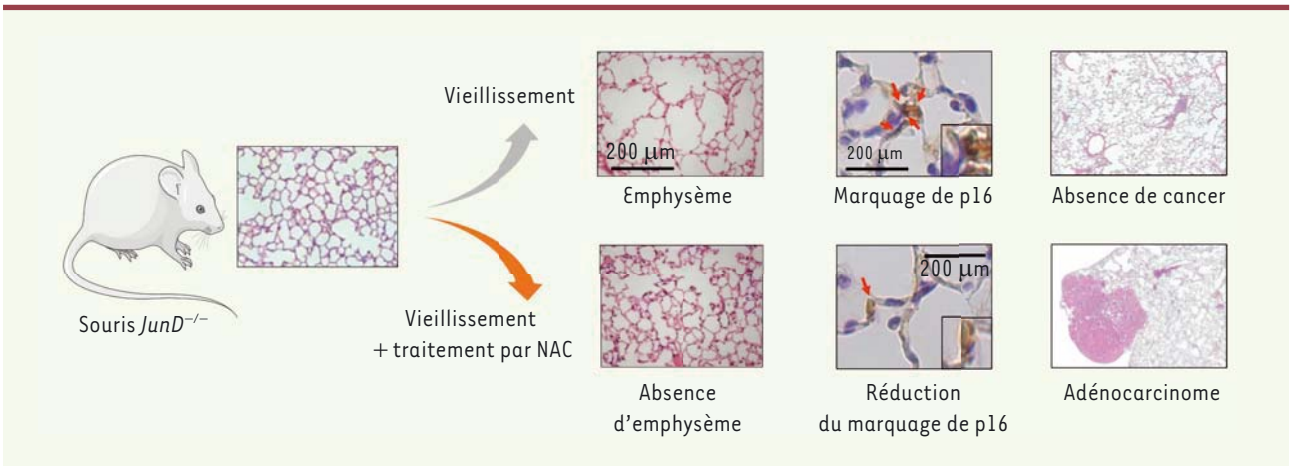


Figure 1. ***L'administration continue de N-acétylcystéine (NAC) à des souris JunD$^{-/-}$ atténue leur emphysème pulmonaire mais augmente la fréquence du cancer du poumon.***

Stress oxydant et sénescence cellulaire : application au poumon

Le stress oxydant, tel que celui provoqué par la fumée de cigarette, est un inducteur de sénescence cellulaire [6,2]. Or celle-ci est habituellement considérée comme une protection contre le cancer [7]. En effet, l'activation des protéines onco-suppressives p53, p21, ou p16 est une étape clé de l'engagement des cellules dans le processus de sénescence. Ainsi, la sénescence en réponse à un stress ponctuel, tel qu'un stress oncogénique, protège de l'initiation tumorale en stoppant la prolifération des cellules et en favorisant leur élimination par le système immunitaire. Néanmoins la sénescence chronique, telle que celle survenant au cours du vieillissement ou celle induite par la fumée de cigarette, pourrait avoir des effets pro-tumoraux, notamment *via* le phénotype sécrétoire des cellules sénescentes (*senescence-associated secretory phenotype*, SASP). Surtout, on sait qu'un échappement à la sénescence, tel que celui induit par l'inactivation des protéines onco-suppressives p53, p21 ou p16, favorise l'émergence de cancers chez la souris, et est associé à la plupart des cancers chez l'homme [7]. Pour la plupart des cellules, l'inactivation de p53, en contournant le processus de sénescence, conduit à la mort cellulaire du fait du raccourcissement excessif des télomères et de l'instabilité génomique qui en résulte [7]. Cependant, certaines de ces cellules peuvent survivre et croître de façon monoclonale en cas de réexpression de la télomérase (85 % des cas) ou de mise en place de mécanismes alternatifs (15 % des cas) protégeant les extrémités des chromosomes. Ces cellules, échappant ainsi à la sénescence et ayant franchi une étape d'instabilité génétique avec de possibles mutations de l'ADN sur des gènes clés, sont particulièrement susceptibles de se transformer en cellules tumorales. Ce mécanisme s'applique au cancer du poumon puisque, dans la grande majorité des cas, l'émergence de ce cancer est associée à une ou plusieurs mutations spécifiques du gène codant p53, avec perte de la fonction de cette protéine.

Stress oxydant et facteur de transcription JunD

Le facteur de transcription JunD joue un rôle clé dans la réponse au stress oxydant en contrôlant l'expression des gènes impliqués dans la production d'enzymes antioxydantes. Des cellules privées de JunD deviennent rapidement sénescentes *in vitro*, conjointement à l'activation de p53 et à la production d'espèces réactives de l'oxygène [8]. Par ailleurs, une diminution de l'expression de JunD a été observée dans les cancers du poumon, pour la plupart associés à une mutation inactivatrice de p53, suggérant un rôle de JunD dans ces cancers (base de données Oncomine). Il a également été montré que la surexpression de JunD inhibe en partie la transformation cellulaire induite par Ras. Nous avons montré que les deux facteurs de transcription contrôlant l'activité antioxydante, JunD et NRF2 (*nuclear factor erythroid-2-related factor 2*), avaient des niveaux d'expression très faibles dans les poumons des patients atteints de BPCO en comparaison avec les poumons de sujets témoins. Ces observations nous ont donc incités à étudier des souris déficientes pour le gène *JunD* ainsi que des souris témoins âgées afin d'évaluer le lien de causalité entre stress oxydant, sénescence cellulaire, et altérations pulmonaires [9].

Le traitement continu de souris *JunD*$^{-/-}$ et de souris témoins, jeunes et âgées, par NAC protège de la sénescence et de l'emphysème pulmonaire, mais induit l'émergence d'un cancer pulmonaire

Pour évaluer plus spécifiquement le rôle du stress oxydant, les souris *JunD*$^{-/-}$ ont été comparées à des souris témoins *JunD*$^{+/+}$ et traitées de façon continue par NAC depuis la naissance, puis étu-

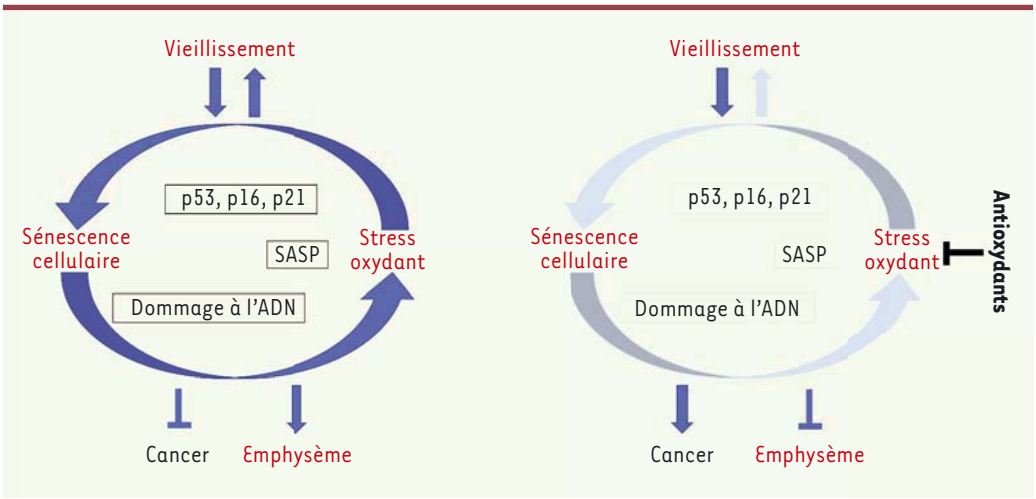


Figure 2. ***Mécanisme proposé pour expliquer l'effet néfaste d'un traitement par antioxydants sur le risque de survenue d'un cancer du poumon.***

diées à l'âge de 4 mois et entre 12 et 24 mois [9]. Notre hypothèse était que les souris *JunD*$^{-/-}$, exposées naturellement au stress oxydant, seraient plus susceptibles de développer, au cours du vieillissement, des altérations pulmonaires telles que celles observées dans la bronchite chronique et la BPCO. Les résultats ont validé cette hypothèse en montrant la présence, chez les souris *JunD*$^{-/-}$, d'un emphysème pulmonaire associé à de nombreuses cellules épithéliales alvéolaires et vasculaires sénescentes. Comme attendu, le traitement chronique par NAC réduit le nombre de cellules sénescentes ainsi que la sévérité de l'emphysème *(Figure 1)*. Cependant, la moitié des souris *JunD*$^{-/-}$ traitées par NAC présentent un adénocarcinome pulmonaire après l'âge de 12 mois, tandis qu'aucune des 14 souris *JunD*$^{-/-}$ traitées par le solvant n'est atteinte de cancer, même à l'âge de 24 mois. Par ailleurs, 13 % des souris témoins (*JunD*$^{+/+}$) traitées par NAC présentent également un adénocarcinome pulmonaire à l'âge de 18 mois [9] *(Figure 1)*.

Un traitement de long cours par NAC chez des souris mutantes privées du facteur de transcription JunD a donc un effet protecteur sur la constitution de l'emphysème pulmonaire, mais il favorise l'émergence d'un cancer du poumon chez ces souris, ainsi que chez des souris témoins qui synthétisent normalement JunD. Nos résultats indiquant que NAC contribue à l'induction du cancer du poumon constituent donc un solide argument en faveur d'un rôle carcinogène des antioxydants en situation de stress oxydant induit par le vieillissement et majoré par l'invalidation du gène *JunD*.

Mécanismes envisagés, l'échappement à la sénescence induite par les antioxydants

Notre hypothèse est que le vieillissement, combiné à l'absence de JunD, conduit à une accentuation des phénomènes de sénescence cellulaire, aboutissant à un état d'équilibre entre, d'une part, ce qui protège du cancer (activation de p53, p16, arrêt du cycle cellulaire, etc.) et, d'autre part, ce qui favorise le cancer (éléments du SASP, inflammation, instabilité du génome). Un traitement par NAC pourrait rompre cet équilibre en réduisant l'expression de p53 et en favorisant l'échappement à la sénescence cellulaire *(Figure 2)*.

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé des fibroblastes embryonnaires de souris, dans lesquels nous avons inhibé la synthèse de JunD au moyen de petits ARN inhibiteurs spécifiques (siRNA). En effet, des résultats préliminaires obtenus en cultivant des cellules vasculaires pulmonaires de souris *JunD*$^{-/-}$ ont montré que celles-ci deviennent rapidement sénescentes *in vitro*, même lorsqu'elles sont traitées par NAC, ce qui empêchait de les utiliser pour cette étude [1]. Nous avons montré que la déplétion de JunD dans les fibroblastes embryonnaires de souris induit un arrêt de croissance et l'entrée en sénescence de ces cellules, et que cet effet est largement inhibé par NAC. Le traitement par NAC (ou d'autres antioxydants tels que la vitamine E) protège donc contre la sénescence cellulaire induite par la suppression de JunD et augmente la prolifération des cellules. Néanmoins, ce modèle expérimental ne nous a pas permis de mettre en évidence une transformation des cellules, ce qui indique que d'autres altérations nécessaires à la transformation sont survenues chez les souris *JunD*$^{-/-}$ âgées traitées par NAC qui développent un cancer du poumon.

En résumé, nous montrons qu'un traitement antioxydant par NAC favorise non seulement la progression, mais également la formation du cancer du poumon, et que cet effet potentiel chez des souris âgées est amplifié en cas de blocage de la synthèse de JunD, un facteur de transcription régulant la synthèse de protéines à activité antioxydante, dont la production est fortement diminuée dans les poumons d'individus atteints d'une bronchopathie chronique [9]. Une question essentielle concerne l'implication possible de ces observations dans le cas d'un stress oxydant chronique, tel que celui induit par la fumée de cigarette. Cette question est d'un grand

intérêt clinique compte tenu de l'utilité discutée d'un traitement par NAC chez des sujets fumeurs, bronchitiques chroniques, ou porteurs d'une BPCO, à risque de développer un cancer pulmonaire. En effet, nous avons montré le rôle majeur joué par la sénescence cellulaire dans la pathogenèse de maladies pulmonaires telles que la BPCO [10]. Les poumons de ces patients sont le siège d'une accumulation de cellules sénescentes, génératrice d'emphysème, de fibrose, et d'inflammation pulmonaire. Bloquer la sénescence cellulaire représente donc une réelle option thérapeutique, qui fait actuellement l'objet d'une intense activité de recherche. L'utilisation des antioxydants est souvent citée comme l'une des approches thérapeutiques possibles. Nos résultats, à l'inverse, suggèrent que le traitement par les antioxydants peut être nocif, et serait donc à proscrire, dans ces maladies. ◊

Antioxidant treatment promotes lung cancer while protecting against lung emphysema

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Matera MG, Calzetta L, Cazzola M. Oxidation pathway and exacerbations in COPD: the role of NAC. *Exp Rev Respir Med* 2016 ; 10 : 89-97.
2. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, *et al.* The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* 2005 ; 11 : 1306-13.
3. The effect of vitamin E and β-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The α-tocopherol, β-carotene cancer prevention study group. *N Engl J Med* 1994 ; 330 : 1029-35.
4. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, *et al.* Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2007 ; 297 : 842-57.
5. Sayin VI, Ibrahim MX, Larsson E, *et al.* Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Sci Transl Med* 2014 ; 6 : 221ra15.
6. Tsuji T, Aoshiba K and Nagai A. Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004 ; 31 : 643-9.
7. Mathon NF, Lloyd AC. Cell senescence and cancer. *Nat Rev Cancer* 2001 ; 1 : 203-13.
8. Weitzman JB, Fiette L, Matsuo K, Yaniv M. JunD protects cells from p53-dependent senescence and apoptosis. *Mol Cell* 2000 ; 6 : 1109-19.
9. Breau M, Houssaini M, Lipskaia L, *et al.* The antioxidant N-acetylcysteine protects from lung emphysema but induces lung adenocarcinoma in mice. *JCI Insight* 2019 ; 4. doi: 10.1172.
10. Adnot S, Amsellem V, Boyer L, *et al.* Telomere dysfunction and cell senescence in chroniclung diseases: therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 2015 ; 153 : 125-34.

NOUVELLE

Coordination de la décapsidation et de l'import nucléaire de VIH-1 par la transportine-1

Juliette Fernandez, Nathalie J. Arhel

Institut de recherche en infectiologie de Montpellier (IRIM), Université de Montpellier, CNRS, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier, France.
nathalie.arhel@irim.cnrs.fr

› Chez les eucaryotes, le noyau est entouré d'une enveloppe nucléaire constituée d'une double couche lipidique qui le sépare du cytoplasme. Les échanges entre le compartiment nucléaire et le cytoplasme se font par l'intermédiaire des pores nucléaires (*nuclear pore complexes*, ou NPC), des structures macromoléculaires complexes enchâssées dans l'enveloppe nucléaire et qui contrôlent le transport nucléo-cytoplasmique [1]. Si la diffusion passive de petites molécules (< 40 kDa) à travers les NPC est possible sans reconnaissance spécifique, le passage de molécules plus grandes requiert la participation de facteurs de transport nucléaire (*nuclear transport factors*, ou NTF) qui font partie de la famille des caryophérines [2]. Parmi celles-ci, on distingue les importines, qui assurent un transport vers le noyau, et les exportines qui permettent la sortie vers le cytoplasme. Leur fonction de transporteur est assurée par leur capacité unique à interagir avec des substrats comportant des signaux d'adressage spécifiques (signal de localisation nucléaire, NLS, ou signal d'export nucléaire, NES), et avec les composants protéiques du NPC appelés nucléoporines. C'est en couplant le transport à une réaction énergétique assurée par un gradient de concentration de la protéine RanGTP entre le cytoplasme et le noyau, que les NTF parviennent à imposer des localisations différentielles à leur substrat. Le transport nucléo-cytoplasmique est essentiel à l'homéostasie de la cellule, et sa dérégulation est impliquée dans différents cancers, dans des maladies auto-immunes, et dans le vieillissement [3].

Parmi la multitude de virus qui menacent l'intégrité des cellules eucaryotes, certains doivent accéder au compartiment nucléaire pour se répliquer. Par exemple, les herpèsvirus, le virus de la grippe, les adénovirus, et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) détournent à leur profit la machinerie cellulaire des NPC pour atteindre le noyau [4, 5]. Les

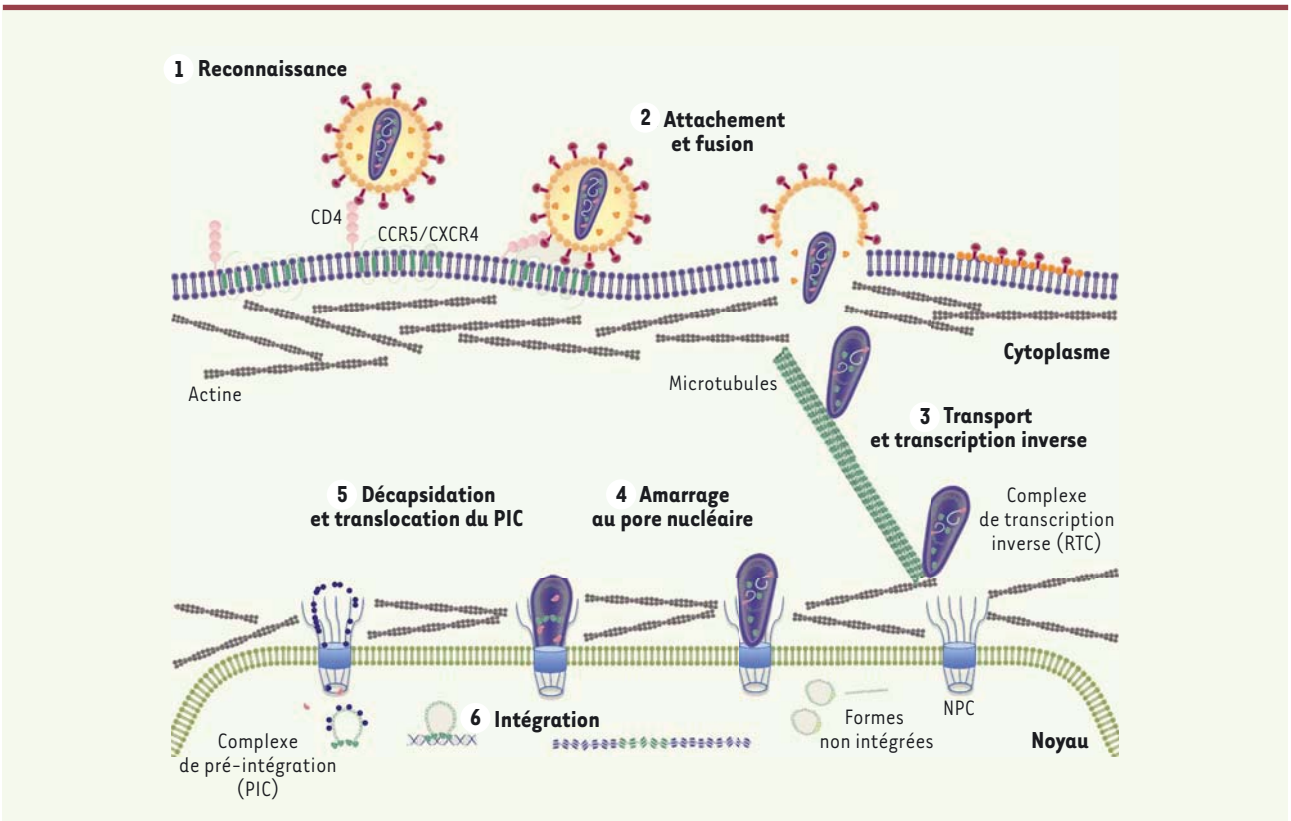


Figure 1. Étapes précoces de l'infection par le VIH-1. Le virus entre dans la cellule par reconnaissance de son récepteur CD4 et de corécepteurs CCR5 ou CXCR4. Une fois la fusion des membranes virale et plasmique effectuée, la cage de capside est relarguée dans le cytoplasme et transportée le long des réseaux d'actine et de tubuline. La transcription inverse, qui convertit l'ARN viral en ADN double brin, débute dès l'entrée dans la cellule et se poursuit après amarrage au pore nucléaire (NPC). Le maintien de la capside durant les étapes précoces de l'infection permet au virus d'interagir avec le cytosquelette et les filaments cytoplasmiques du NPC, tout en dissimulant le génome viral vis-à-vis des récepteurs cytosoliques de l'immunité innée. Le désassemblage de la capside au NPC après synthèse de l'ADN viral est indiqué à titre représentatif d'un consensus actuel entre chercheurs, mais il est à noter que certains travaux favorisent la notion d'un désassemblage progressif durant le transport vers le NPC, ou au contraire d'une décapsidation tardive pendant la translocation par le NPC. Après la translocation dans le noyau, l'ADN viral associé à des protéines virales et cellulaires s'intègre dans l'ADN de la cellule hôte pour permettre la production de nouveaux virions.

mécanismes impliqués sont différents d'un virus à l'autre, ce qui souligne sans doute la plasticité et la redondance fonctionnelle des importines et des nucléoporines dans le transport nucléo-cytoplasmique. Dans le cas du VIH, plus de 600 articles ont déjà été publiés avec les mots clés « VIH » et « import nucléaire » depuis le papier princeps démontrant que l'entrée du VIH dans le noyau se fait par l'intermédiaire des NPC et requiert de l'énergie [6].

Après son entrée dans la cellule, le VIH traverse le cytoplasme rapidement (quelques minutes) pour atteindre l'enveloppe nucléaire, où il se positionne sur un NPC, encore « habillé » de sa capside [7, 8] *(Figure 1)*. Le maintien d'une capside intègre dans le cytoplasme et lorsque le VIH se trouve au NPC permet notamment au virus de dissimuler son génome viral, empêchant ainsi sa reconnaissance par les récepteurs cytosoliques de l'immunité innée [9]. Il semblerait que le VIH soit alors contraint d'attendre plusieurs heures (entre 4 et 8 heures) au niveau du NPC afin de permettre à son génome ARN d'être rétro-transcrit en ADN double-brin (étape indispensable à l'intégration dans la chromatine), et à sa capside de subir les modifications structurales nécessaires à son passage par le NPC. Le complexe de pré-intégration (PIC) du VIH traverse le NPC en interagissant avec de nombreuses molécules de l'enveloppe nucléaire et du NPC [10, 11] *(Figure 2)*. Une fois dans le noyau, le génome viral s'intègre dans le génome de la cellule, et l'infection devient alors irréversible.

Plusieurs importines pourraient participer à l'entrée du VIH par les NPC. Historiquement, de nombreuses études ont montré que des protéines virales comportant des NLS (matrice, protéine virale R, intégrase) pouvaient interagir avec une importine-β, soit par l'intermédiaire d'une importine-α (voie d'importation classique), soit directement (*e.g.*, importine 7, transportine 3/TNPO3) [12]. Toutefois, il

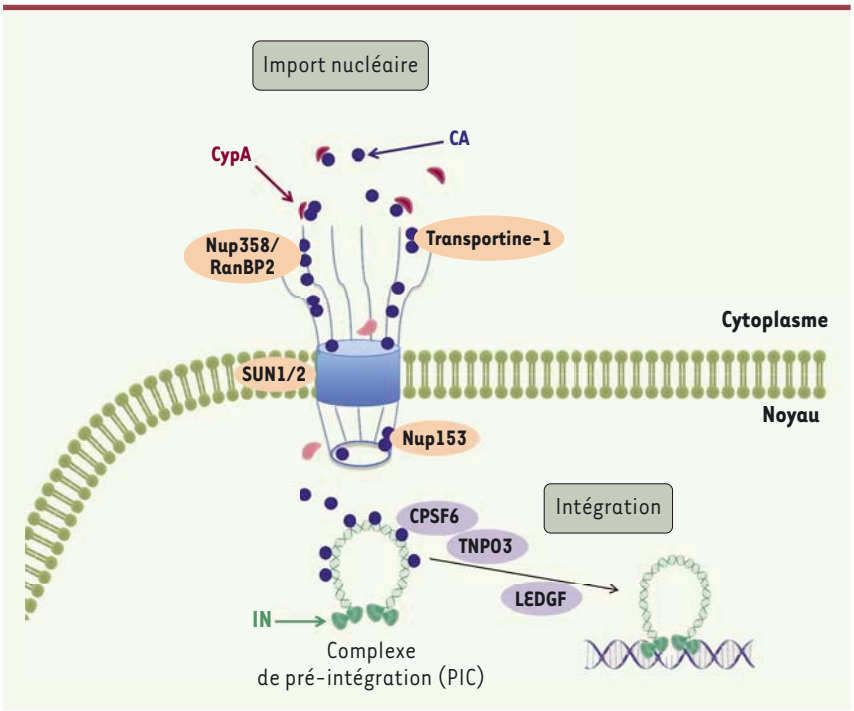


Figure 2. Co-facteurs du NPC, de l'enveloppe nucléaire, et de la famille des caryophérines qui contribuent à l'import nucléaire de VIH-1. Le schéma distingue les facteurs cellulaires participant à l'import nucléaire (en rose) de ceux impliqués dans l'intégration (en violet), même si la plupart ont des effets sur plusieurs étapes précoces de l'infection, notamment sur la stabilité de la capside, l'amarrage des complexes au NPC, l'import nucléaire du PIC, et l'intégration. CA, protéine de capside ; IN, intégrase virale.

n'est pas admis que l'import de ces protéines virales, souvent observé hors du contexte d'une infection virale, soit nécessaire ni même concomitant à l'entrée du génome viral dans le noyau. Par ailleurs, la participation directe d'importines-β dans la translocation du PIC proprement dite reste controversée puisqu'elles peuvent par ailleurs contrôler la localisation de facteurs cellulaires essentiels à l'infection. Récemment, plusieurs études ont montré que le maintien de l'intégrité de la capside virale est essentiel à l'efficacité d'import nucléaire du PIC, et au choix de sites d'intégration dans le génome de la cellule infectée après translocation nucléaire [13, 14] *(Figure 2)*. Nous avons alors fait l'hypothèse que la caryophérine responsable de l'entrée du VIH dans le noyau devait se lier à la fois à la capside et à la machinerie du pore nucléaire, connectant ainsi décapsidation et import nucléaire.

Dans un travail récemment publié dans la revue *Nature Microbiology* [15], nous avons montré que l'import nucléaire de VIH-1 s'effectue grâce à une interaction directe entre la capside du virus et l'importine-β2 (aussi appelée transportine-1, TRN-1 ou TNPO1). Tout d'abord, nous avons observé que la diminution des niveaux de la transportine-1 par ARN interférence induisait une baisse de l'infection par VIH-1 dans plusieurs types cellulaires, y compris dans les principales cellules cibles du virus, les lymphocytes T CD4$^+$. Des ARN interférents dirigés contre d'autres importines-β, telles que la transportine-2, TNPO3 ou l'importine 7, ont un effet moindre voire nul sur l'infection. Par ailleurs, une analyse protéomique des fractions cytosolique et nucléaire n'a pas révélé d'accumulation de cofacteurs importants pour la stabilité de la capside virale, excluant ainsi un effet indirect éventuel.

Nous avons par la suite montré que la transportine-1 interagit avec la capside de VIH-1 dans des cellules infectées, ainsi qu'*in vitro* en l'absence de tout autre intermédiaire protéique, démontrant ainsi une interaction directe. La reconnaissance de la capside se fait par un NLS atypique présent sur une boucle exposée de la protéine de capside (correspondant aux acides aminés en positions 84 à 100), et similaire aux NLS identifiés pour les autres substrats décrits pour la transportine-1. Ce NLS, lorsqu'il est greffé à une protéine fluorescente normalement cytoplasmique, confère à cette protéine une localisation nucléaire. Par ailleurs, nous avons identifié la glycine en position 89 de la protéine de capside comme étant critique pour la reconnaissance par la transportine-1 et la localisation nucléaire. En ce qui concerne le VIH-2, qui est moins pathogène et moins transmissible que VIH-1, cette glycine n'occupe pas la même position sur la capside et le virus semble ne pas dépendre de la transportine-1 pour l'infection. Toutefois, un repositionnement expérimental de la glycine sur la boucle exposée de la protéine de capside de VIH-2 rend l'infection par ce virus dépendante de la transportine-1 [15].

L'interaction de la transportine-1 avec la capside de VIH-1 conduit à des réarrangements structuraux importants, qui peuvent être observés *in vitro* par microscopie à force atomique en présence de transportine-1 recombinante. Dans des cellules infectées, la transportine-1 favorise la décapsidation de VIH-1, et ainsi l'entrée du génome viral dans le noyau. La transportine-1 transporte également la capside dans le noyau, vraisemblablement sous forme désassemblée. Ainsi, la transportine-1 pourrait importer l'ensemble du PIC viral en reconnaissant la protéine de capside, qui emporterait avec elle le génome viral.

Ces travaux ont montré que la perte de la capside virale et l'import nucléaire du génome de VIH-1 sont coordonnés

par un transporteur du pore nucléaire, la transportine-1, et ont ainsi permis de mieux comprendre les étapes qui contrôlent l'entrée du VIH dans le noyau des cellules cibles. Étonnamment, la transportine-1 a aussi été identifiée comme favorisant le désassemblage et l'import nucléaire de l'adénovirus [16] et du virus de la grippe [17], ce qui permet d'envisager le développement de médicaments antiviraux à large spectre qui cibleraient l'entrée de virus dans le noyau. ◊

Transportin-1 orchestrates HIV-1 uncoating and nuclear entry

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié d'une aide du Labex EpiGenMed au titre du programme Investissements d'avenir (référence ANR-10-LABX-12-01), du programme ATIP-Avenir, de l'ANRS (Agence nationale de recherche sur le SIDA), et du Sidaction.

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Raices M, D'Angelo MA. Nuclear pore complex composition: a new regulator of tissue-specific and developmental functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012 ; 13 : 687-99.
2. Chook YM, Suel KE. Nuclear import by karyopherin-betas: recognition and inhibition. *Biochim Biophys Acta* 2011 ; 1813 : 1593-606.
3. Mor A, White MA, Fontoura BM. Nuclear trafficking in health and disease. *Curr Opin Cell Biol* 2014 ; 28 : 28-35.
4. Cohen S, Au S, Pante N. How viruses access the nucleus. *Biochim Biophys Acta* 2011 ; 1813 : 1634-45.
5. Kobiler O, Drayman N, Butin-Israeli V, Oppenheim A. Virus strategies for passing the nuclear envelope barrier. *Nucleus* 2012 ; 3 : 526-39.
6. Bukrinsky MI, Sharova N, Dempsey MP, *et al.* Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 6580-4.
7. Arhel N, Genovesio A, Kim KA, *et al.* Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. *Nat Methods* 2006 ; 3 : 817-24.
8. Arhel NJ, Souquere-Besse S, Munier S, *et al.* HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J* 2007 ; 26 : 3025-37.
9. Hilditch L, Towers GJ. A model for cofactor use during HIV-1 reverse transcription and nuclear entry. *Curr Opin Virol* 2014 ; 4 : 32-6.
10. Matreyek KA, Engelman A. Viral and cellular requirements for the nuclear entry of retroviral preintegration nucleoprotein complexes. *Viruses* 2013 ; 5 : 2483-511.
11. Bhargava A, Lahaye X, Manel N. Let me in: Control of HIV nuclear entry at the nuclear envelope. *Cytokine Growth Factor Rev* 2018 ; 40 : 59-67.
12. Levin A, Loyter A, Bukrinsky M. Strategies to inhibit viral protein nuclear import: HIV-1 as a target. *Biochim Biophys Acta* 2011 ; 1813 : 1646-53.
13. Achuthan V, Perreira JM, Ahn JJ, *et al.* Capsid-CPSF6 interaction: master regulator of nuclear HIV-1 positioning and integration. *J Life Sci* 2019 ; 1 : 39-45.
14. Campbell EM, Hope TJ. HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol* 2015 ; 13 : 471-83.
15. Fernandez J, Machado AK, Lyonnais S, *et al.* Transportin-1 binds to the HIV-1 capsid via a nuclear localization signal and triggers uncoating. *Nat Microbiol* 2019 ; 4 : 1840-50.
16. Hindley CE, Lawrence FJ, Matthews DA. A role for transportin in the nuclear import of adenovirus core proteins and DNA. *Traffic* 2007 ; 8 : 1313-22.
17. Miyake Y, Keusch JJ, Decamps L, *et al.* Influenza virus uses transportin 1 for vRNP debundling during cell entry. *Nat Microbiol* 2019 ; 4 : 578-86.

NOUVELLE

La réponse interféron

Un grand pouvoir implique de grandes responsabilités

Ghizlane Maarifi[1], Nikaïa Smith[2], Sébastien Nisole[1]

[1]Institut de recherche en infectiologie de Montpellier (IRIM), CNRS UMR9004, université de Montpellier, 1919 route de Mende, 34090 Montpellier, France.
[2]Immunobiologie des cellules dendritiques, Inserm U1223, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France.
sebastien.nisole@irim.cnrs.fr

La réponse interféron

Lorsque des cellules sont infectées par un virus, elles produisent des interférons (IFN), de puissantes molécules antivirales qui protègent les cellules avoisinantes de l'infection et permettent ainsi de limiter la propagation du virus dans l'organisme. Il existe trois types d'IFN : I (IFN-α et IFN-β principalement), II (IFN-γ), et III (IFN-λ). Les IFN de type I sont les principaux IFN produits au cours d'une infection virale. Ils induisent, dans les cellules infectées et les cellules avoisinantes, l'expression de centaines de gènes (*interferon-stimulated genes,* ISG), ce qui va permettre l'établissement d'un état antiviral [1].

La réponse IFN de type I débute par la reconnaissance des génomes viraux par des détecteurs cellulaires connus sous le nom de *pattern-recognition receptors* (PRR), parmi lesquels les *toll-like receptors* (TLR), localisés à la surface des cellules ou dans les endosomes, et les *retinoic acid-inducible gene-I-like (RIG-I-like) receptors* (RLR), localisés dans le cytoplasme. Cette reconnaissance déclenche des cascades de signalisation propres à chaque PRR, mais qui aboutissent toutes à la phosphorylation du facteur de transcription IRF3 (*interferon regulatory factor* 3). Après sa translocation dans le noyau cellulaire, IRF3 phosphorylé déclenche la transcription du gène codant l'IFN-β [2] *(Figure 1)*. La synthèse d'IFN-α nécessite, quant à elle, l'expression du facteur de transcription IRF7, qui est induite par l'IFN-β *via* une boucle autocrine ou paracrine. Contrairement à l'IFN-β, codé par un gène unique, les différents sous-types d'IFN-α induits par IRF7 sont codés par 13 gènes. Cette production séquentielle d'IFN (IRF3/IFN-

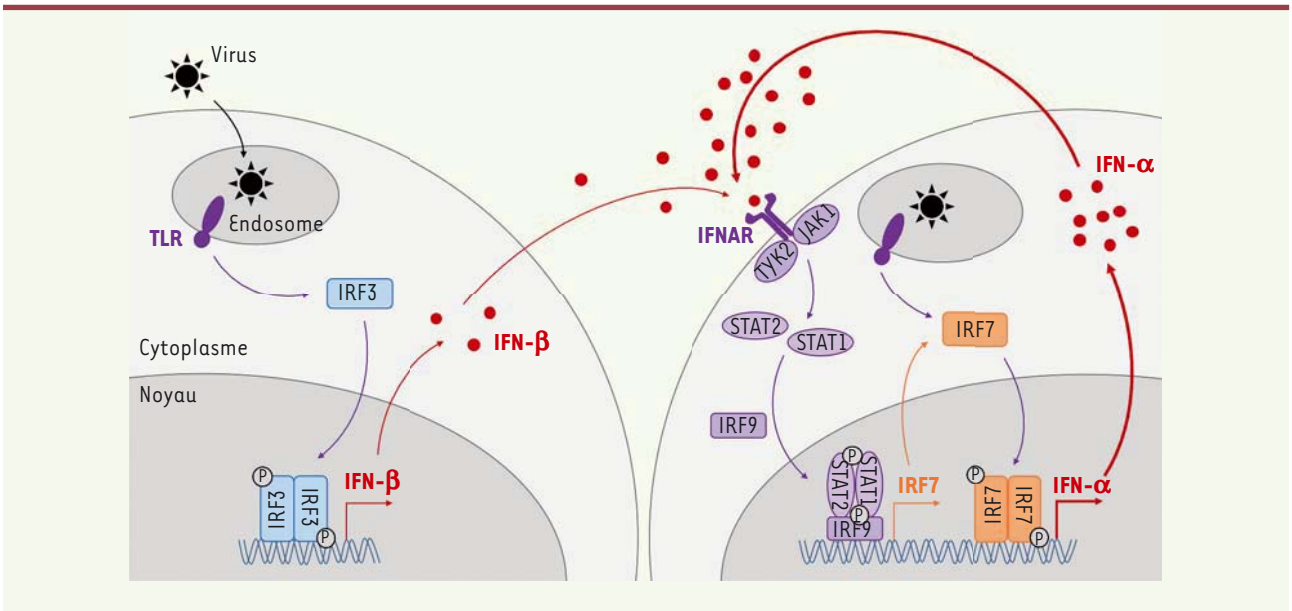


Figure 1. ***Les deux phases de la réponse IFN de type I.*** Suite à la détection d'un virus par un PRR (ici, un TLR endosomal), une cascade de signalisation aboutit à la phosphorylation d'IRF3, qui devient IRF3-P, ce qui déclenche sa dimérisation et sa translocation dans le noyau, où il va activer la transcription du gène codant l'IFN-β. Cette première phase aboutit donc à la production et à la sécrétion d'IFN-β par la cellule infectée. L'IFN-β va alors agir de façon autocrine ou paracrine en se fixant à son récepteur (IFNAR), déclenchant ainsi la voie Jak/Stat. L'activation de cette voie, qui implique les protéines STAT1, STAT2 et IRF9, aboutit à la synthèse de centaines de protéines codées par les *interferon-stimulated genes* (ISG), parmi lesquelles IRF7. IRF7 va à son tour être phosphorylé en IRF7-P suite à l'activation d'un PRR, se dimériser et, après translocation dans le noyau, induire l'expression des gènes codant les IFN-α. Cette deuxième phase, qui aboutit à la sécrétion d'IFN-α, permet l'amplification de la réponse IFN.

β, puis IRF7/IFN-α) permet une amplification de la réponse IFN [2] *(Figure 1)*. Tandis que la plupart des cellules du corps peuvent détecter les virus qui les infectent et produire de faibles quantités d'IFN, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (*plasmacytoid dendritic cells*, pDC) sont spécialisées dans cette fonction. En effet, contrairement aux autres cellules, les pDC expriment IRF7 de façon constitutive, ce qui leur permet de sécréter rapidement de grandes quantités d'IFN, libérées dans le sang et les tissus [3]. Cette capacité unique confère à ces cellules sentinelles un rôle crucial dans la défense contre les virus, mais elle impose également un système de contrôle rigoureux pour éviter à l'organisme les dommages causés par une réponse IFN trop forte ou trop prolongée.

Contrôle de la réponse IFN par les protéines TRIM

Tandis que les voies de signalisation conduisant à la synthèse d'IFN reposent essentiellement sur des cascades de phosphorylation, la régulation de ces voies fait intervenir l'ubiquitination des protéines. Cette modification post-traductionnelle consiste en l'association d'ubiquitine, une petite protéine de 76 acides aminés, à des protéines-cibles, ce qui peut modifier leur stabilité, leur localisation subcellulaire, ou leur activité [4]. La réaction d'ubiquitination fait intervenir trois enzymes (une enzyme activatrice E1, une enzyme de conjugaison E2, et une ubiquitine-ligase E3) qui interviennent séquentiellement pour lier de manière covalente l'ubiquitine à un résidu lysine de la protéine-cible. L'ubiquitine possède elle-même sept résidus lysine, et les enzymes d'ubiquitination des protéines peuvent donc coordonner la formation de chaînes de poly-ubiquitines liées de façon covalente [4].

Parmi les nombreuses ubiquitine-ligases E3 présentes dans les cellules, les protéines TRIM (*tripartite motif*) se sont récemment révélées particulièrement importantes pour la régulation des voies de signalisation conduisant à la synthèse d'IFN. Cette famille de protéines, très conservée au cours de l'évolution, comporte 75 membres chez l'homme. Ces protéines partagent une organisation tripartite, à l'origine de leur nom, constituée d'un domaine RING (*really interesting new gene*), d'un ou deux domaines *B-box*, et d'un domaine *coiled-coil*. La plupart des protéines TRIM possèdent en plus un ou plusieurs domaines C-terminaux de différents types. C'est le domaine RING qui confère à ces protéines leur activité ubiquitine-ligase. Les protéines TRIM ont été l'objet d'un regain d'intérêt à partir de 2004, année de la découverte de l'activité antirétrovirale de TRIM5α, notamment contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [5], même si l'activité antivirale de TRIM22 et TRIM19, découverte auparavant, laissait déjà présager qu'il s'agissait d'une vaste famille de facteurs antiviraux [6]. Les tra-

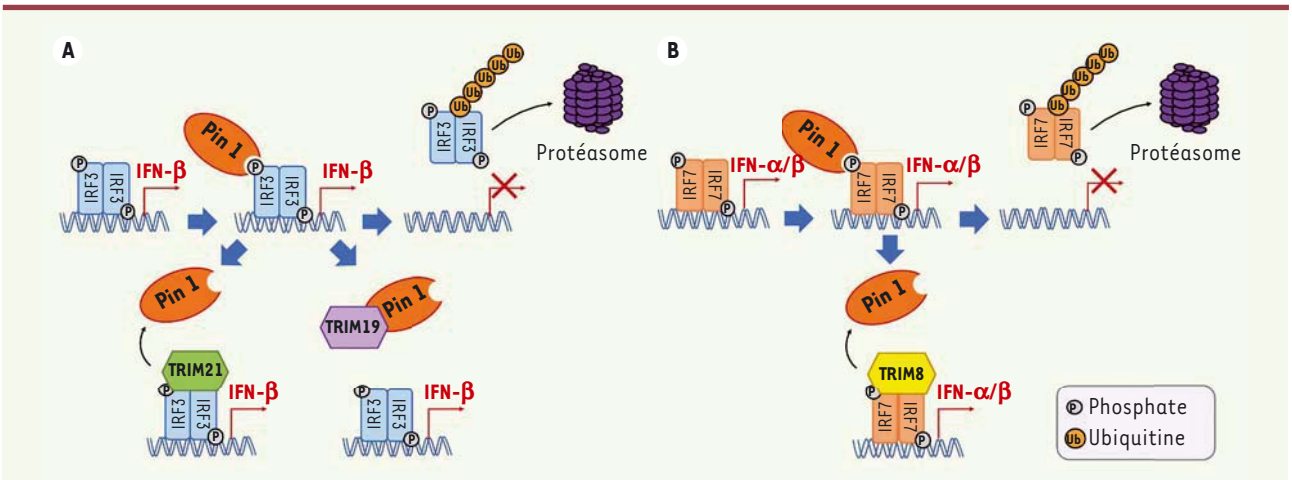


Figure 2. ***Régulation de la réponse IFN par Pin1 et les protéines TRIM. A.*** Pin1 interagit avec IRF3-P et modifie sa conformation, induisant ainsi son ubiquitination et son adressage au protéasome. Les protéines TRIM21 et TRIM19 empêchent la reconnaissance d'IRF3-P par Pin1, prolongeant ainsi la synthèse d'IFN-β. ***B.*** IRF7-P est également un substrat de Pin1. Dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), TRIM8 protège IRF7-P de l'activité enzymatique de Pin1, évitant sa dégradation et empêchant ainsi l'arrêt de la transcription des gènes codant les IFN-α et IFN-β.

vaux ultérieurs ont alors montré que l'implication des protéines TRIM dans la défense contre les infections virales était en réalité plus large, puisque ces protéines peuvent également réguler la réponse IFN. La première protéine TRIM immunomodulatrice identifiée fut TRIM25. Cette protéine est en effet indispensable à l'activité antivirale de RIG-I, un PRR cytoplasmique responsable de la détection des ARN viraux, en induisant son ubiquitination [7]. Suite à cette découverte, de nombreuses autres protéines TRIM ont été identifiées comme d'importants régulateurs des voies de signalisation impliquées dans la défense antivirale innée, généralement *via* leur capacité à ubiquitinyler leur cible [8]. Une étude a notamment montré qu'environ la moitié des 75 protéines TRIM humaines étaient capables d'augmenter la réponse antivirale, notamment IFN, lorsqu'elles étaient surexprimées dans une lignée cellulaire [9].

Partant de ce constat, nous avons entrepris d'étudier le rôle physiologique des protéines TRIM dans les cellules humaines, notamment dans les pDC. Plutôt que de surexprimer les protéines TRIM dans les pDC, nous avons pris le parti de diminuer leur expression par la technique « d'interférence ARN » et d'évaluer les conséquences de cette diminution sur la capacité de ces cellules à produire des IFN en réponse à la détection d'un virus. L'étude a été faite sur des pDC purifiées à partir de sang humain, mises en contact avec le VIH ou le virus de la grippe, deux virus à ARN qui sont détectés par la molécule TLR7 présente de manière constitutive dans les endosomes de ces cellules. Cette étude nous a permis d'identifier TRIM20, 22, 28, et 36 comme étant des inhibiteurs de la réponse IFN dans les pDC, tandis que TRIM8 fut l'unique régulateur positif identifié [10]. TRIM8 s'est d'ailleurs avéré être un acteur essentiel de l'activation des pDC, puisqu'en son absence, la production d'IFN par ces cellules est quasiment inexistante, un résultat inattendu que nous avons alors cherché à expliquer.

Régulation d'IRF7 par TRIM8 et Pin1

Nous avons d'abord montré que TRIM8, dont la localisation est majoritairement nucléaire dans les pDC, protégeait IRF7 de la dégradation après sa phosphorylation et sa translocation dans le noyau. Etant donné que la grande majorité des protéines TRIM contrôle la stabilité ou l'activité des protéines *via* leur ubiquitination, nous avons suspecté l'implication de l'activité ubiquitine-ligase de TRIM8. Cependant, le fait qu'une protéine TRIM8 dépourvue de son domaine RING conserve sa capacité à stabiliser IRF7 phosphorylé (IRF7-P) a rapidement infirmé cette hypothèse. Nous avons alors montré que TRIM8 protège IRF7-P de l'activité de Pin1 (*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, NIMA-interacting 1*), une enzyme qui induit sa dégradation [10]. Pin1 est une peptidyl-prolyl cis-trans isomérase (PPIase), c'est-à-dire une enzyme qui catalyse l'isomérisation cis-trans de la liaison peptidique en amont d'un résidu proline. Cette isomérisation modifie la conformation de la protéine-cible, altérant ainsi sa stabilité, sa localisation sub-cellulaire, ou son activité. La particularité de Pin1 par rapport aux autres PPIases est de reconnaitre spécifiquement les résidus sérine ou thréonine phosphorylés qui sont suivis d'une proline (motifs pSer/Pro et pThr/Pro). Puisque la plupart des voies de signalisation mettent en jeu une cascade de phosphorylation de protéines sur des résidus sérine ou thréonine, Pin1 joue le rôle d'interrupteur moléculaire de ces cascades et est ainsi impliqué dans de très nombreuses fonctions cellulaires [11].

Parmi les très nombreux substrats de Pin1 identifiés figure le facteur de transcription IRF3 [12]. Pin1 reconnait en effet IRF3 phosphorylé (IRF3-P) et catalyse son isomérisation. Le changement de conformation ainsi induit conduit à l'ubiquitination d'IRF3 et à sa dégradation par le protéasome. Pin1 est donc un inhibiteur de la réponse antivirale dépendante d'IRF3 qui permet d'interrompre la synthèse d'IFN-β [12]. Deux protéines TRIM, TRIM21 et TRIM19, augmentent la production d'IFN-β en empêchant la reconnaissance d'IRF3-P par Pin1 [13]. Tandis que TRIM21 empêche l'interaction entre IRF3-P et Pin1, TRIM19 agit en séquestrant Pin1 dans les corps nucléaires PML (*promyelocytic leukemia*), l'empêchant ainsi d'interagir avec sa cible [13, 14] *(Figure 2A)*. Nous avons montré qu'IRF7-P est également un substrat de Pin1, et que la synthèse d'IFN par les pDC est donc fortement réprimée par cette enzyme [10]. Nos travaux lèvent le voile sur le système de contrôle de la production d'IFN par les pDC, dont la régulation fine implique deux protéines antagonistes : TRIM8, qui permet une production efficace d'IFN par ces cellules, et Pin1, qui bloque cette production *(Figure 2B)*. Cette découverte pourrait permettre d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques contre des maladies liées à une surproduction d'IFN, notamment les maladies virales chroniques et les maladies auto-immunes. ◊

Interferon response: with great power comes great responsibility

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol* 2014 ; 32 : 513-45.
2. Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 2006 ; 7 : 131-7.
3. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2015 ; 15 : 471-85.
4. Komander D, Rape M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* 2012 ; 81 : 203-29.
5. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, *et al.* The cytoplasmic body component TRIM5α restricts HIV-1 infection in old world monkeys. *Nature* 2004 ; 427 : 848-53.
6. Nisole S, Stoye JP, Saib A. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* 2005 ; 3 : 799-808.
7. Gack MU, Shin YC, Joo CH, *et al.* TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 2007 ; 446 : 916-20.
8. Rajsbaum R, Garcia-Sastre A, Versteeg GA. TRIMmunity: the roles of the TRIM E3-ubiquitin ligase family in innate antiviral immunity. *J Mol Biol* 2014 ; 426 : 1265-84.
9. Versteeg GA, Rajsbaum R, Sanchez-Aparicio MT, *et al.* The E3-ligase TRIM family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors. *Immunity* 2013 ; 38 : 384-98.
10. Maarifi G, Smith N, Maillet S, *et al.* TRIM8 is required for virus-induced IFN response in human plasmacytoid dendritic cells. *Sci Adv* 2019 ; 5 : eaax3511.
11. Liou YC, Zhou XZ, Lu KP. Prolyl isomerase Pin1 as a molecular switch to determine the fate of phosphoproteins. *Trends Biochem Sci* 2011 ; 36 : 501-14.
12. Saitoh T, Tun-Kyi A, Ryo A, *et al.* Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat Immunol* 2006 ; 7 : 598-605.
13. Yang K, Shi HX, Liu XY, *et al.* TRIM21 is essential to sustain IFN regulatory factor 3 activation during antiviral response. *J Immunol* 2009 ; 182 : 3782-92.
14. El Asmi F, Maroui MA, Dutrieux J, *et al.* Implication of PMLIV in both intrinsic and innate immunity. *PLoS Pathog* 2014 ; 10 : e1003975.

NOUVELLE

Mécanotransduction par les cavéoles

Un rôle inédit de l'ATPase EHD2

Christophe Lamaze[1], Stéphanie Torrino[2]

[1]Institut Curie - Centre de recherche, *PSL research university*, *Membrane dynamics and mechanics of intracellular signaling team*, Inserm U1143, CNRS UMR3666, 75005 Paris, France.
[2]CNRS UMR7275, Institut de pharmacologie cellulaire et moléculaire, université Côte d'Azur, 06560 Valbonne, France.
christophe.lamaze@curie.fr
stephanie.torrino@unice.fr

> Les cellules perçoivent leur microenvironnement grâce à des signaux solubles, des récepteurs, mais aussi des facteurs physiques et mécaniques, tels que la rigidité de la matrice extracellulaire, l'adhérence confinée, ou encore les forces de cisaillement de la lymphe et du sang sur les cellules endothéliales des vaisseaux. Ainsi, la plupart des cellules sont en permanence soumises à des stimulus mécaniques, qui sont traduits en signaux biochimiques par un processus appelé mécanotransduction. La mécanotransduction contrôle de nombreux aspects de la vie cellulaire, notamment la croissance, la forme ou la différenciation des cellules [1]. Des réponses cellulaires anormales aux contraintes mécaniques externes et internes sont associées à certaines maladies (*e.g.*, maladies cardiaques, myopathies, cancer) [2]. Si les dix dernières années ont vu s'accroître considérablement le nombre d'études sur les forces mécaniques en biologie, les mécanismes qui permettent d'intégrer la détection de ces forces (mécanoréception) à la mécanotransduction restent mal compris.

Les cavéoles sont des petites (60-80 nm) invaginations caractéristiques de la

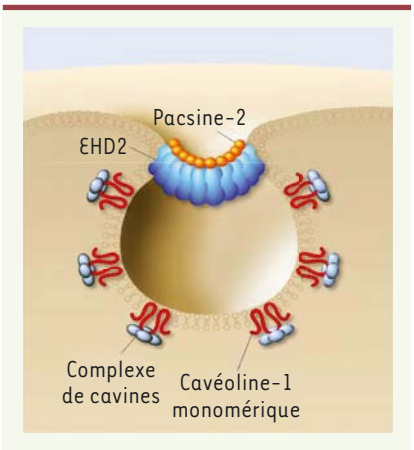


Figure 1. La cavéole. Les oligomères de cavéoline-1, en s'associant à la membrane plasmique, la déforment en une petite invagination cavéolaire de 60-80 nm. Le complexe cytosolique de cavines interagit avec la cavéoline-1 membranaire pour stabiliser la forme définitive des cavéoles. Au niveau du cou de la structure, EHD2 et pacsine-2 participent également à la morphogenèse de la cavéole.

membrane plasmique en forme de bulbe, qui ont été découvertes en microscopie électronique il y a plus de soixante ans par Georges Palade [3] *(Figure 1)*. Elles sont produites par l'association d'oligomères d'une protéine transmembranaire, la cavéoline-1 (Cav1, leur principal composant structural), et sont stabilisées par l'assemblage de trois cavines cytoplasmiques (cavine-1, -2 et -3) formant un manteau polyédrique autour de leur bulbe [4, 5]. Les protéines pacsin2 (*protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 2*)/syndapine-II et EHD2 (*Eps-15 homology domain-containing protein 2*) sont également associées aux cavéoles. Pacsin2, qui contient un domaine BAR (*Bin, Amphiphysin, Rvs*) permettant la liaison aux courbures membranaires, est colocalisée partiellement avec les cavéoles et participe à leur morphogenèse. Quant à EHD2, une ATPase capable de se lier à la membrane plasmique et d'induire la tubulation et la scission membranaires, elle est localisée au niveau du cou de l'invagination cavéolaire et assure la stabilité des cavéoles dans la membrane plasmique *(Figure 1)*.

En 2011, nous avons découvert une fonction nouvelle des cavéoles dans la mécanoréception et la mécanoprotection des cellules. Sous l'effet d'une augmentation de la tension de la membrane plasmique produite par le gonflement ou l'étirement mécanique des cellules, les cavéoles s'aplatissent immédiatement pour fournir une surface membranaire supplémentaire et empêcher ainsi la rupture [6]. Plusieurs processus induits par le désassemblage mécanique des cavéoles restent cependant à comprendre. Nous avons cherché 1) à déterminer si le désassemblage mécanique des cavéoles est associé à une fonction de mécanotransduction, 2) à identifier les protéines impliquées dans cette mécanotransduction, et 3) à définir la fonction des protéines identifiées dans la mécanoréception par les cavéoles. Deux protéines cavéolaires, cavine-1 et EHD2, contiennent un motif de localisation nucléaire (*nuclear localization signal*, NLS), ce qui leur confère la possibilité de réaliser la navette entre le noyau cellulaire et le cytoplasme [7, 8]. De plus, l'impact du stress mécanique sur la translocation nucléaire de ces protéines, et son rôle potentiel dans la mécanotransduction par les cavéoles, ont été étudiés.

Par différentes techniques d'imagerie et de biochimie, nous avons d'abord confirmé qu'en l'absence de stress mécanique, EHD2 et cavine-1 sont localisées à la membrane plasmique. En revanche, en présence d'un stress mécanique (choc osmotique, étirement cellulaire), une relocalisation d'EHD2 dans le noyau est observée, alors que la localisation de la cavine-1 n'est pas modifiée. Nous avons également analysé la dynamique de la translocation nucléaire d'EHD2 dans des cellules vivantes en 3D en utilisant la microscopie « à feuilles de lumière en réseau ». Il est alors apparu qu'au cours du désassemblage mécanique des cavéoles, la quantité d'EHD2 nucléaire augmente rapidement, et qu'inversement, la suppression du stress mécanique s'accompagne d'une diminution de la quantité d'EHD2 dans le noyau ; le réservoir de cavéoles à la membrane plasmique est alors rapidement reconstitué. Ces observations indiquaient que désassemblage et réassemblage des cavéoles de la membrane plasmique sont étroitement associés à la translocation nucléaire d'EHD2 [9].

Nous avons alors recherché si des modifications post-traductionnelles de EHD2 étaient associées à sa libération mécanique des cavéoles. En effet, EHD2 peut être sumoylée par SUMO-1 (modification semblable à l'ubiquitination) [8], la sumoylation des protéines étant associée à leur transport nucléo-cytoplasmique et à la réponse des cellules à différents stress, y compris à un stress osmotique chez les plantes [10]. L'interaction entre EHD2 et SUMO a été explorée par la technique PLA (*proximity ligation assay*), qui permet de détecter par immunofluorescence les interactions protéine-protéine, ainsi que par des expériences de sumoylation de EHD2. Nous avons alors montré qu'un stress mécanique induit la sumoylation de EHD2 et, grâce à l'utilisation de mutants de sumoylation, que cette sumoylation est essentielle pour sa translocation dans le noyau [9].

Pour déterminer le rôle de la translocation nucléaire de EHD2, les transcriptomes de cellules privées d'EHD2 (en utilisant un petit ARN inhibiteur spécifique) et de cellules témoins ont été ensuite analysés, en présence ou en l'absence d'un stress mécanique. Nous avons ainsi montré que l'enrichissement de plusieurs ensembles de transcrits codant des protéines impliquées dans différentes voies de signalisation, en présence d'un stress mécanique, était conditionné par la présence d'EHD2.

Nous avons également mesuré les quantités d'ARNm codant des protéines cavéolaires en présence et en l'absence d'une contrainte mécanique appliquée aux cellules, et montré que le stress mécanique provoque une diminution

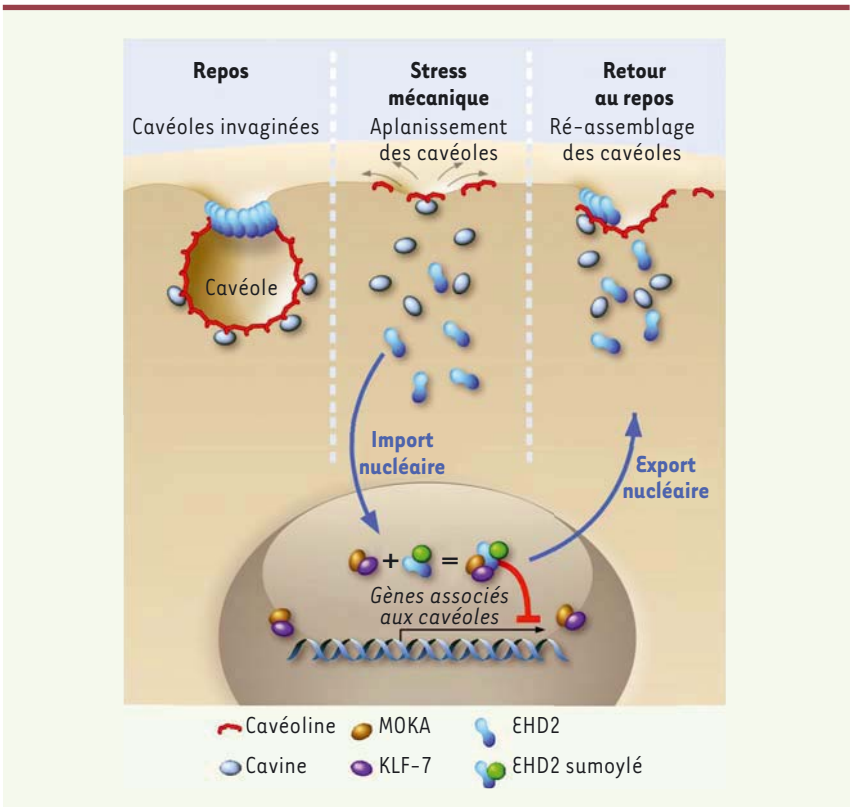


Figure 2. EHD2 est un acteur central de la mécanotransduction par les cavéoles. Sous l'effet d'une contrainte mécanique, les cavéoles s'aplanissent afin d'assurer l'homéostasie de la tension membranaire de la cellule. Cela entraîne la libération de la cavéoline, des cavines, et d'EHD2. EHD2 est alors SUMOylée et transférée au noyau, où il contrôle la transcription de gènes par interaction avec le complexe transcriptionnel MOKA et KLF-7. Lors du relâchement des contraintes, EHD2 quitte le noyau et retourne à la membrane plasmique pour stabiliser de nouveau le réservoir de cavéoles.

significative du nombre de ces ARNm. Cette répression adaptative de la transcription dépend de la présence d'EHD2 et de l'activité de ses deux partenaires KLF7 (facteur 7 de type Krüppel) et MOKA (modulateur de l'activité de KLF7) [8, 9].

La microscopie de fluorescence « par réflexion totale interne » (ou microscopie à onde évanescente) nous a ensuite permis d'analyser le rôle d'EHD2 dans la dynamique des cavéoles, et nous avons constaté que si la perte d'EHD2 ne perturbe pas le désassemblage des cavéoles provoqué par un stress mécanique, elle entraîne cependant un défaut du réassemblage des cavéoles lors du retour aux conditions basales. En mesurant la tension membranaire par la technique de « traction par attache », nous avons montré que la présence d'EHD2 est nécessaire au maintien, dans la membrane plasmique, d'un réservoir fonctionnel de cavéoles qui amortit les variations de tension membranaire lors de contraintes mécaniques [9].

Un faible niveau d'expression d'EHD2 a été rapporté dans plusieurs tumeurs cancéreuses solides [11, 12]. L'étape suivante était donc de déterminer si cette faible expression d'EHD2 était également associée à des défauts de stabilisation des cavéoles et de translocation nucléaire de cette protéine. Nous avons analysé la dynamique des cavéoles dans deux lignées cellulaires de cancer du sein, Hs578T et MDA-MB-436, sélectionnées pour leur forte et très faible production d'EHD2, respectivement. En exerçant une contrainte mécanique sur la membrane plasmique de ces cellules, nous avons observé une diminution rapide du nombre de cavéoles à la surface des cellules Hs578T (forte expression d'EHD2), mais pas des cellules MDA-MB-436 (faible expression de EHD2). Nous avons également montré que ce défaut de mécanoréception par les cavéoles dans les cellules MDA-MB-436 était associé à des défauts de régulation transcriptionnelle de gènes codant des protéines constituantes des cavéoles. L'analyse de ces lignées cellulaires par microscopie électronique « à réplique de métal » a montré une multitude de cavéoles invaginées, en accord avec l'expression forte de Cav1 et EHD2, dans les cellules Hs578T, tandis que les cellules MDA-MB-436, quasi dépourvues d'EHD2, possédaient très peu de cavéoles, voire aucune. L'expression forcée d'EHD2 dans ces cellules est d'ailleurs suffisante pour reconstituer un réservoir de cavéoles dans la membrane plasmique. Nos résultats indiquent que l'absence de cavéoles dans les cellules cancéreuses dépourvues d'EHD2 pourrait être une conséquence de l'impossibilité de stabiliser leur réservoir de cavéoles dans un environnement mécanique changeant au sein de la masse tumorale [9].

En conclusion, nos résultats montrent, pour la première fois, l'existence d'une mécanotransduction dépendante des cavéoles, et définissent EHD2 comme un acteur central de ce processus en reliant le désassemblage du réservoir de cavéoles à la régulation de la transcription des gènes en présence d'une contrainte mécanique exercée sur la membrane plasmique *(Figure 2)* [9]. ◊

Caveolae mechanotranduction: a new role for the EHD2 ATPase

REMERCIEMENTS

Nous remercions tous les co-auteurs de la publication originale [9], ainsi que Franck Aguila pour les figures.

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Iskratsch T, Wolfenson H, Sheetz MP. Appreciating force and shape: the rise of mechanotransduction in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014 ; 15 : 825-33.
2. DuFort CC, Paszek MJ, Weaver VM. Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011 ; 12 : 308-19.
3. Palade GE. Fine structure of blood capillaries. *J Appl Phys* 1953 ; 24 : 1424.
4. Stoeber M, Stoeck IK, Hänni C, *et al.* Oligomers of the ATPase EHD2 confine caveolae to the plasma membrane through association with actin. *EMBO J* 2012 ; 31 : 2350-64.
5. Ludwig A, Howard G, Mendoza-Topaz C, *et al.* Molecular composition and ultrastructure of the caveolar coat complex. *PLoS Biol* 2013 ; 11 : e1001640.
6. Sinha B, Köster D, Ruez R, *et al.* Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell* 2011 ; 144 : 402-13.
7. Nassar ZD, Parat MO. Cavin family: new players in the biology of caveolae. *Int Rev Cell Mol Biol* 2015 ; 320 : 235-305.
8. Pekar O, Benjamin S, Weidberg H, *et al.* EHD2 shuttles to the nucleus and represses transcription. *Biochem J* 2012 ; 444 : 383-94.
9. Torrino S, Shen WW, Blouin CM, *et al.* EHD2 is a mechanotransducer connecting caveolae dynamics with gene transcription. *J Cell Biol* 2018 ; 217 : 4092-105.
10. Geiss-Friedlander R, Melchior F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 ; 8 : 947-56.
11. Li M, Yang X, Zhang J, *et al.* Effects of EHD2 interference on migration of esophageal squamous cell carcinoma. *Med Oncol* 2013 ; 30 : 396.
12. Yang X, Ren H, Yao L, *et al.* Role of EHD2 in migration and invasion of human breast cancer cells. *Tumour Biol* 2015 ; 36 : 3717-26.

NOUVELLE

Cocaïne en « *dents de scie* »

Modéliser une consommation pathologique de drogue chez le rat

Florence Allain, Anne-Noël Samaha

Département de pharmacologie et de physiologie, Groupe de recherche sur le système nerveux central, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada.
florence.allain@umontreal.ca
anna.samaha@umontreal.ca

› Consommer une drogue ne signifie pas nécessairement être toxicomane et même avec un usage répété, la consommation de drogue peut rester récréative et contrôlée. À l'inverse, quand un individu perd le contrôle de sa consommation, cette dernière est qualifiée de pathologique, et un trouble d'utilisation de substance peut alors être diagnostiqué (nous parlerons de *toxicomanie* ou d'*addiction*). Dissocier une consommation récréative de drogue d'une consommation pathologique est primordial pour comprendre comment la toxicomanie se développe, et ainsi mieux la traiter. Pour faire cette dissociation, les signes symptomatiques d'une consommation compulsive et pathologique de drogue sont répertoriés dans le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-5) de l'Association américaine psychiatrique [1]. Ces signes incluent une motivation excessive à obtenir et consommer la drogue, consommer en dépit des conséquences négatives, une vulnérabilité à la rechute après abstinence, et autres. Pour modéliser la toxicomanie en laboratoire, ces mêmes signes sont recherchés chez des animaux à qui l'on permet de consommer volontairement de la drogue [2].

En dépit de plusieurs années de recherche, l'addiction à la cocaïne est, encore aujourd'hui, un trouble pour lequel il n'existe aucun traitement pharmacologique approuvé. Ceci peut être dû au fait que les modèles animaux sur lesquels les cibles thérapeutiques sont identifiées et les traitements testés ne représentent pas toujours une consommation pathologique de cocaïne cliniquement pertinente. Afin d'augmenter la valeur translationnelle des modèles animaux à la condition clinique, il est important d'observer chez eux les comportements symptomatiques d'une consommation pathologique de cocaïne telle que mesurée chez l'être humain. Dans cette Nouvelle, nous décrivons certains modèles animaux utilisés pour étudier l'addiction à la cocaïne, et tout spécifiquement des modèles qui s'inspirent des schémas de consommation de cette drogue qui sont observées chez l'être humain.

Consommation pathologique de cocaïne chez l'être humain

Plusieurs facteurs peuvent accélérer ou retarder le développement d'une addiction à la cocaïne. Les facteurs les plus étudiés incluent des variables individuelles (génétique, biologie) et environnementales. Cependant, au-delà de ces facteurs, la voie d'administration de cette drogue peut aussi être décisive. La cocaïne peut en effet être consommée de diverses façons. Elle peut être mâchée, insufflée, fumée ou encore injectée. Selon la voie d'administration privilégiée par les consommateurs, la pharmacocinétique de la drogue varie. Elle réfère aux taux de cocaïne qui circulent dans le sang et dans les organes cibles (dont le cerveau) en fonction du

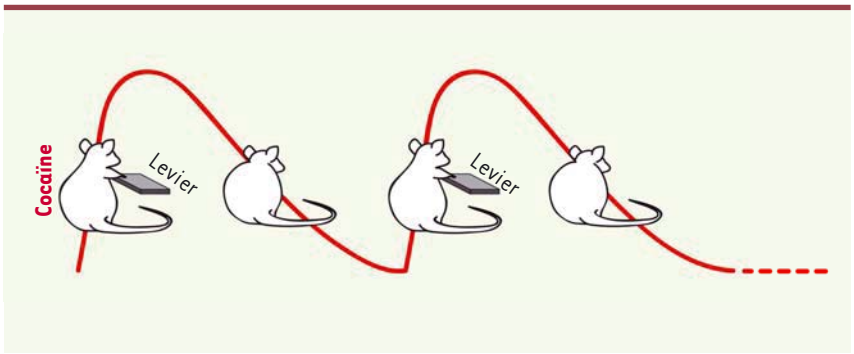


Figure 1. ***Pour modéliser des pics de cocaïne au cerveau pendant une session d'auto-administration de drogue chez le rat, l'accès au levier est intermittent.*** La session peut durer 5 à 6 heures par jour. Pendant de courtes périodes de 5-6 minutes, le levier est présent, et les rats peuvent appuyer dessus autant de fois qu'ils le souhaitent pour s'auto-administrer de la drogue. Les niveaux de cocaïne dans le cerveau augmentent, ce qui correspond à la phase ascendante du pic de drogue (courbe rouge). Le levier est ensuite rétracté pendant une plus longue période de 25-26 minutes – temps suffisant pour permettre la diminution des niveaux de drogue dans le cerveau [10]. Il s'agit alors de la phase descendante du pic de cocaïne dans le cerveau. Cette succession, présence/absence du levier est répétée plusieurs fois pendant une session d'auto-administration de cocaïne pour promouvoir plusieurs pics de cocaïne dans le cerveau.

temps. Par exemple, selon la voie utilisée, le temps d'arrivée de la drogue au cerveau varie. L'inhalation et l'injection par voie intraveineuse sont les deux voies de consommation les plus rapides : elles transmettent la cocaïne au cerveau en quelques secondes. L'effet de la cocaïne est donc très rapide, intense et bref avec ces méthodes d'administration. La consommation de cocaïne par ces voies dites *rapides* est associée à un plus grand risque d'addiction, en comparaison avec l'utilisation des voies orale ou intranasale, dites plus *lentes* [3]. Avec le développement de la toxicomanie, il a été remarqué que les consommateurs passaient d'une voie plus lente d'administration de la cocaïne à une voie plus rapide [3]. Au-delà de la vitesse d'arrivée au cerveau, la voie et le schéma de consommation déterminent aussi la fréquence à laquelle les concentrations de drogue fluctuent dans l'organisme. Ainsi, avec les années d'expérience de consommation, il semblerait qu'un schéma typique de consommation se dessine, avec des périodes de consommations intenses espacées de pauses [4]. Cette consommation intermittente de cocaïne favoriserait la formation de pics rapides de drogue au cerveau, en « *dents de scie* », caractéristiques d'une consommation expérimentée et pathologique de drogue [4]. Or, jusqu'à tout récemment, les modèles animaux de consommation de cocaïne ne reflétaient pas cette intermittence, favorisant plutôt une consommation continue qui produit des taux élevés et soutenus de la drogue dans le cerveau. Nous verrons que chez le rat, ces différents profils cinétiques (intermittent *versus* continu) déterminent le risque de développer des comportements de consommation caractéristiques de la toxicomanie.

De l'humain au rat et *vice versa*

Consommer une drogue est un acte volontaire. Cela peut se modéliser, chez le rat, par l'auto-administration de drogue par voie intraveineuse [5]. Dans ce type d'expériences, des rats sont implantés avec un cathéter dans la veine jugulaire [6] et, après récupération de la chirurgie, ils sont placés dans des cages opérantes où leur cathéter est relié à une seringue remplie de drogue. Lorsque le rat émet une réponse opérante (comme appuyer sur un levier), il peut recevoir une injection de drogue par voie intraveineuse. Dans ce contexte, les rats mais aussi d'autres animaux de laboratoire consomment volontairement presque toutes les drogues consommées par l'être humain, dont la cocaïne.

Pour modéliser les voies *rapides* et plus *lentes* d'administration de cocaïne, il est possible d'ajuster la vitesse d'injection de drogue par voie intraveineuse durant la session d'auto-administration. Pour modéliser les voies rapides (intraveineuse et fumée), les rats s'auto-administrent des injections infusées en seulement 5 secondes (rats 5s). Pour les voies plus lentes (orale et intranasale), les rats s'auto-administrent des injections infusées en 90 secondes ou plus (rats 90s). La dose de cocaïne pour une injection infusée aux deux vitesses est la même, seule la durée de l'injection est modifiée.

Pour modéliser la consommation *intermittente* de cocaïne en « *dents de scie* » qui est observée chez les cocaïnomanes les plus expérimentés [4], le levier est rétractable. Il est présenté aux rats pendant de courtes périodes (5 à 6 minutes) séparées par des pauses plus longues (25 à 26 minutes). Grâce à cette stratégie, les rats consomment la drogue par intermittence, ce qui mène à la formation de pics de drogue dans le cerveau *(Figure 1)* [7-11]. La manipulation de ces deux variables pharmacocinétiques de la cocaïne (vitesse d'administration de la cocaïne et fréquence d'administration - pics de drogue dans le cerveau) est critique pour modéliser chez le rat une consommation pathologique de drogue cliniquement pertinente [12], dans le but d'augmenter la valeur translationnelle des modèles animaux à la condition clinique.

Des pics rapides de cocaïne dans le cerveau chez le rat augmentent le potentiel addictif de la drogue

Selon un schéma d'auto-administration intermittente de cocaïne, bien que les

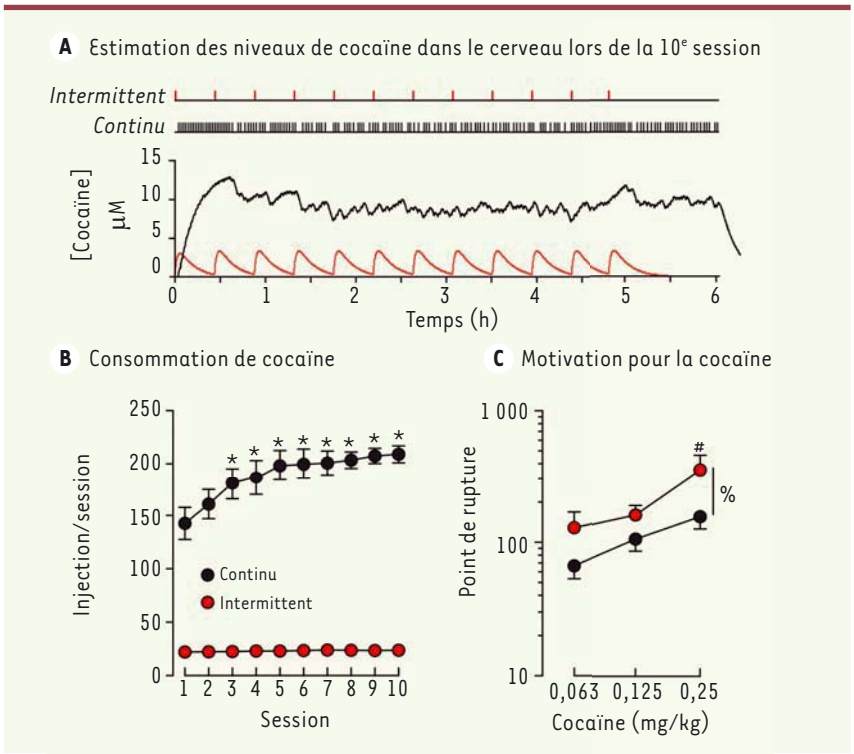


Figure 2. ***Les rats avec un accès intermittent (versus continu) à la cocaïne durant chaque session d'auto-administration prennent moins de drogue, mais montrent plus de motivation à consommer. A.*** Estimation des niveaux de cocaïne dans le cerveau à l'aide d'un modèle mathématique à deux compartiments [10, 19]. Quand l'accès à la cocaïne est continu pendant une session de 6 heures, les niveaux de cocaïne dans le cerveau augmentent au début de la session pour rester élevés jusqu'à la fin (courbe noire). Par opposition, quand l'accès à la cocaïne est intermittent, les niveaux de cocaïne dans le cerveau fluctuent pendant la session (courbe rouge). ***B.*** À travers 10 sessions de 6 heures, les rats « continus » consomment beaucoup plus de drogue que les rats « intermittents ». Les rats « continus » augmentent leur consommation au fur et à mesure des sessions alors que les rats « intermittents » conservent une consommation stable dans le temps (dans cette étude, le nombre d'injections de cocaïne disponible par session était limité par l'expérimentatrice chez les rats « intermittents »). $^{*}p < 0.05$, *versus* session 1. ***C.*** À la suite des 10 sessions d'accès intermittent ou continu à la cocaïne, la motivation des animaux pour obtenir la cocaïne a été testée sous ratio progressif. Sous un tel ratio, le nombre d'appuis sur le levier pour obtenir l'injection suivante de cocaïne augmente exponentiellement [20]. Quand l'effort requis pour obtenir une injection de cocaïne devient trop exigeant pour les animaux, ils cessent alors d'appuyer sur le levier et n'atteignent pas le ratio suivant. Le dernier ratio atteint avant abandon de la tâche est appelé point de rupture et est un indice de la motivation des animaux pour la drogue. Bien que les rats « intermittents » aient consommé 8 fois moins de cocaïne que les rats « continus », ils sont devenus plus motivés pour obtenir la drogue – un symptôme de la toxicomanie. $^{\%}p < 0.05$, interaction positive Groupe x Dose de cocaïne. $^{\#}p < 0.05$, « intermittents » *versus* « continus ». Ces données sont adaptées de [7].

rats 5s et 90s consomment la même quantité de drogue dans le temps, les rats 5s développent une motivation excessive pour la drogue et sont également plus vulnérables à la rechute après abstinence, comparativement aux rats 90s [8, 13]. Ces résultats montrent que des pics rapides de drogue dans le cerveau sont très à risque pour le développement de la toxicomanie. L'idée de forcer une consommation intermittente de cocaïne chez le rat reste nouvelle et est fondée sur l'observation que chez les usagers de cocaïne, la consommation est intermittente [4, 11]. Cependant, depuis maintenant plus de deux décennies, le modèle qui prédomine dans la littérature est un modèle qui permet un accès continu à la drogue pendant plusieurs heures (6 heures ou plus) par jour [14]. Lors d'un accès continu à la cocaïne, les niveaux de drogue dans le cerveau restent élevés pendant toute la session d'auto-administration de drogue [7, 11], ce qui ne reflète vraisemblablement pas la réalité clinique [4]. Par ailleurs, des rats avec un accès continu à la cocaïne consomment beaucoup plus de drogue que des rats qui ont un accès intermittent à la drogue (jusqu'à 8 fois plus), mais les comportements symptomatiques d'un trouble d'usage de la cocaïne sont d'autant plus présents chez les rats intermittents [2, 7, 11, 15-18] *(Figure 2)*. Cela suggère qu'une consommation intermittente de cocaïne est particulièrement efficace pour induire des signes comportementaux pertinents pour l'addiction. Quand l'accès à la cocaïne est continu, les rats doivent consommer la drogue plusieurs heures par jour (6 heures ou plus) pour démontrer les signes caractéristiques de toxicomanie décrits plus haut, alors que si l'accès à la drogue est intermittent, 2 heures par jour suffisent [9, 14]. Il semble même que seuls trois jours d'exposition à un protocole d'auto-administration intermittente de cocaïne suffisent à instaurer des changements neurobiologiques pertinents pour la toxicomanie [21].

Ces données sont novatrices puisqu'elles remettent en cause l'idée que consommer beaucoup de cocaïne est nécessaire au développement de la toxicomanie. En effet, ceci n'est pas toujours le cas et le schéma de consommation de drogue (formation de pics rapides de drogue dans le cerveau, en « *dents de scie* ») peut s'avérer plus critique que la quantité consommée dans la transition vers la toxicomanie.

Ainsi, contrer ces pics de cocaïne dans le cerveau pourrait être une stratégie intéressante tant pour prévenir le développement de la toxicomanie (en utilisant par exemple une voie d'administration de la drogue plus lente) que pour la traiter (en évaluant par exemple l'efficacité de traitements de substitution pour l'addiction à la cocaïne) [22, 23].

Conclusion

Générer une consommation pathologique de drogue cliniquement pertinente chez le rat (en les exposant, par exemple, à des pics de cocaïne au cerveau) est la première étape en recherche fondamentale sur la toxicomanie. La deuxième étape sera d'inverser ces comportements symptomatiques d'une consommation pathologique de drogue dans ces modèles animaux. La toxicomanie est un trouble complexe et uniquement humain. Cependant, certains comportements de consommation représentatifs de ce trouble peuvent être mesurés chez l'animal de laboratoire. Les modèles animaux fondés sur des caractéristiques de consommation fidèles à ce qui est observé chez l'être humain pourraient accélérer la découverte de traitements pharmacologiques pour le trouble d'utilisation de la cocaïne. ◊

Cocaine peaks and troughs. Modeling pathological drug use in rats

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. APA. DSM-V. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. Washington : American Psychiatric Association 2013.
2. Kawa AB, Allain F, Robinson TE, Samaha AN. The transition to cocaine addiction: the importance of pharmacokinetics for preclinical models. *Psychopharmacology (Berl)* 2019 ; 236.
3. Hatsukami DK, Fischman MW. Crack cocaine and cocaine hydrochloride. Are the differences myth or reality? *JAMA* 1996 ; 276 : 1580-8.
4. Beveridge TJR, Wray P, Brewer A, *et al. Analyzing human cocaine use patterns to inform animal addiction model development*. Palm Springs, CA : College on Problems of Drug Dependence Annual Meeting, 2012 (abstracts).
5. Weeks JR. Experimental morphine addiction: method for automatic intravenous injections in unrestrained rats. *Science* 1962 ; 138 : 143-4.
6. Samaha AN, Minogianis EA, Nachar W. Cues paired with either rapid or slower self-administered cocaine injections acquire similar conditioned rewarding properties. *PLoS One* 2011 ; 6 : e26481.
7. Allain F, Bouayad-Gervais K, Samaha AN. High and escalating levels of cocaine intake are dissociable from subsequent incentive motivation for the drug in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2018 ; 235 : 317-28.
8. Allain F, Roberts DC, Levesque D, Samaha AN. Intermittent intake of rapid cocaine injections promotes robust psychomotor sensitization, increased incentive motivation for the drug and mGlu2/3 receptor dysregulation. *Neuropharmacology* 2017 ; 117 : 227-37.
9. Allain F, Samaha AN. Revisiting long-access versus short-access cocaine self-administration in rats: intermittent intake promotes addiction symptoms independent of session length. *Addict Biol* 2018 ; 24 : 641-51.
10. Zimmer BA, Dobrin CV, Roberts DC. Brain-cocaine concentrations determine the dose self-administered by rats on a novel behaviorally dependent dosing schedule. *Neuropsychopharmacology* 2011 ; 36 : 2741-9.
11. Zimmer BA, Oleson EB, Roberts DC. The motivation to self-administer is increased after a history of spiking brain levels of cocaine. *Neuropsychopharmacology* 2012 ; 37 : 1901-10.
12. Allain F, Minogianis EA, Roberts DC, Samaha AN. How fast and how often: The pharmacokinetics of drug use are decisive in addiction. *Neurosci Biobehav Rev* 2015 ; 56 : 166-79.
13. Gueye AB, Allain F, Samaha AN. Intermittent intake of rapid cocaine injections promotes the risk of relapse and increases mesocorticolimbic BDNF levels during abstinence. *Neuropsychopharmacology* 2019 ; 44 : 1027-35.
14. Ahmed SH, Koob GF. Transition from moderate to excessive drug intake: change in hedonic set point. *Science* 1998 ; 282 : 298-300.
15. James MH, Stopper CM, Zimmer BA, *et al.* Increased number and activity of a lateral subpopulation of hypothalamic orexin/hypocretin neurons underlies the expression of an addicted state in rats. *Biol Psychiatry* 2019 ; 85 : 925-35.
16. Kawa AB, Bentzley BS, Robinson TE. Less is more: prolonged intermittent access cocaine self-administration produces incentive-sensitization and addiction-like behavior. *Psychopharmacology (Berl)* 2016 ; 233 : 3587-602.
17. Kawa AB, Valenta AC, Kennedy RT, Robinson TE. Incentive and dopamine sensitization produced by intermittent but not long access cocaine self-administration. *Eur J Neurosci* 2019 ; 50 : 2663-82.
18. Kawa AB, Robinson TE. Sex differences in incentive-sensitization produced by intermittent access cocaine self-administration. *Psychopharmacology (Berl)* 2019 ; 236 : 625-39.
19. Pan HT, Menacherry S, Justice JB, Jr. Differences in the pharmacokinetics of cocaine in naive and cocaine-experienced rats. *J Neurochem* 1991 ; 56 : 1299-306.
20. Richardson NR, Roberts DC. Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J Neurosci Methods* 1996 ; 66 : 1-11.
21. Calipari ES, Siciliano CA, Zimmer BA, Jones SR. Brief intermittent cocaine self-administration and abstinence sensitizes cocaine effects on the dopamine transporter and increases drug seeking. *Neuropsychopharmacology* 2015 ; 40 : 728-35.
22. Chiodo KA, Lack CM, Roberts DC. Cocaine self-administration reinforced on a progressive ratio schedule decreases with continuous D-amphetamine treatment in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2008 ; 200 : 465-73.
23. Chiodo KA, Roberts DC. Decreased reinforcing effects of cocaine following 2 weeks of continuous D-amphetamine treatment in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2009 ; 206 : 447-56.

LA FONDATION PREMUP : UN OPÉRATEUR DE TERRAIN EN PÉRINATALITÉ RECONNU POUR SON EXCELLENCE ET SON INTERDISCIPLINARITÉ

La Fondation de coopération scientifique PremUp, unique en Europe, intervient sur la prévention du handicap à la naissance, par la protection de la santé de la femme enceinte et du nouveau-né.

premup
FONDATION DE COOPÉRATION SCIENTIFIQUE SUR LA GROSSESSE ET LA PRÉMATURITÉ

Stress au travail et usage chronique de benzodiazépines

Résultats prospectifs issus de la cohorte CONSTANCES

Guillaume Airagnes

DMU de psychiatrie et addictologie,
AP-HP. Centre-université de Paris. Cohortes épidémiologiques en population, Inserm UMS 011.
Hôpital Européen Georges Pompidou, 20 rue Leblanc,
75015 Paris, France.
guillaume.airagnes@aphp.fr

› Les benzodiazépines sont les psychotropes les plus prescrits au monde, principalement en raison de leurs propriétés anxiolytiques [1]. Malgré des indications limitées, elles sont fréquemment prescrites en dehors des recommandations de bonnes pratiques qui stipulent de ne pas dépasser 12 semaines de traitement [2]. Leur usage chronique au-delà de cette durée est en effet associé à des risques augmentés d'effets indésirables comprenant, à court terme, les risques de chutes et d'accidents, et à plus long terme, les risques de dépendance et de troubles cognitifs. L'usage chronique de benzodiazépines a également été associé à un risque augmenté de maladie d'Alzheimer et de certains cancers [1].

Dans la population française, l'usage chronique de benzodiazépines concernerait 2,8 % des hommes et 3,8 % des femmes [2]. Les sujets les plus vulnérables aux effets indésirables de ces molécules sont paradoxalement ceux qui sont le plus à risque d'en faire un usage chronique, par exemple les sujets de plus de 50 ans ou ceux qui présentent un état dépressif [2]. Le risque d'usage chronique de benzodiazépines est également accru lorsque les conditions sociodémographiques sont défavorables. Par ailleurs, l'exposition aux risques psychosociaux, qui concerne environ un travailleur sur quatre [3], pourrait être associée à un risque augmenté d'usage chronique de benzodiazépines, au moins en cas d'exposition professionnelle stressante à un public [4]. Alors que des associations longitudinales ont déjà été décrites entre le stress au travail et les usages d'alcool, de tabac et de cannabis, le lien entre le stress au travail et l'usage chronique de benzodiazépines a été peu étudié. L'objectif de cette étude était donc de rechercher des associations prospectives entre le stress au travail et l'usage chronique de benzodiazépines, en tenant compte des facteurs sociodémographiques et des comorbidités (trouble de l'usage de l'alcool, tabagisme, dépression, et altération de l'état de santé général) [5]. Les résultats pourraient déboucher sur des actions d'information et de prévention sur les risques liés à l'existence d'un stress au travail dans le cadre de la santé publique et de la santé au travail.

La population de l'étude était composée de 31 077 sujets inclus dans la cohorte CONSTANCES entre 2012 et 2014 (www.constances.fr). Ces sujets étaient tous en activité au moment de leur recrutement dans cette cohorte, et n'avaient pas présenté d'usage chronique de benzodiazépines durant les deux années précédant l'inclusion. L'usage chronique de benzodiazépines était défini comme un usage continu pendant au moins 12 semaines, en se fondant sur les données objectives de consommation de soins issues du système national d'information inter-régimes de l'assurance maladie (SNIIRAM). Le stress au travail était mesuré à l'aide d'une échelle d'évaluation standardisée du déséquilibre effort-récompense, utilisée en quartiles [6]. Les *odds ratios* d'usage chronique de benzodiazépines au cours d'un suivi de deux ans et en fonction du stress au travail étaient calculés par régression logistique[1]. Les analyses ont d'abord été ajustées pour l'âge, le genre, le niveau d'éducation, la catégorie professionnelle, les revenus du foyer, le statut marital, le statut tabagique, et la présence éventuelle du « trouble de l'usage de l'alcool » en utilisant l'*alcohol use disorder identification test*. Des ajustements supplémentaires ont ensuite été effectués pour l'état de santé perçu et la présence éventuelle de signes de dépression en utilisant l'échelle CES-D *(center for epidemiologic studies-depression)*.

À l'issue des deux années de suivi, 294 participants (0,9 %) ont présenté un usage chronique de benzodiazépines. Le stress au travail mesuré à l'inclusion dans la cohorte CONSTANCES était associé au risque de survenue d'un usage chronique de benzodiazépines avec des *odds ratios* de 1,95 (intervalle de confiance à 95 % : 1,32-2,87) et de 2,80 (IC 95 % : 1,96-4,01) respectivement pour les troisième et quatrième quartiles comparés au premier. Aucune interaction n'était observée entre le stress au travail et les autres variables analysées, à l'exception du statut tabagique (*odds ratio* = 1,89 ; IC 95 % : 1,05-3,41 ; p = 0,03). Les *odds ratios* étaient, chez les fumeurs, respectivement de 2,68 (IC 95 % : 1,17-

[1] La régression logistique, l'un des modèles d'analyse multivariée les plus couramment utilisés en épidémiologie, est un modèle de régression binomiale. Elle permet de mesurer l'association entre la survenue d'un évènement (variable expliquée qualitative) et les facteurs susceptibles de l'influencer (variables explicatives). Le choix des variables explicatives intégrées au modèle de régression logistique est fondé sur une connaissance préalable de la physiopathologie de la maladie et sur l'association statistique entre la variable et l'évènement, mesurée par l'*odds ratio* (également appelé risque relatif rapproché).

m/s n° 3, vol. 36, mars 2020
https://doi.org/10.1051/medsci/2020035

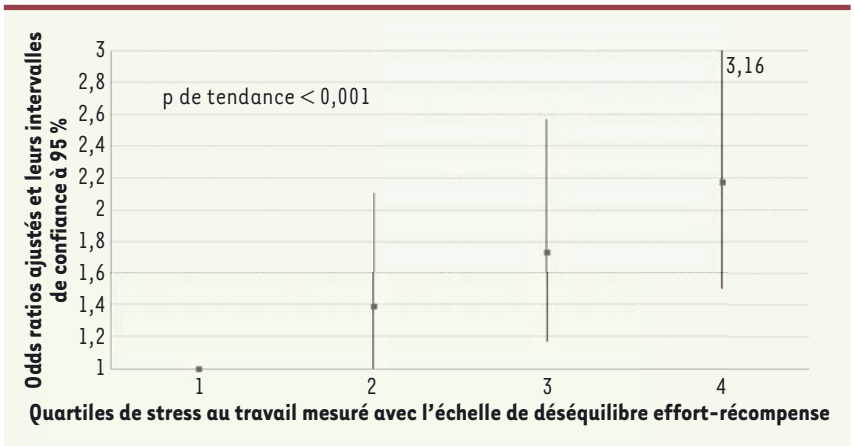


Figure 1. ***Associations entre le stress au travail et l'incidence d'usage chronique de benzodiazépines ajustées pour l'âge, le genre, le niveau d'éducation, la catégorie professionnelle, les revenus du foyer, le statut marital, le statut tabagique, le trouble de l'usage de l'alcool, l'état dépressif et l'état de santé général.***

6,13) et de 4,74 (IC 95 % : 2,31-9,72) pour les troisième et quatrième quartiles comparés au premier, tandis qu'ils étaient respectivement de 1,70 (IC 95 % : 1,07-2,69) et de 2,16 (IC 95 % : 1,41-3,30) chez les non-fumeurs et les anciens fumeurs. Ces *odds ratios* étaient significativement plus élevés chez les fumeurs comparés aux non-fumeurs et anciens fumeurs (Z-score = 2,16 ; p = 0,03). Après ajustements supplémentaires, les *odds ratios* étaient respectivement de 1,74 (IC 95 % : 1,17-2,57) et 2,18 (IC 95 % : 1,50-3,16) pour les troisième et quatrième quartiles comparés au premier *(Figure 1)*. Toutes les associations étaient dose-dépendantes (p de tendance < 0,001 ; *Figure 1*).

À notre connaissance, il s'agit de la première étude ayant examiné prospectivement les associations entre le stress au travail et l'usage chronique de benzodiazépines dans une cohorte nationale issue de la population générale. L'usage chronique de benzodiazépines a été identifié à partir des bases de données médico-administratives de remboursement, c'est-à-dire avec une mesure objective et exhaustive des traitements délivrés. De plus, nous avions la possibilité de nous focaliser sur les « nouveaux » utilisateurs de benzodiazépines (cas incidents), en excluant ceux qui avaient présenté un usage chronique de benzodiazépines au cours des deux années précédant l'inclusion dans la cohorte. Les mesures du stress au travail, des symptômes dépressifs, et du trouble de l'usage de l'alcool reposaient sur des outils d'évaluation standardisés. Enfin, nos analyses ont tenu compte de plusieurs facteurs de confusion[2] potentiels.

Toutefois, cette étude comporte plusieurs limites. Tout d'abord, le caractère prospectif de l'étude ne permet pas pour autant d'exclure la possibilité d'une causalité inverse (ou circulaire), de même que l'existence de facteurs confondants résiduels. Par exemple, parmi les facteurs potentiellement confondants qui n'ont pas été mesurés dans cette étude, la personnalité et les antécédents d'addiction pourraient expliquer à la fois la tendance au stress au travail et à l'usage chronique de benzodiazépines. Par ailleurs, il n'était pas possible de s'assurer que les médicaments délivrés étaient effectivement consommés (même s'il est peu probable qu'un individu se rende à au moins quatre reprises à la pharmacie pour se faire délivrer un traitement sur ordonnance sans que ce soit pour le consommer) et la méthode d'identification de l'usage de benzodiazépines ne tenait pas compte des consommations sans prescription (*e.g.*, consommation de benzodiazépines prescrites pour quelqu'un d'autre, achat de benzodiazépines au marché noir).

En conclusion, cette étude a mis en évidence l'association entre le stress au travail et le risque d'usage chronique de benzodiazépines au cours d'un suivi de deux ans, en tenant compte des facteurs sociodémographiques, du statut tabagique, de la présence éventuelle du trouble de l'usage de l'alcool ou d'une dépression, et de l'état de santé perçu. En situation de stress au travail, l'usage de benzodiazépines pourrait être favorisé par la volonté de réduire ce stress ou ses conséquences, et d'améliorer ses performances au travail [7]. L'exposition chronique au stress ainsi que les effets addictogènes des benzodiazépines pourraient alors en favoriser l'usage chronique. Les risques plus élevés chez les fumeurs sont en accord avec une plus grande sensibilité des fumeurs aux situations stressantes [8]. De plus, les fumeurs sont plus enclins à utiliser des substances pour faire face au stress, et il existe vraisemblablement un profil de vulnérabilité commun à l'usage des benzodiazépines et à celui du tabac en situation de stress. Quoi qu'il en soit, le repérage et la prévention du risque d'usage chronique de benzodiazépines devraient être systématisés chez les personnes qui sont en situation de stress au travail, y compris chez celles qui n'ont pas d'autres indicateurs de vulnérabilité. Il existe des échelles standardisées d'évaluation de la dépendance aux benzodiazépines, telles que BenDep-SRQ [9], et la prise en charge thérapeutique peut s'appuyer sur des recommandations internationales [10]. ◊

Job stress and benzodiazepines long-term use: prospective findings from the CONSTANCES cohort

[2] En statistique, une variable confondante, appelée aussi facteur confondant ou facteur de confusion, est une variable aléatoire qui influence à la fois la variable dépendante et les variables explicatives. Ces facteurs sont notamment à l'origine de la différence entre corrélation et causalité.

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare avoir reçu des honoraires comme orateur et/ou consultant de Lundbeck, Pfizer et Pierre Fabre.

RÉFÉRENCES

1. Airagnes G, Pelissolo A, Lavallee M, *et al.* Benzodiazepine misuse in the elderly: risk factors, consequences, and management. *Curr Psychiatry Rep* 2016 ; 18 : 89.
2. Airagnes G, Lemogne C, Renuy A, *et al.* Prevalence of prescribed benzodiazepine long-term use in the French general population according to sociodemographic and clinical factors: findings from the CONSTANCES cohort. *BMC Public Health* 2019 ; 19 : 566.
3. Bègue C, Fouquet N, Bodin J, *et al.* Evolution of psychosocial factors at work in a French region. *Occup Med* 2015 ; 66 : 128-34.
4. Airagnes G, Lemogne C, Olekhnovitch R, *et al.* Work-related stressors and increased risk of benzodiazepine long-term use: findings from the CONSTANCES population-based cohort. *AmJPublic Health* 2019 ; 109 : 119-25.
5. Airagnes G, Lemogne C, Kab S, *et al.* Effort-reward imbalance and long-term benzodiazepine use: longitudinal findings from the CONSTANCES cohort. *J Epidemiol Community Health* 2019 ; 73 : 993-1001.
6. Siegrist J, Wahrendorf M, Goldberg M, *et al.* Is effort-reward imbalance at work associated with different domains of health functioning? Baseline results from the French CONSTANCES study. *Int Arch Occup Environ Health* 2018 ; 92 : 467.
7. Ngoundo-Mbongue TB, Niezborala M, Sulem P, *et al.* Psychoactive drug consumption: performance-enhancing behaviour and pharmacodependence in workers. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2005 ; 14 : 81-9.
8. Back SE, Waldrop AE, Saladin ME, *et al.* Effects of gender and cigarette smoking on reactivity to psychological and pharmacological stress provocation. *Psychoneuroendocrinol* 2008 ; 33 : 560-8.
9. Kan CC, van der Ven AH, Breteler MH, Zitman FG. Latent trait standardization of the benzodiazepine dependence self-report questionnaire using the Rasch scaling model. *Compr Psychiatry* 2001 ; 42 : 424-32.
10. Soyka M. Treatment of benzodiazepine dependence. *N Engl J Med* 2017 ; 376 : 1147-57.

NOUVELLE

Comment le stress précoce altère le comportement à l'âge adulte

Anne Teissier, Patricia Gaspar

Institut du Fer à Moulin, Inserm UMRS 839 / Sorbonne Université, Paris, France.
Institut de Psychiatrie et Neurosciences de Paris, Inserm UMRS 1266, Paris, France.
Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, CHU Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France.
anne.teissier@inserm.fr
patricia.gaspar@inserm.fr

> L'environnement dans lequel un enfant grandit joue un rôle crucial dans le développement de son cerveau et l'établissement d'un équilibre psychique. On sait, grâce à de nombreuses études épidémiologiques, que l'exposition à des traumatismes pendant l'enfance (notamment par négligence émotionnelle ou physique, ou par des abus émotionnels, physiques, ou sexuels) augmente le risque de développer des troubles psychiques tels qu'un état anxieux ou dépressif, et constitue un facteur aggravant pour des maladies psychiatriques comme la bipolarité ou la schizophrénie [1]. On estime que 30 % du risque de maladie psychiatrique est imputable aux traumatismes de l'enfance [2], ce qui fait de leur prévention un enjeu important de santé publique.

Les mécanismes biologiques impliqués restent mal compris. L'étude des cerveaux de sujets adultes ayant été exposés à un stress pendant l'enfance a permis d'identifier des altérations de l'activité corticale et de la substance blanche, notamment dans le cortex préfrontal, une région cérébrale impliquée dans le contrôle émotionnel et la cognition [3]. Pour tenter de comprendre l'origine des anomalies comportementales persistantes après un stress précoce, nous avons entrepris d'identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent la perturbation du développement cérébral associée.

Les étapes d'un développement cérébral normal

Les neurones sont essentiellement générés pendant la vie embryonnaire. Puis, durant une période de maturation, ils étendent leurs axones et leurs dendrites, avant d'émettre des potentiels d'action et d'établir des contacts synaptiques afin de former des réseaux fonctionnels. En parallèle de ce processus de maturation neuronale a lieu la gliogenèse, c'est-à-dire la production des cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes, et cellules microgliales) et leur différenciation. Les cellules gliales sont essentielles au fonctionnement cérébral [4] (➜) : les astrocytes subviennent aux besoins énergétiques des neurones, les cellules microgliales contrôlent la maturation synaptique, tandis que les oligodendrocytes synthétisent la gaine de myéline autour des axones, ce qui permet une conduction plus rapide de l'influx nerveux. Ces phénomènes de maturation neuronale et de gliogenèse, qui débutent durant la vie intra-utérine et se prolongent dans l'enfance, sont donc les plus susceptibles d'être affectés par un stress précoce. Plus tard, durant l'adolescence, une étape de sélection des connexions neuronales qui persisteront dans le cerveau adulte permet une optimisation des réseaux neuronaux et ainsi l'adaptation à l'environnement.

(➜) Voir l'Éditorial d'Y. Agid et X. Fan, *m/s* n° 3, mars 2019, page 199

Les processus moléculaires contrôlant le développement cérébral étant pour la

m/s n° 3, vol. 36, mars 2020
https://doi.org/10.1051/medsci/2020036

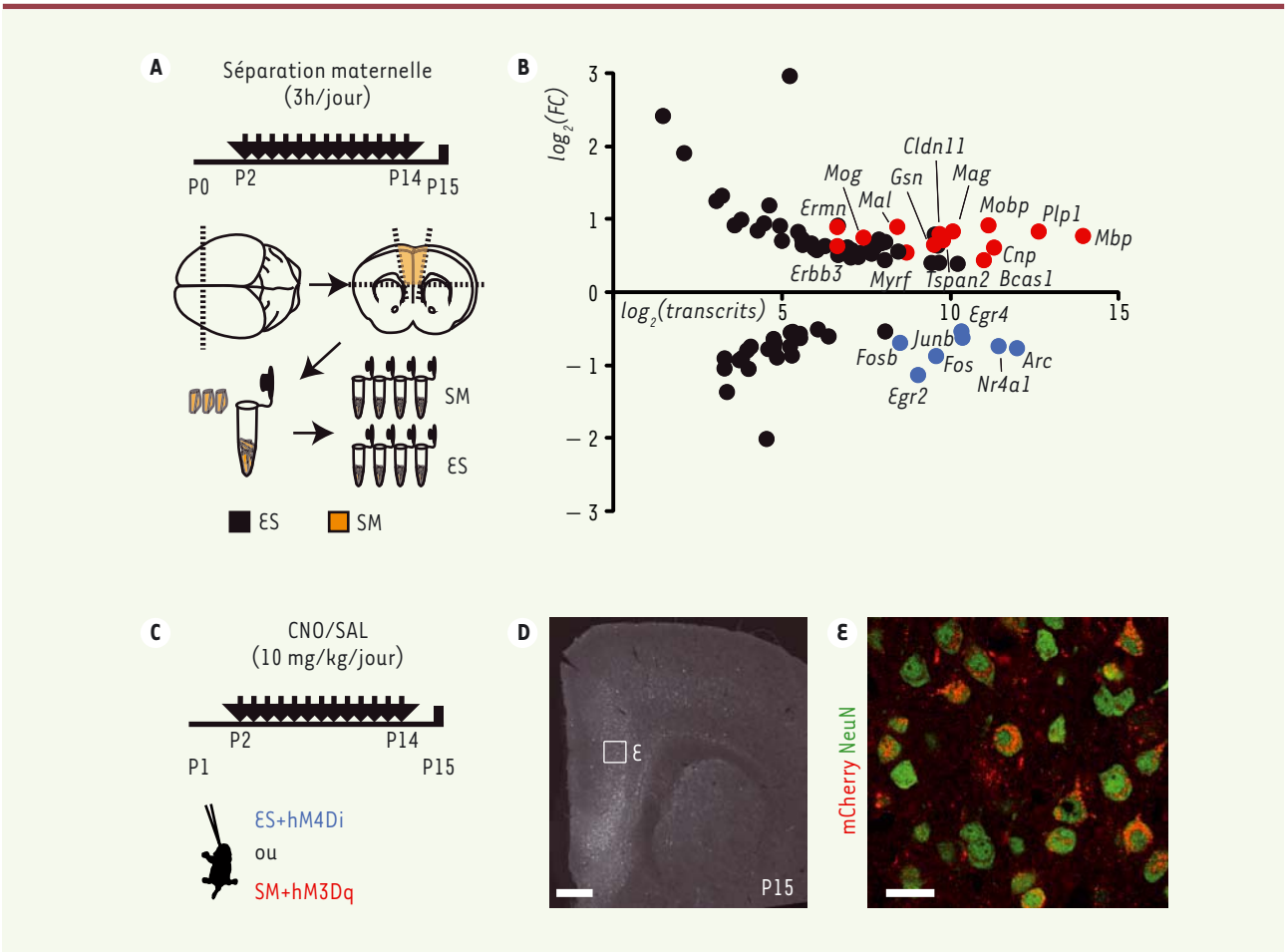


Figure 1. ***Les altérations moléculaires liées à un stress précoce répété peuvent être reproduites ou prévenues par la modulation de l'activité neuronale du cortex préfrontal. A.*** Les souriceaux soumis au protocole de séparation maternelle (SM) ont été séparés de leur mère pendant 3 heures chaque jour entre le jour post-natal 2 (P2) et P14 ; leur cortex préfrontal a été prélevé à P15 pour analyser le transcriptome. Les souriceaux témoins ont eu un élevage standard (ES). ***B.*** Les résultats du séquençage des transcrits montrent des changements affectant principalement l'expression de gènes associés à l'activité neuronale (points bleus) et à la myéline (points rouges). *FC* : *fold change*. ***C.*** La modulation répétée de l'activité neuronale a été effectuée par l'injection locale à P1 d'un vecteur viral recombinant permettant l'expression d'un récepteur muscarinique modifié (hM3Dq, stimulateur, ou hM4Di, inhibiteur) dans les neurones du cortex préfrontal. Ces récepteurs ont été activés par injections répétées (chaque jour entre P2 et P14) du ligand inerte, la clozapine N-oxyde (CNO), ou n'ont pas été activés dans le groupe témoin qui a reçu des injections répétées de solution saline (SAL). ***D.*** Expression spécifique du récepteur muscarinique modifié dans le cortex préfrontal à P15 après injection à P1. (E) Image agrandie de la zone encadrée en (D). La construction virale utilisée permet d'exprimer un marqueur fluorescent (mCherry+) en même temps que le récepteur dans les neurones (NeuN$^+$). Barres d'échelle : 500 µm (D) et 20 µm (E).

plupart très conservés chez les mammifères, nous avons utilisé un modèle murin de séparation maternelle pour analyser, à l'échelle moléculaire, les effets d'un stress précoce sur le cerveau en développement. Dans ce modèle, les souriceaux sont séparés de leur mère pendant 3 heures par jour entre le jour post-natal 2 (P2) et P14. La dernière séparation est donc effectuée environ une semaine avant le sevrage des souriceaux, qui a lieu vers P21. Plusieurs études préalables ont montré que les rongeurs ayant subi un protocole de séparation maternelle présentent, à l'âge adulte, des altérations comportementales similaires à celles d'hommes exposés à un traumatisme précoce, notamment: 1) une réaction physiologique au stress exagérée, 2) une diminution de l'activité du cortex préfrontal, et 3) une altération des processus cognitifs et émotionnels [5]. A noter que, chez l'homme, les effets d'un stress peuvent être compensés ou non par l'environnement social ou matériel, et les conséquences comportementales sont donc souvent moins profondes que dans les modèles d'animaux de laboratoire, élevés dans des conditions standardisées et pour lesquels il existe donc peu ou pas de « biais environnemental ».

Le stress précoce répété induit des altérations de l'activité neuronale et de la myéline dans le cortex préfrontal en développement

Nous cherchions à identifier les altérations moléculaires précoces pouvant être à l'origine des troubles persistants observés chez l'adulte. Pour cela, nous avons réalisé, chez des souriceaux exposés ou non à une séparation maternelle répétée, le séquençage de tous les transcrits des gènes exprimés dans le cortex préfrontal à P15, c'est-à-dire un jour après leur dernière séparation *(Figure 1A)* [6]. Nous avons ainsi découvert deux altérations majeures chez les souriceaux ayant subi ce stress répété. D'une part, une diminution du nombre des transcrits de gènes associés à l'activité neuronale, c'est-à-dire ceux dont l'expression est rapidement modifiée par cette activité *(Figure 1B)*. Nos résultats et ceux d'autres équipes de recherche suggèrent que cette diminution de l'activité neuronale au repos pourrait atténuer les pics transitoires d'activité neuronale dus au stress, et persisterait à l'âge adulte [5, 7]. D'autre part, nous avons observé une augmentation du nombre des transcrits de gènes dont l'expression est spécifique des oligodendrocytes (les cellules synthétisant la myéline). En utilisant des immunomarquages et des marqueurs de la division cellulaire, nous avons pu mettre en évidence une différenciation prématurée des précurseurs d'oligodendrocytes (OPC) en oligodendrocytes matures aux dépens des OPC qui continuent à proliférer, ainsi qu'une augmentation des quantités de myéline dans le cortex préfrontal à P15 [6]. Enfin, les animaux ayant subi ce stress précoce répété avaient, à l'âge adulte, une diminution de la densité des OPC, qui pourrait être à l'origine d'une diminution de la quantité de myéline, ou tout au moins d'une diminution de la plasticité de la myélinisation.

Ainsi, cette analyse moléculaire a permis d'identifier, chez la souris, deux processus du développement du cortex cérébral affectés par un stress précoce répété, et dont la perturbation a des conséquences à long terme sur le fonctionnement du cerveau adulte, donc, potentiellement, sur le comportement. Il est à noter que l'existence d'une perturbation de l'activité corticale et de la myélinisation a également été suggérée pour les traumatismes de l'enfance chez l'homme. En effet, Nelson *et al.* ont montré que des enfants élevés en orphelinat ont une diminution de l'activité corticale et du volume de la substance blanche, par rapport à ceux qui ont été adoptés avant l'âge de 2 ans [8]. De plus, chez de jeunes adultes ayant subi une agression sexuelle pendant l'enfance, une différenciation précoce des précurseurs d'oligodendrocytes a été rapportée [9].

Les modèles animaux offrent la possibilité d'étudier le mécanisme de ces perturbations précoces et leurs liens avec les troubles comportementaux observés ultérieurement. Nous avons ainsi pu détecter les défauts d'activité neuronale dans le cortex préfrontal des souriceaux exposés au stress avant même qu'une altération du processus de différenciation des OPC ne soit apparente. Nous avons donc cherché à déterminer si une modulation de l'activité neuronale pendant le développement pouvait induire les défauts de gliogenèse et des défauts comportementaux similaires à ceux induits par le stress précoce.

La modulation de l'activité du cortex préfrontal au cours du développement reproduit ou, au contraire, prévient les défauts induits par un stress précoce répété

Pour manipuler localement l'activité neuronale du cortex préfrontal en développement, nous avons utilisé les récents outils pharmacogénétiques. Ces derniers permettent, après injection locale d'un vecteur d'expression viral, d'exprimer un récepteur modifié puis de moduler l'activité neuronale en activant spécifiquement ce récepteur grâce à un ligand exogène et inerte traversant la barrière hémato-encéphalique [10]. Nous avons injecté de façon bilatérale le cortex préfrontal de souriceaux à P1 avec des virus permettant l'expression d'un récepteur muscarinique (récepteur couplé à une protéine G) hM3Dq ou hM4Di modifié, afin de pouvoir renforcer (hM3Dq) ou inhiber (hM4Di) l'activité des neurones de cette région du cerveau *(Figure 1C, D)*. Nous avons ensuite exposé les souriceaux au ligand de ces récepteurs chaque jour entre P2 et P14 afin de perturber l'activité neuronale de façon répétée.

Les souriceaux chez lesquels l'activité neuronale du cortex préfrontal a ainsi été diminuée par activation du récepteur hM4Di présentent des altérations physiologiques et comportementales très similaires à celles que nous avons observées après le stress précoce répété, à savoir : 1) une diminution persistante de l'activité neuronale, 2) une différenciation précoce des précurseurs d'oligodendrocytes, et 3) une augmentation des comportements associés à l'anxiété et à un état dépressif, ainsi qu'une altération de la mémoire à court terme [5]. Ainsi, nos résultats indiquent qu'une diminution locale et transitoire de l'activité neuronale du cortex préfrontal est suffisante pour reproduire plusieurs conséquences, à court terme et à long terme, d'un stress précoce répété chez la souris.

Inversement, nous avons ensuite voulu savoir si le rétablissement d'une activité neuronale normale dans le cortex préfrontal de souriceaux subissant un stress précoce répété permettrait de prévenir l'apparition des défauts de gliogenèse et de comportement. Une augmentation de l'activité des neurones du cortex préfrontal, par activation du récepteur hM3Dq, chez les souriceaux *pendant* le protocole de séparation maternelle a entraîné la disparition du défaut de prolifération des OPC, du déficit de la mémoire à court terme, ainsi que des altérations comportementales associées à un état dépressif [6]. Cependant, cette augmentation n'a pas empêché l'apparition des troubles du comportement associés à l'anxiété. Cette différence d'effet sur les troubles anxieux et sur les troubles dépressifs pourrait être due à

spatial de l'injection virale (qui n'aurait modifié l'activité que de certains circuits émotionnels), ou au fait que le rétablissement de l'activité neuronale par cette technique pharmacogénétique ne reproduit pas l'état physiologique des réseaux neuronaux en développement. En effet, les rythmes d'activité neuronale détectables sur l'électroencéphalogramme sont établis par l'activité synchrone de sous-ensembles particuliers de neurones excitateurs et inhibiteurs d'une même région, alors que l'activation pharmacogénétique ne permet pas d'établir cette distinction.

Ces résultats ont donc permis de mettre en évidence la contribution physiologique d'une baisse précoce de l'activité neuronale du cortex préfrontal dans l'apparition de troubles comportementaux consécutive à un stress précoce répété chez la souris. Il reste à identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans cette diminution persistante de l'activité neuronale. Par ailleurs, puisqu'un enrichissement de l'environnement social et sensoriel augmente l'activité du cortex préfrontal [11], il serait intéressant de tester l'efficacité préventive d'un tel enrichissement sur l'apparition des troubles liés au stress précoce répété, d'abord chez la souris, puis chez l'homme.

Les défauts de myélinisation au cœur des maladies psychiatriques ?

Nous avons mis en évidence une accélération précoce du processus de myélinisation dans le cortex préfrontal après exposition des souriceaux à un stress répété, avec un impact à long terme sur la densité des précurseurs d'oligodendrocytes à l'âge adulte. La différenciation précoce de ces précurseurs pourrait être adaptative à court terme (les circuits neuronaux deviendraient plus rapidement fonctionnels grâce à la myélinisation accélérée des axones), mais son coût à long terme serait une baisse de la réserve d'OPC et un potentiel d'adaptation restreint à l'âge adulte.

De plus, nous avons montré que l'activité neuronale précoce contrôle l'équilibre entre prolifération et différenciation des précurseurs d'oligodendrocytes au cours du développement. Des défauts de myélinisation sont présents dans de nombreuses maladies psychiatriques telles que les troubles du spectre autistique, la schizophrénie, ou la dépression récurrente [12]. De plus, des données de plus en plus nombreuses suggèrent que les oligodendrocytes et leurs précurseurs influent sur le comportement émotionnel [13]. Il sera intéressant de déterminer si la baisse de densité des OPC dans le cortex préfrontal adulte est suffisante pour induire des troubles comportementaux. Comprendre le rôle des oligodendrocytes et de la myélinisation dans l'émergence des troubles émotionnels précoces pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques. ◊

How early life impacts emotional behaviour in adulthood

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Heim C, Shugart M, Craighead WE, Nemeroff CB. Neurobiological and psychiatric consequences of child abuse and neglect. *Dev Psychobiol* 2010 ; 52 : 71-90.
2. Kessler RC, McLaughlin K, Green J, *et al.* Childhood adversities and adult psychopathology in the WHO world mental health surveys. *Br J Psychiatry* 2010 ; 197 : 378-85.
3. Insana SP, Banihashemi L, Herringa RJ, *et al.* Childhood maltreatment is associated with altered frontolimbic neurobiological activity during wakefulness in adulthood. *Dev Psychopathol* 2016 ; 28 : 551-64.
4. Agid Y, Fan X. L'autre moitié du cerveau… les cellules gliales. *Med Sci (Paris)* 2019 ; 35 : 199-200.
5. Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T. Effects of early life adverse experiences on the brain: Implications from maternal separation models in rodents. *Front Neurosci* 2014 ; 8 : 1-6.
6. Teissier A, Andrade-da-Costa B, Le Magueresse C, *et al.* Early-life stress impairs postnatal oligodendrogenesis and adult emotional behaviour through activity-dependent mechanisms. *Mol Psychiatry* 2019 ; https://doi.org/10.1038/s41380-019-0493-2
7. Benekareddy M, Vadodaria KC, Nair AR, Vaidya VA. Postnatal serotonin type 2 receptor blockade prevents the emergence of anxiety behavior, dysregulated stress-induced immediate early gene responses, and specific transcriptional changes that arise following early life stress. *Biol Psychiatry* 2011 ; 70 : 1024-32.
8. Nelson CA. Hazards to early development: the biological embedding of early life adversity. *Neuron* 2017 ; 96 : 262-66.
9. Tanti A, Kim JJ, Wakid M, *et al.* Child abuse associates with an imbalance of oligodendrocyte-lineage cells in ventromedial prefrontal white matter. *Mol Psychiatry* 2017 ; 23 : 2018-28.
10. Alexander GM, Rogan A, Abbas S, *et al.* Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors. *Neuron* 2009 ; 63 : 27-39.
11. Lehmann ML, Herkenham M. Environmental enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway. *J Neurosci* 2011 ; 31 : 6159-73.
12. Fields RD. White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends Neurosci* 2008 ; 31 : 361-70.
13. Mount CW, Monje M. Wrapped to adapt: Experience-dependent myelination. *Neuron* 2017 ; 95 : 743-56.

Tarifs d'abonnement *m/s* - 2020

Abonnez-vous à *médecine/sciences*

> Grâce à *m/s*, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement page 294 dans ce numéro de *m/s*

Rôle de l'hepcidine dans les infections cutanées

Mariangela Malerba, Carole Peyssonnaux

[1]Université de Paris, Institut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR8104, 24 rue du Faubourg Saint Jacques, F-75014 Paris, France.
[2]Laboratoire d'excellence GR-Ex, Paris, France
carole.peyssonnaux@inserm.fr

L'hepcidine hépatique, hormone clé de l'homéostasie du fer dans l'organisme

L'hepcidine est un peptide de 25 acides aminés principalement produit par le foie et sécrété dans la circulation sanguine en conditions de surcharge en fer, d'infection, ou d'inflammation [1]. L'hepcidine est l'hormone de l'homéostasie du fer. Elle inhibe l'exportation du fer des entérocytes (site de l'absorption intestinale du fer alimentaire) et des macrophages (site de recyclage du fer de l'hémoglobine) en dégradant la ferroportine (FPN), une protéine exportatrice du fer située à la membrane de ces cellules [2]. Une augmentation de la production d'hepcidine provoque donc une diminution de la concentration plasmatique du fer. La carence en hepcidine est associée à l'hémochromatose héréditaire, une maladie caractérisée par une surcharge progressive en fer pouvant entraîner de graves dysfonctionnements de divers organes.

Le fer est le seul micronutriment dont la régulation hormonale dépend à la fois de l'état nutritionnel et d'une possible infection. Le fer joue un rôle particulier dans la médiation des interactions hôte-pathogène, car ce métal est au centre d'une bataille nutritionnelle entre l'hôte et les pathogènes. L'hepcidine contribue à l'immunité innée en diminuant les niveaux de fer plasmatique, et ainsi la disponibilité du fer pour les microbes [3]. À terme, cependant, cette diminution du fer plasmatique associée à une inflammation conduit à une anémie.

L'hepcidine est également produite dans d'autres organes/cellules que le foie (rein, poumon, macrophages, etc.), notamment lors d'infections [4]. L'hepcidine produite par le foie étant suffisante pour assurer l'homéostasie systémique du fer dans des conditions physiologiques [5], la production d'hepcidine par les autres tissus pourrait jouer un rôle local, notamment au site des infections ou dans des tissus mal perfusés, inaccessibles à l'hepcidine présente dans le sang.

Nouveau rôle immunomodulateur de l'hepcidine cutanée en conditions infectieuses

Si l'hepcidine est désormais reconnue comme l'hormone de l'homéostasie du fer, elle a été identifiée initialement comme un peptide antimicrobien cationique (PAM) du fait de sa similarité de structure avec les β-défensines. Les PAM sont des antibiotiques naturels capables de tuer des souches bactériennes variées [6]. Même si l'hepcidine conserve les fonctions antimicrobiennes prototypiques des PAM dans différentes espèces de poissons, cette propriété ne persiste qu'à l'état rudimentaire chez les vertébrés supérieurs et n'a pas retenu l'attention de la communauté scientifique. Toutefois, les effets des PAM sont pléiotropes et assurent la protection de l'hôte non seulement par la destruction directe des agents pathogènes (fonction antimicrobienne) mais également par la modulation du système immunitaire de l'hôte (fonction immunomodulatrice). Pourtant, le rôle immunomodulateur de l'hepcidine et son éventuelle expression dans des épithéliums tels que celui de la peau (source majeure de production de PAM) n'avaient jamais été étudiés. Nous avons donc entrepris cette étude, en choisissant comme modèle la fasciite nécrosante (FN), plus connue sous le nom de gangrène ou « maladie mangeuse de chair ». La FN est une infection caractérisée par une nécrose généralisée de la peau et des tissus profonds, décrite pour la première fois par Hippocrate au Ve siècle. Le traitement standard comprend des antibiotiques à large spectre et un débridement chirurgical[1] complet. Cependant, malgré l'usage d'antibiotiques et l'exérèse chirurgicale des tissus nécrotiques, le risque de septicémie reste élevé, avec un taux de mortalité pouvant atteindre 30 %. Le streptocoque du groupe A est considéré comme la cause la plus fréquente de FN associée à la septicémie [7].

Nous avons d'abord montré que l'hepcidine est produite par la peau de patients souffrant de FN due au streptocoque du groupe A [8]. Pour étudier son rôle dans le développement de la FN, nous avons utilisé un modèle murin d'infection nécrosante. Des bactéries d'une souche de streptocoque du groupe A isolées à partir d'un patient atteint de FN sont introduites chez la souris par voie sous-cutanée ; la souris développe alors des lésions nécrotiques de la peau et une septicémie dans les jours suivant l'infection. Comme chez l'homme, l'hepcidine est produite dans la peau infectée et peut être détectée dans les kératinocytes de l'épiderme. Grâce à l'analyse de souris mutantes dont le gène de l'hepcidine a été invalidé dans les kératinocytes, nous avons pu montrer que la production locale d'hepcidine est nécessaire non seulement pour limiter la prolifération bactérienne au site de la lésion mais également pour empêcher la dissémination bactérienne [8]. Nous avons alors cherché à comprendre le

[1] Le débridement consiste à enlever tous les tissus dévitalisés, nécrotiques ou infectés.

m/s n° 3, vol. 36, mars 2020
https://doi.org/10.1051/medsci/2020037

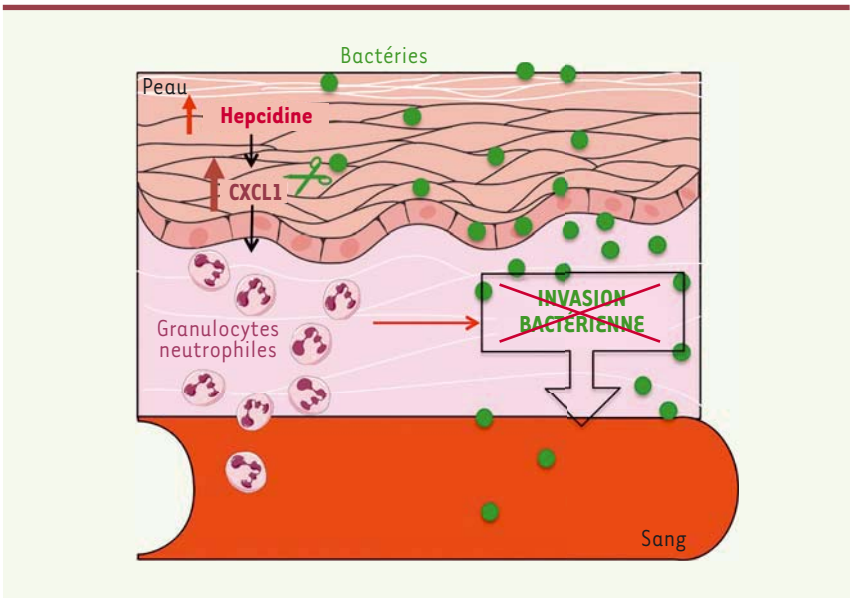


Figure 1. ***L'hepcidine produite par la peau augmente le recrutement des granulocytes neutrophiles au site d'infection et empêche l'invasion bactérienne.*** En réponse à l'infection par les streptocoques du groupe A (SGA), les kératinocytes produisent l'hepcidine nécessaire à la synthèse de CXCL1, chimiokine clé des granulocytes (ou polynucléaires) neutrophiles. Contrairement à CXCL1, l'hepcidine est résistante à la dégradation par les principales protéases bactériennes (ici représentées par des ciseaux), et pourrait donc servir de réservoir pour maintenir des niveaux stables de CXCL1 dans les tissus infectés. L'hepcidine permet alors un recrutement efficace de granulocytes neutrophiles, et empêche la propagation systémique des bactéries.

mécanisme en cause. L'hepcidine n'a pas d'effet antimicrobien direct sur ces bactéries. En revanche, l'hepcidine produite par les kératinocytes est essentielle à la synthèse de *chemokine (C-X-C motif) ligand 1* (CXCL1), chimiokine clé des granulocytes neutrophiles. Cette induction semble s'effectuer par une voie dépendant de la ferroportine, seul récepteur connu de l'hepcidine. Cette augmentation de CXCL1 par l'hepcidine permet le recrutement des granulocytes neutrophiles, cellules clés du système immunitaire, au site de l'infection *(Figure 1)*. Ces granulocytes sont des agents antibactériens essentiels dans la défense de l'organisme, notamment contre les infections par les streptocoques du groupe A. Lors de la détection de ces bactéries pyogènes, le recrutement des granulocytes neutrophiles, qui débute dès les premières minutes de l'infection, est également essentiel à sa résolution [9]. Toutefois, les streptocoques du groupe A contrecarrent le système immunitaire de l'hôte en produisant des protéases, telles que SpyCEP, qui vont dégrader CXCL1 et d'autres protéines impliquées dans le recrutement et l'activation des granulocytes neutrophiles [10]. Nous avons montré que l'hepcidine, contrairement à CXCL1, est résistante à la dégradation, ce qui suggère qu'elle pourrait servir de réservoir pour maintenir un pool de CXCL1 dans le contexte de l'infection. CXCL1 est phylogénétiquement ancien puisqu'il est déjà présent chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*, tandis que l'hepcidine est apparue plus récemment au cours de l'évolution, chez les poissons téléostéens. Compte tenu de la théorie selon laquelle les interactions hôte-pathogène co-évoluent, nous pouvons spéculer que les streptocoques du groupe A ont évolué pour contrer l'activité de CXCL1, alors qu'ils n'ont pas encore développé de facteurs de virulence capables de neutraliser l'activité de l'hepcidine.

Nous avons fait l'hypothèse que l'hepcidine, du fait de sa résistance à la dégradation et de ses propriétés immunomodulatrices, pourrait être utilisée dans un but thérapeutique. En effet, l'administration de l'hepcidine à des souris dans les 24 heures suivant l'infection par des streptocoques du groupe A stimule le recrutement de granulocytes neutrophiles et empêche l'invasion bactérienne [8]. L'utilisation thérapeutique de l'hepcidine peut donc constituer une stratégie alternative opportune compte tenu de l'incidence croissante des maladies invasives dues aux streptocoques du groupe A.

En conclusion de cette étude, nous avons montré que l'hepcidine, outre son rôle clé en tant qu'hormone de régulation du fer produite par le foie, est également un composant essentiel, jusqu'ici non reconnu, de la réponse immunitaire à une infection bactérienne lorsqu'elle est produite par l'épiderme. L'hepcidine possède des rôles pléiotropes en conditions infectieuses. Elle restreint la disponibilité du fer pour les microorganismes, favorise le recrutement des granulocytes neutrophiles, et empêche la dissémination bactérienne. Elle est très résistante aux protéases bactériennes, contrairement aux chimiokines des granulocytes neutrophiles. Comme l'hepcidine n'agit pas sur les bactéries elles-mêmes, mais sur le système immunitaire et sur la disponibilité du fer, un nutriment clé pour les bactéries, nous pouvons supposer que son action thérapeutique ne se limite pas aux streptocoques du groupe A, mais s'applique à un large éventail de bactéries. L'hepcidine pourrait donc être envisagée comme une alternative thérapeutique aux antibiotiques dans de nombreuses maladies. ◊

Role of hepcidin in cutaneous infections

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, *et al.* The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002 ; 110 : 1037-44.

RÉFÉRENCES

2. Ganz T. Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev* 2013 ; 93 : 1721-41.
3. Weiss G, Ganz T, Goodnough LT. Anemia of inflammation. *Blood* 2019 ; 133 : 40-50.
4. Daher R, Lefebvre T, Puy H, Karim Z. Extrahepatic hepcidin production: the intriguing outcomes of recent years. *World J Clin Cases* 2019 ; 7 : 1926-36.
5. Zumerle S, Mathieu JR, Delga S, *et al.* Targeted disruption of hepcidin in the liver recapitulates the hemochromatotic phenotype. *Blood* 2014 ; 123 : 3646-50.
6. Nakatsuji T, Gallo RL. Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *J Invest Dermatol* 2012 ; 132 : 887-95.
7. Hakkarainen TW, Kopari NM, Pham TN, Evans HL. Necrotizing soft tissue infections: review and current concepts in treatment, systems of care, and outcomes. *Curr Probl Surg* 2014 ; 51 : 344-62.
8. Malerba M, Louis S, Cuvellier S, *et al.* Epidermal hepcidin is required for neutrophil response to bacterial infection. *J Clin Invest* 2020 ; 130 : 329-34.
9. Walker MJ, Barnett TC, McArthur JD, *et al.* Disease manifestations and pathogenic mechanisms of group A *Streptococcus*. *Clin Microbiol Rev* 2014 ; 27 : 264-301.
10. Dohrmann S, Cole JN, Nizet V. Conquering neutrophils. *PLoS Pathog* 2016 ; 12 : e1005682.

Institut de Recherche en Santé Publique
GIS-IReSP

Questions de santé publique

Un nouveau bulletin pour une meilleure visibilité des résultats de la recherche en santé publique

Les résultats de la recherche en santé publique souffrent en France d'un réel manque de visibilité. Ceci concerne aussi bien le monde académique (hors santé publique) que le grand public et les décideurs. Pour pallier ce déficit, l'IReSP a créé un bulletin à large diffusion intitulé « *Questions de santé publique* », largement inspiré du bulletin mensuel d'information de l'INED « *Populations et sociétés* ». L'objectif éditorial est de porter à la connaissance d'un large public (enseignants, étudiants, journalistes, décideurs, milieux de la recherche, associations, public concerné) les informations les plus récentes concernant des questions importantes de santé publique, rédigées de façon facilement lisible et compréhensible pour des non spécialistes, en garantissant que les informations publiées sont validées scientifiquement. La publication concerne des faits et non des positions. Au-delà de la présentation de résultats, les qualités pédagogiques de *Questions de santé publique* permettent au lecteur de mieux comprendre comment sont formulées et abordées les questions de santé publique et quelles sont les limites de ces études.

Nom .....
Prénom .....

Institution ..... Fonction .....
Spécialité ..... Service .....

Adresse .....
Ville .....
Code postal .....
Pays .....
Adresse électronique .....

à nous retourner par la poste ou par fax au 01 49 85 03 45

Questions de santé publique
EDP Sciences
17 avenue du Hoggar
91944 Les Ulis
France

Réservé aux abonnés de M/S
Recevez gratuitement et régulièrement
Questions de santé publique
en renvoyant ce document soigneusement rempli.

Questions de santé publique est une publication de l'Institut de Recherche en Santé Publique. **Directeur de la publication** : Corinne Alberti. **Rédactrice en chef** : Kodja Yetongnon. **Comité de relecture** : Lorraine Cousin, Jean-Marie Gagliolo, Coline Terroba. Réalisation : EDP Sciences.

médecine/sciences 2020 ; 36 : 225-30

La sphère orale, cible et marqueur de l'exposition environnementale

I. Défauts du développement dentaire

Sylvie Babajko[1], Véronique Gayrard[2], Sophia Houari[1], Ai Thu Bui[1], Robert Barouki[3], Karen Niederreither[4], Jean-Baptiste Fini[5], Elisabeth Dursun[6], Xavier Coumoul[3]

> La cavité buccale est l'une des voies majeures des contaminations environnementales connues pour être impliquées dans de nombreuses pathologies chroniques (cancers, troubles de la fertilité et du comportement) *via* l'alimentation, les médications ou même la respiration. Ces facteurs environnementaux incluant, entre autres, des perturbateurs endocriniens et le fluor en excès, peuvent perturber le développement dentaire et ainsi générer des défauts irréversibles de l'émail. Ces défauts sont alors traités avec des matériaux dont certains libèrent des molécules capables à leur tour de générer ces défauts, conduisant à un cercle vicieux, notamment chez la femme enceinte et le jeune enfant. Cette synthèse fait le point sur l'état des connaissances, les questions et controverses sur les facteurs environnementaux courants susceptibles d'entrer en contact avec la sphère orale, leurs mécanismes d'actions et les médiateurs impliqués dans les pathologies de l'émail associées aux conditions environnementales. <

[1]Centre de Recherche des Cordeliers, Inserm UMRS 1138, Université de Paris, Sorbonne Université, 15 rue de l'École de Médecine, 75006, Paris, France.
[2]Toxalim, INRA, Université de Toulouse, 31000 Toulouse, France.
[3]Inserm UMRS 1124, Université de Paris, 75006 Paris, France.
[4]Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France.
[5]Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS UMR 7221, 75006 Paris, France.
[6]Unité de Recherche en Biomatériaux Innovants et Interfaces EA4462, Université Paris Descartes, Montrouge ; Hôpital Henri Mondor, AP-HP, 94010 Créteil, France.
sylvie.babajko@inserm.fr

Les tissus dentaires peuvent non seulement être la cible des facteurs environnementaux mais également servir de marqueurs précoces et sont facilement accessibles et exposés à ces agents. La compréhension et la caractérisation de l'impact environnemental dans la sphère orale aidera à prévenir de multiples pathologies non seulement dans cette cavité, mais également des pathologies plus éloignées dont le lien avec l'homéostasie orale commence à peine à être exploré.

Facteurs environnementaux contaminants

La cavité orale est contaminée par une variété de facteurs environnementaux qui sont regroupés, pour certains, sous le terme de « contaminants alimentaires », lorsque les individus ne les identifient pas et subissent leurs contaminations : par exemple, les mycotoxines produites par des champignons. D'autres, nommés « toxiques », correspondent à des contaminants qui ont été consommés sciemment, en ayant connaissance de leurs effets secondaires ou de la prise de risque associé à leur consommation, comme l'alcool, le tabac, certains médicaments, voire le sucre lorsqu'il est pris en excès. La contamination d'un aliment peut également survenir au cours des différentes étapes de sa fabrication : les denrées produites peuvent en effet avoir été originellement contaminées par la présence de composés introduits involontairement dans les sols (pour les cultures) ou dans la chaîne alimentaire (pour l'élevage et la production industrielle), comme les dioxines, les biocides, les plastifiants, entre autres. Les produits phytosanitaires (ou pesticides dont les fongicides, les herbicides, les insecticides, etc.) sont, eux, communément utilisés au cours du processus de production : récolte, conservation des fruits, légumes et céréales (qui seront utilisés ou non pour l'élevage). Les procédés utilisés pour la confection des produits (fumage et cuisson) peuvent également engendrer la néo-synthèse de molécules qui s'avèrent nocives pour la santé, comme les hydrocarbures polycycliques (HAP) ou l'acrylamide, désormais identifiée comme un produit cancérogène. L'acrylamide est en effet produite par

Vignette (Photo © Inserm - Bertrand Kerebel).

réaction de glycation des produits lors de leur chauffage ou cuisson. Les processus de conditionnement, quant à eux, peuvent provoquer le transfert de bisphénols et de phtalates du produit d'emballage vers l'aliment. Tous ces xénobiotiques sont fortement suspectés d'induire des pathologies métaboliques, malignes et auto-immunes chez l'adulte, mais aussi des pathologies du développement touchant le fœtus, *via* la mère, ou le jeune enfant. La prévalence de ces pathologies non-infectieuses étant en augmentation constante depuis les dernières décennies, notamment chez les sujets jeunes, la connaissance, voire la maîtrise, de ces facteurs étiologiques apparaissent donc indispensables. Les questions qui portent sur leur capacité de perturbation et leurs mécanismes d'action au sein de la cavité orale se posent ainsi légitimement et devraient faire l'objet de recherches particulières ces prochaines années.

L'émail dentaire marqueur des conditions environnementales

Le développement dentaire et, en particulier, la synthèse de l'émail suivent une séquence d'événements moléculaires et cellulaires parfaitement ordonnés dans l'espace et le temps [1]. On distingue trois phases majeures dans l'amélogenèse[1] : la prolifération et le recrutement des cellules souches ; la secrétion, au cours de laquelle les protéines matricielles amélaires déterminent l'épaisseur de l'émail et aident à sa minéralisation ; et la maturation qui voit la quasi-totalité de ces protéines amélaires dégradées pour laisser l'espace rendu libre pour la croissance des cristaux d'apatite et la minéralisation complète de l'émail [2] (➜), tissu le plus minéralisé de l'organisme recouvrant la couronne dentaire. Lorsque ce processus s'achève, la dent est prête à faire son éruption dans la cavité orale. Les améloblastes sont perdus au cours de cette dernière étape, ce qui rend toute atteinte future de l'émail irréparable et donc irréversible. Ainsi, les perturbations exogènes touchant les améloblastes ou les régulations endogènes de leur activité et de leur survie, peuvent conduire à des stigmates amélaires, témoins de ces perturbations. Ces stigmates pourront ainsi aider à reconstituer l'historique des expositions et contaminations que les améloblastes ont subies *(Figure 1)*.

(➜) Voir la Synthèse de G. Lignon *et al.*, *m/s* n° 5, mai 2015, page 515

Le développement de chaque dent a été décrit dans le détail en fonction du temps [3]. Cela permet de définir assez précisément la fenêtre de temps d'exposition aux agents qui ont altéré sélectivement le développement de certaines dents. Le développement de l'émail dentaire s'effectue au cours des deux derniers trimestres de la vie fœtale et entre 4 et 6 ans après la naissance, soit une fenêtre de temps déterminante pour l'état de santé futur de l'adulte [4]. L'ensemble de ces caractéristiques propres et uniques de l'émail confèrent à ce tissu des propriétés de traceur d'exposition aux agents qui ont pu perturber sa synthèse, mais aussi altérer la santé d'un individu, comme cela semble le cas des perturbateurs endocriniens [5].

[1] L'amélogenèse est la synthèse, la secrétion, la minéralisation et la maturation de l'émail par les améloblastes.

Comment certains agents perturbateurs endocriniens peuvent-ils causer des défauts de l'émail ?

Le concept de « perturbateur endocrinien » a vu le jour au début des années 1990 à la suite de la conférence de Winspread[2] [6]. Des chercheurs travaillant dans deux champs disciplinaires jusqu'alors distincts, l'écotoxicologie et l'endocrinologie, ont, au cours de cette conférence, confronté leurs données et ont ainsi identifié des molécules capables d'interférer à la fois sur la santé humaine et sur l'environnement. Le répertoire de cette famille de molécules perturbatrices reste, encore aujourd'hui, mal défini et est en constante évolution ; il fait d'ailleurs l'objet d'une mission confiée à l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), dans le cadre de la deuxième stratégie nationale d'identification des perturbateurs endocriniens (SNPE2). Il existe néanmoins plusieurs listes, établies par les organisations et agences gouvernementales de par le monde (dont la TEDX List), et publications [7] qui identifient et regroupent ces molécules dont l'activité et l'impact en santé restent vivement débattus. D'après la définition de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) datant de 2002 et toujours en vigueur, les perturbateurs endocriniens (PE) sont des molécules, ou mélanges de molécules exogènes, qui sont capables d'interférer avec le système endocrinien d'un organisme ou de ses descendants. Les PE peuvent être naturels (phyto-œstrogènes, mycotoxines) ou manufacturés (retardateurs de flamme, filtres ultra-violets, pesticides, conservateurs, plastifiants, etc.). Ils sont largement utilisés par les industriels de la cosmétique, du médicament, de l'agro-alimentaire, de l'équipement et, de ce fait, ils se retrouvent aujourd'hui omniprésents dans notre environnement quotidien. Les contaminations sont majoritairement orales, à travers l'alimentation. Bien que d'usage, de structure et de fonction différents, la plupart de ces PE présentent des propriétés structurales et biochimiques qui leur permettent de franchir passivement les membranes des cellules, mais aussi la barrière placentaire, ce qui justifie les précautions particulières à prendre à l'égard des femmes enceintes. Ce point est d'autant plus important que la plupart de ces molécules sont prises en charge et inactivées par diffé-

[2] La conférence de Wingspread dans le Wisconsin a réuni 21 participants du 26 au 28 juillet 1991 ; elle est le fruit du travail de Theodora Colborn. Si le concept de perturbateur endocrinien est inventé à Wingspread en 1991, deux publications seront à l'origine de son développement : un rapport rédigé à la demande du ministère danois de l'environnement et de l'énergie en 1995 et un livre publié en 1996 par Theodora Colborn, préfacé par Al Gore, alors vice-président des États-Unis, qui aura un retentissement mondial. https://www.senat.fr/rap/r10-765/r10-76514.html

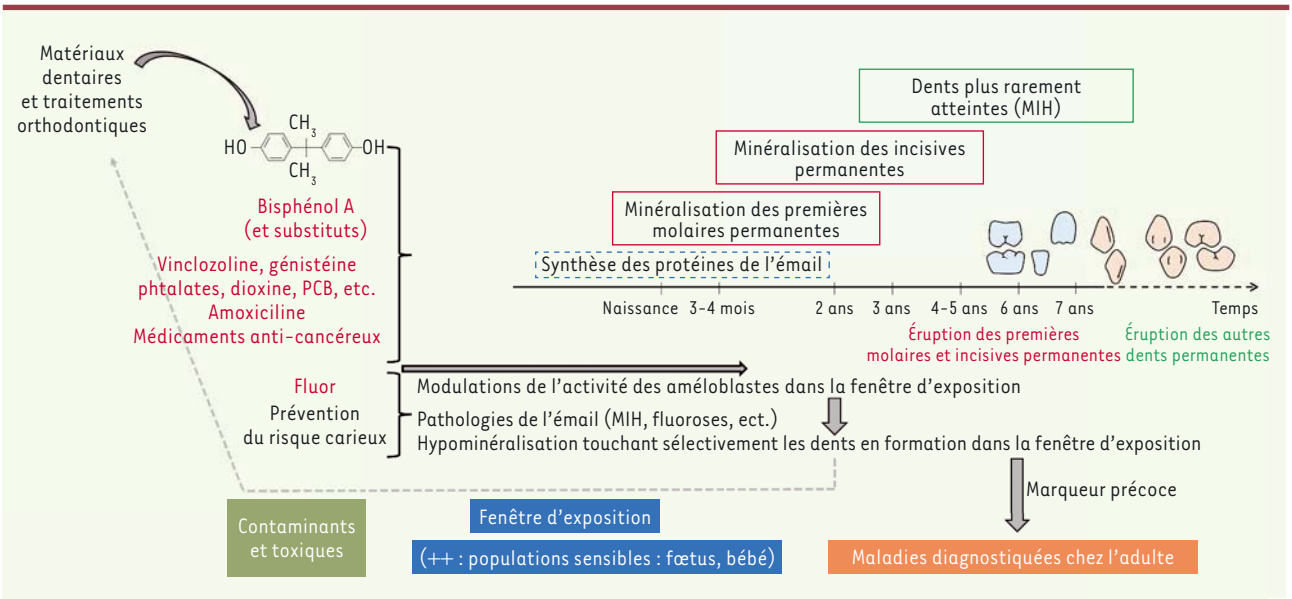


Figure 1. ***Fenêtre d'exposition et sélectivité des atteintes de l'émail dentaire.*** L'exposition à divers facteurs environnementaux peut altérer l'activité des améloblastes, cellules en charge de la synthèse de l'émail, et générer des défauts amélaires irréversibles sur les dents se formant au cours de cette période d'exposition. Le développement dentaire s'étale de la vie fœtale à 4-7 ans après la naissance, période de susceptibilité maximale aux toxiques environnementaux dont l'exposition peut être déterminante pour l'état de santé chez l'adulte. Les hypominéralisations amélaires résultantes sont traitées par des matériaux qui peuvent libérer des monomères de bisphénols pouvant à leur tour contribuer au développement de maladies. La dent peut donc servir de marqueur précoce d'exposition à ces agents.

rentes isoformes de UDP-glucuronosyl-transférases (UGT) hépatiques, des enzymes qui assurent la glucuronoconjugaison des métabolites endogènes (bilirubine, stéroïdes) et des xénobiotiques, permettant leur élimination urinaire [8]. Les PE inhibent l'activité et l'expression de ces enzymes. Et en raison de son immaturité hépatique, ils sont éliminés moins efficacement chez le fœtus que chez l'adulte [9] et se concentrent ainsi davantage dans un organisme jeune [8, 10].

Une contamination massive des populations (plus de 90 % des individus) a été mise en évidence pour les dizaines de PE les plus répandus (ou les plus recherchés) [11]. Et de nombreuses études épidémiologiques récentes établissent un lien entre le degré de contamination des populations et l'incidence de malformations du tractus génital, de l'obésité, de troubles du comportement, de certains cancers hormono-dépendants (pour ne citer que les études les plus fréquentes) [5]. L'exposition aux PE constitue d'ailleurs la principale hypothèse expliquant l'inquiétante baisse de fertilité masculine à l'échelle mondiale. Leur activité n'est plus discutée aujourd'hui dans la communauté scientifique et médicale ; elle a été largement démontrée expérimentalement. Les enjeux actuels visent à établir précisément les liens entre les résultats obtenus expérimentalement sur l'animal et les données épidémiologiques, et portent sur l'impact sanitaire des combinaisons de PE lorsqu'ils sont utilisés à faibles doses (effet cocktail). Parmi les 1 491 molécules présentant une activité de PE (référencées dans la TEDX List de Juin 2019), le bisphénol A (BPA) apparaît comme exemplaire, tant il a été étudié dans diverses conditions expérimentales et cliniques. C'est d'ailleurs une des seules molécules manufacturées non médicamenteuses classée par l'Autorité européenne de sécurité alimentaire (EFSA) comme un PE avéré pour la santé (en 2017) et l'environnement (en 2018). De nombreuses données expérimentales obtenues chez le rongeur permettent d'identifier les conséquences pathologiques liées à l'exposition au BPA, conséquences sans doute identiques chez l'homme. Ainsi, chez le rat, les défauts de l'émail d'animaux exposés au BPA à faible dose durant la vie fœtale présentent de nombreuses similarités avec l'émail des enfants présentant une hypominéralisation des molaires et incisives (MIH) [12], une pathologie de l'émail décrite seulement en 2001 [13] et dont les facteurs étiologiques demeurent encore obscurs [14]. Dans cette pathologie, les dents atteintes présentent des opacités localisées reflétant une hypominéralisation dont la sévérité peut être évaluée : les dents se développant les premières sont atteintes préférentiellement, l'émail est poreux et capable d'accumuler de l'albumine *(Figure 1)*. Les PE dont l'activité est similaire à celle du BPA s'avèrent donc des candidats intéressants comme facteurs potentiellement aptes à générer une MIH. Des études confortent cette hypothèse, notamment celles montrant des hypominéralisations de l'émail consécutives à l'exposition chronique de rongeurs à la vinclozoline, la génistéine, les phtalates ou la dioxine *(Figure 1)* [15, 16], ou associant hypominéralisations de l'émail et contaminations par

la dioxine et par les polychlorobiphényles (PCB) chez l'homme [16, 17]. La comparaison des défauts dentaires obtenus après exposition à ces différents PE révèle des caractéristiques physiopathologiques qui leur sont spécifiques, suggérant un mode d'action et des cibles cellulaires et moléculaires propres à chaque PE ou à chaque mélange de PE. Ces différences posent ainsi des questions quant à l'hétérogénéité des MIH : cette pathologie pourrait, en fait, regrouper des anomalies de l'émail différentes, affectant une variété de dents plus étendue que celle proposée initialement [18]. Cette hétérogénéité pourrait avoir pour origine des combinaisons variables d'expositions aux agents causaux, regroupant non seulement des PE mais aussi, possiblement, des antibiotiques et des médicaments dans un contexte environnemental et génétique particulier, encore inconnu, et qui favoriserait l'action de ces molécules [14, 19].

Les améloblastes expriment la plupart des récepteurs des hormones stéroïdiennes [20], ceux-là même qui sont impliqués dans les effets physiopathologiques des PE. D'ailleurs, la synthèse de l'émail est modulée par les androgènes [21] et par la vitamine D [22]. Les rétinoïdes, métabolites de la vitamine A, ont également été impliqués dans la régulation de l'amélogenèse [23]. Il a en effet été montré que des souris exposées durant la vie fœtale à un excès d'acide rétinoïque présentaient une quantité d'émail dentaire réduite et un os très altéré. La compréhension des mécanismes d'action de ces molécules perturbatrices devrait permettre de mettre fin à la controverse qui oppose chercheurs, industriels, politiques et agences sanitaires en raison d'enjeux économiques et idéologiques contradictoires [24]. En attendant un éclairage objectif, les coûts de santé en lien avec les maladies associées à l'exposition à ces PE ont été évalués [25] : la seule exposition prénatale au BPA a été identifiée comme associée probablement à 42 400 cas d'obésité de l'enfant en Europe, avec un coût global estimé à 1,54 milliard d'euros.

La cavité orale siège d'un cercle vicieux

Certains matériaux dentaires couramment utilisés en dentisterie conservatrice et pour des traitements orthodontiques libèrent des monomères de BPA *(Figure 1)* [26]. Une prise de conscience des chirurgiens-dentistes demandant aux fabricants la liste des constituants des matériaux qu'ils utilisaient, a conduit ces derniers à rechercher de nouvelles formulations et procédures d'utilisation tendant à réduire la quantité de monomères de BPA potentiellement libérés. Aucun de ces biomatériaux ne renferme de BPA à l'état pur, mais la plupart d'entre eux sont synthétisés à partir de monomères qui sont dérivés du BPA, ou à partir d'autres monomères pouvant présenter une cytotoxicité [27]. Il est donc indispensable de connaître la composition et de maîtriser les protocoles d'utilisation de ces matériaux qui sont couramment employés pour le traitement des caries, notamment dans le cas de MIH, afin de briser un cercle vicieux pouvant s'installer entre exposition du patient et traitement de ses maladies qui sont elles-mêmes associées à cette exposition, d'autant que ces molécules peuvent présenter des activités non monotones, avec des effets importants à très faibles doses [28], et passer la barrière sublinguale [29].

La découverte du passage sublingual du BPA chez le chien interroge en effet sur l'impact chronique de ce contaminant, utilisé à faibles doses, sur la cavité buccale. Elle met en évidence une possible contamination systémique à d'autres tissus cibles, *via* la circulation sanguine [5]. Ce passage sublingual peut ainsi se produire chez les individus qui ont été soignés pour des caries depuis plusieurs années avec des composites dentaires qui étaient moins contrôlés qu'aujourd'hui et manipulés selon des procédures moins bien identifiées qu'à l'heure actuelle. Ce possible passage dans la circulation sanguine pourrait expliquer les taux circulants de BPA qui s'avèrent bien supérieurs aux valeurs prédites en fonction des données moyennes de contaminations et de l'intense métabolisation du BPA en BPA glucuronide par le foie. La clairance du BPA reste néanmoins importante chez l'homme : on estime que moins de 0,5 % de la quantité ingérée accède à la circulation sanguine générale sous forme active. Mais ce pourcentage atteint près de 60 % pour le bisphénol S (BPS), un des substituts du BPA, en raison d'une absorption intestinale plus importante et surtout d'un métabolisme hépatique plus modéré [30]. La substitution du BPA par le BPS est donc préoccupante : elle risque d'accroître encore l'exposition interne des individus. Il est donc nécessaire de connaître les mécanismes d'action de ces molécules de substitution proposées par les industriels afin d'appréhender leurs possibles effets sur la santé.

Le fluor : des effets bénéfiques et des effets secondaires

Le fluor est l'une des molécules en contact chronique avec la cavité buccale. Capable de (re)minéraliser l'émail en surface et d'inhiber les énolases bactériennes à l'origine des caries, il est, de ce fait, couramment utilisé pour prévenir ces dommages. Pourtant, l'exposition à un excès de fluor peut conduire au développement de fluoroses dentaires et osseuses, des pathologies qui avaient été identifiées dès la première moitié du XXe siècle [31]. La fluorose dentaire est, comme la MIH, une pathologie du développement de l'émail, qui, comme cette dernière, provoque des tâches opaques blanchâtres à brunâtres, ce qui peut, dans certains cas, poser des problèmes de diagnostic entre les deux pathologies. La fluorose touche moins de 3 % des enfants en France, mais près de 200 millions de personnes dans le monde, réparties dans 25 pays [32]. La dose de fluor prophylactique est évaluée à 0,05 mg/kg/j. Mais une dose supérieure à 0,1 mg/kg/j expose à un risque de fluorose. Or, il est fréquent que la teneur en fluor de l'eau de boisson, notamment certaines eaux

minérales, soit comprise entre 0,3 à 0,5 mg par litre, des doses susceptibles d'induire une fluorose.

En plus de ses propriétés extracellulaires qui sont bien documentées, des données récentes rapportent des effets intracellulaires du fluor, avec la modulation d'expression de gènes dans l'épithélium dentaire, mais aussi dans d'autres tissus *(Figure 1)*. L'exposition au fluor a ainsi été associée à des effets dépassant le cadre buccal et les tissus minéralisés, dont des effets neurotoxiques et une diminution du quotient intellectuel [33, 34], des perturbations de l'axe androgénique [35] (le fluor est répertorié comme un PE dans la TEDX List), et une augmentation des processus inflammatoires [36]. L'implication des récepteurs des hormones stéroïdiennes (progestérone et androgènes) dans les mécanismes d'action du fluor sur les améloblastes [37] laisse ainsi suspecter de fortes interactions entre fluor et PE. D'ailleurs, le fluor et le BPA peuvent avoir des effets complémentaires et additionnels comme perturbateurs de l'amélogénèse [38]. Ceci pourrait expliquer l'accroissement de la sensibilité au fluor et une augmentation des fluoroses dans la population [39]. Le fluor réduit également la capacité des cellules à stocker le fer, en diminuant notamment la quantité de chaînes lourdes de ferritine [40]. Cette action sur le stockage du fer peut avoir de nombreuses conséquences sur les processus cellulaires qui l'impliquent, tels que le stress oxydant et la prolifération cellulaire. L'ensemble de ces données amène à reconsidérer la nécessité de supplémenter les individus en fluor en tenant compte de l'évolution des modes de vie et de l'accès à des aliments naturellement riches en fluor (le thé par exemple).

Conclusion

Les défauts dentaires résultant d'expositions à des agents environnementaux pourraient être utilisés comme marqueurs précoces d'exposition, voire marqueurs de pronostic de maladies associées à ces expositions et diagnostiquées plus tard, souvent durant la vie adulte, alors que les défauts dentaires sont observés dès l'enfance au moment de l'éruption dentaire. En effet, l'émail des dents temporaires est synthétisé depuis la vie fœtale et celui des dents permanentes, depuis la naissance jusqu'à l'adolescence. On sait par ailleurs que les conditions périnatales sont déterminantes pour la santé du futur adulte. L'émail dentaire pourrait donc en être le reflet très précoce. ◊

SUMMARY

Oral cavity as a target and a marker of environmental exposures: developmental dental defects

The oral cavity is one of the main route for environmental contaminations associated to many chronic diseases (cancers, fertility and behavior disorders for example) *via* alimentation, medications and respiration. These environmental factors including, among others, endocrine disruptors and excessive fluoride can disrupt dental development and thus generate irreversible enamel defects. These defects are then treated with materials that may release molecules capable of generating these defects, leading to a vicious circle, particularly in pregnant women and young children. The present paper aims to review the state of knowledge, questions and controversies on common environmental factors in contact with the oral cavity. It also reviews their mechanisms of action and the mediators involved in enamel pathologies associated with environmental conditions. Dental tissues can not only be targeted by environmental factors but can also serve as early and easily accessible markers of exposure to these agents. Understanding and characterizing the environmental impact in the oral cavity will help to prevent multiple diseases, oral and distant, whose link with oral homeostasis is just being explored. ◊

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Lacruz RS, Habelitz S, Wright JT, Paine ML. Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *Physiol Rev* 2017 ; 97 : 939-93.
2. Lignon G, de la Dure-Molla M, Dessombz A, Berdal A, Babajko S. L'émail : un autoassemblage unique dans le monde du minéral. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 515-21.
3. AlQahtani SJ, Hector MP, Liversidge HM. Brief communication: the London atlas of human tooth development and eruption. *Am J Phys Anthropol* 2010 ; 142 : 481-90.
4. Bertagnolli M, Luu TM, Lewandowski AJ, *et al*. Preterm birth and hypertension: is there a link? *Curr Hypertens Rep* 2016 ; 18 : 28.
5. Gore A, Chappell V, Fenton S, *et al*. EDC-2: The endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocr Rev* 2015 ; 36 : E1-150.
6. Colborn T. Pesticides-how research has succeeded and failed to translate science into policy: endocrinological effects on wildlife. *Environ Health Perspect* 1995 ; 103 : 81-5.
7. Karthikeyan BS, Ravichandran J, Mohanraj K, Vivek-Ananth RP, Samal A. A curated knowledgebase on endocrine disrupting chemicals and their biological systems-level perturbations. *Science Total Environm* 2019 ; 692 : 281-96.
8. Corbel T, Perdu E, Gayrard V, *et al*. Conjugation and deconjugation reactions within the fetoplacental compartment in a sheep model: a key factor determining bisphenol A fetal exposure. *Drug Metab Dispos* 2015 ; 43 : 467-76.
9. Du Z, Cao YF, Li SN, *et al*. Inhibition of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) by phthalate monoesters. *Chemosphere* 2018 ; 197 : 7-13.
10. Beszterda M, Franski R. Endocrine disruptor compunds in environment: as a danger for children health. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab* 2018 ; 24 : 88-95.
11. Pirard C, Sagot C, Deville M, Dubois N, Charlier C. Urinary levels of bisphenol A, triclosan and 4-nonylphenol in a general Belgian population. *Environ Int* 2012 ; 48 : 78-83.
12. Jedeon K, De la Dure-Molla M, Brookes SJ, *et al*. Enamel defects reflect perinatal exposure to bisphenol A. *Am J Pathol* 2013 ; 183 : 108-18.
13. Weerheijm KL, Jalevik B, Alaluusua S. Molar-incisor hypomineralisation. *Caries Res* 2001 ; 35 : 390-1.
14. Alaluusua S. Aetiology of molar-Incisor hypomineralisation: a systematic review. *Eur Arch Paediatr Dent* 2010 ; 11 : 53-8.
15. Jedeon K, Marciano C, Loiodice S, *et al*. Enamel hypomineralization due to endocrine disruptors. *Connect Tissue Res* 2014 ; 55 : 43-7.
16. Alaluusua S, Calderara P, Gerthoux PM, *et al*. Developmental dental aberrations after the dioxin accident in Seveso. *Environ Health Perspect* 2004 ; 112 : 1313-8.
17. Jan J, Sovcikova E, Kočan A, Wsolova L, Trnovec T. Developmental dental defects in children exposed to PCBs in eastern Slovakia. *Chemosphere* 2007 ; 67 : 350-4.

RÉFÉRENCES

18. Mittal N. Phenotypes of enamel hypomineralization and molar incisor hypomineralization in permanent dentition: identification, quantification and proposal for classification. *J Clin Pediatr Dent* 2016 ; 40 : 367-74.

19. Serna C, Vicente A, Finke C, Ortiz AJ. Drugs related to the etiology of molar incisor hypomineralization: a systematic review. *J Am Dent Assoc* 2016 ; 147 : 120-30.

20. Houari S, Loiodice S, Jedeon K, *et al*. Expression of steroid receptors in ameloblasts during amelogenesis in rat incisors. *Front Physiol* 2016 ; 7 : 503.

21. Jedeon K, Loiodice S, Salhi K, *et al*. Androgen receptor involvement in rat amelogenesis: an additional way for endocrine-disrupting chemicals to affect enamel synthesis. *Endocrinology* 2016 ; 157 : 4287-96.

22. Papagerakis P, Hotton D, Lezot F, *et al*. Evidence for regulation of amelogenin gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D(3) in vivo. *J Cell Biochem* 1999 ; 76 : 194-205.

23. Morkmued S, Laugel-Haushalter V, Mathieu E, *et al*. Retinoic acid excess impairs amelogenesis inducing enamel defects. *Front Physiol* 2017 ; 7 : 673.

24. Vandenberg LN, Hunt PA, Gore AC. Endocrine disruptors and the future of toxicology testing - lessons from CLARITY-BPA. *Nat Rev Endocrinol* 2019 ; 15 : 366-74.

25. Trasande L, Zoeller RT, Hass U, *et al*. Estimating burden and disease costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European union. *J Clin Endocrinol Metab* 2015 ; 100 : 1245-55.

26. Olea N, Pulgar R, Pérez P, *et al*. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 1996 ; 104 : 298-305.

27. Dursun E, Fron-Chabouis H, Attal JP, Raskin A. Bisphenol A release: survey of the composition of dental composite resins. *Open Dent J* 2016 ; 10 : 446-53.

28. Zoeller RT, Vandenberg LN. Assessing dose-response relationships for endocrine disrupting chemicals (EDCs): a focus on non-monotonicity. *Environ Health* 2015 ; 14 : 42.

29. Gayrard V, Lacroix MZ, Collet SH, *et al*. High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. *Environ Health Perspect* 2013 ; 121 : 951-6.

30. Gayrard V, Lacroix MZ, Grandin FC, *et al*. Oral systemic bioavailability of bisphenol A and bisphenol S in pigs. *Environ Health Perspect* 2019 ; 127 : 77005.

31. Fejerskov O, Larsen MJ, Richards A, Baelum V. Dental tissue effects of fluoride. *Adv Dent Res* 1994 ; 8 : 15-31.

32. Rasool A, Farooqi A, Xiao T, *et al*. A review of global outlook on fluoride contamination in groundwater with prominence on the pakistan current situation. *Environl Geochem Health* 2018 ; 40 : 1265-81.

33. Bashash M, Marchand M, Hu H, *et al*. Prenatal fluoride exposure and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) symptoms in children at 6-12 years of age in Mexico City. *Environ Int* 2018 ; 121 : 658-66.

34. Green R, Lanphear B, Hornung R, *et al*. Association between maternal fluoride exposure during pregnancy and IQ scores in offspring in Canada. *JAMA Pediatr* 2019 ; 173 : 940-8.

35. Yang L, Jin P, Wang X, *et al*. Fluoride activates microglia, secretes inflammatory factors and influences synaptic neuron plasticity in the hippocampus of rats. *Neurotoxicology* 2018 ; 69 : 108-20.

36. Duan L, Zhu J, Wang K, *et al*. Does fluoride affect serum testosterone and androgen binding protein with age-specificity? A population-based cross-sectional study in Chinese male farmers. *Biol Trace Elem Res* 2016 ; 174 : 294-9.

37. Le MH, Nakano Y, Abduweli Ugyghurturk D, Zhu L, Den Besten PK. Fluoride alters Klk4 expression in maturation ameloblasts through androgen and progesterone receptor signaling. *Front Physiol* 2017 ; 8 : 925.

38. Jedeon K, Houari S, Loiodice S, *et al*. Chronic exposure to bisphenol A exacerbates dental fluorosis in growing rats. *J Bone Miner Res* 2016 ; 31 : 1955-66.

39. Beltran-Aguilar ED, Barker L, Dye BA. Prevalence and severity of dental fluorosis in the United States, 1999-2004. *NCHS data brief* 2010 ; 53 : 1-8.

40. Houari S, Picard E, Wurtz T, *et al*. Disrupted iron storage in dental fluorosis. *J Dent Res* 2019 ; 98 : 994-1001.

TIRÉS À PART

S. Babajko

Possédées du Malin au Moyen-Âge, les sorcières hystériques sont vouées au bûcher. Enfermées au XVIIe siècle, maltraitées, elles rejoignent la Cour des Miracles de l'Hospice de la Vieillesse-Femmes à la Salpêtrière... Jusqu'à ce que le Dr Jean-Martin Charcot (1825-1893) mène le combat qui transforme l'ancien hospice en hôpital : l'École de la Salpêtrière de Paris est née, qui devient lieu de recherche, d'enseignement et de soins, de renommée internationale.

Jean Martin Charcot n'a pas bonne presse, et pourtant... Hystérie et folie traversent les siècles, prenant les formes de « l'air du temps ».

De l'utérus migrateur d'Hippocrate aux recherches neurologiques de Charcot. Du désir inconscient avec Freud à la jouissance du parlêtre chez Lacan... C'est à cette traversée historique et conceptuelle que nous convie cet ouvrage.

ISBN : 978-2-7598-1268-4 240 pages *20 €*

BON DE COMMANDE

À retourner à EDP Sciences, 17 avenue du Hoggar, 91944 Les Ulis Cedex, France
Tél. : 01 49 85 60 69 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : francois.flori@edpsciences.org

NOM : ..... Prénom : .....

Adresse : .....

Code postal : ..... Ville : .....

Pays : .....

Fonction : .....

Je souhaite recevoir
Folies à la Salpêtrière : 20 € + 3 € de port = 23 € TTC

en ..... exemplaire, soit un total de ..... €

❒ Par chèque, à l'ordre de EDP Sciences

❒ Par carte bancaire : ❒ Visa ❒ Eurocard/Mastercard

Carte n° |_|_|_|_| |_|_|_|_| |_|_|_|_| |_|_|_|_|

Date d'expiration : |_|_| |_|_| N° de contrôle au dos de la carte : |_|_| |_|_| Signature :

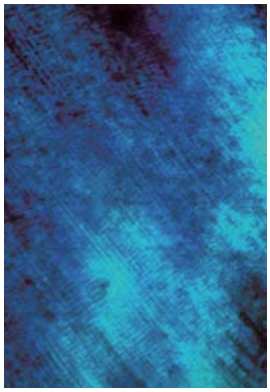
médecine/sciences 2020 ; 36 : 231-4

La sphère orale, cible et marqueur de l'exposition environnementale

II. Maladies diagnostiquées chez l'adulte

Sylvie Babajko[1], Géraldine Lescaille[2], Loredana Radoï[3], Ai Thu Bui[1], Vanessa Baaroun[4], Emile Boyer[5], Sandrine Delbosc[6], Hélène Chardin[7], Robert Barouki[8], Xavier Coumoul[8]

> La cavité buccale est l'une des voies majeures des contaminations environnementales connues pour être impliquées dans de nombreuses maladies chroniques *via* l'alimentation, les médications ou même la respiration. D'autres facteurs peuvent également influer sur l'environnement oral, certains endogènes, comme le microbiote, les variations hormonales, la salive, d'autres exogènes, comme les biomatériaux dentaires et les agents pathogènes. Cette synthèse fait le point sur l'état des connaissances, les questions et controverses sur les facteurs environnementaux courants au contact de la sphère orale impliqués dans les maladies de la cavité orale diagnostiquées chez l'adulte telles que les cancers des voies aéro-digestives supérieures, les ostéonécroses des mâchoires, et les parodontites, ces dernières pouvant d'ailleurs être directement liées à des pathologies systémiques comme les accidents vasculaires cérébraux, la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Crohn notamment. La caractérisation des impacts environnementaux sur le microbiote oral, la salive, l'émail dentaire peut servir de marqueur pronostic précoce des maladies diagnostiquées ultérieurement, en lien avec ces expositions. <



[1]Centre de Recherche des Cordeliers, Inserm UMRS 1138, Université de Paris, Sorbonne Université, 15 rue de l'École de Médecine, 75006, Paris, France.
[2]Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, Inserm UMRS 1135, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Université de Paris, Sorbonne Université, 75013 Paris, France.
[3]Centre de Recherche en Épidémiologie et Santé des Populations, Inserm UMSR 1018, Université de Paris, Sorbonne Université, France.
[4]Hôpital Pitié-Salpétrière, 75013 Paris, France.
[5]Inserm, INRA, Université Rennes 1, Université Bretagne Loire, CHU de Rennes, Nutrition Metabolisms and Cancer, 35000 Rennes, France.
[6]Inserm U1148, Paris, France.
[7]UMR 8231 Chimie, Biologie, Innovation, CNRS-ESPCI Université Paris Descartes, laboratoire des Sciences Analytiques, Bioanalytiques et Miniaturisation, Paris, France.
[8]Inserm UMRS 1124, Université de Paris, Paris, France.
sylvie.babajko@inserm.fr

Les cancers des voies aérodigestives supérieures

Avec environ 16 900 cas incidents et 4 880 décès en 2018 en France, les cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) représentent un vrai enjeu de santé publique. Si la majorité de ces cancers (environ 80 %) est due à des habitudes de vie (tabac, alcool, alimentation déséquilibrée, comportements sexuels à risque[1] [1], le rôle des expositions environnementales (y compris en milieu professionnel) est moins bien connu. Parmi les nombreux agents physiques, chimiques ou biologiques présents dans l'environnement quotidien et professionnel, le rôle de certains d'entre eux dans la cancérogenèse des VADS est avéré : rayonnements ultraviolets pour la lèvre, radiations ionisantes pour les glandes salivaires, amiante et brouillards d'acides minéraux forts pour le larynx, formaldéhyde et virus d'Epstein-Barr pour le nasopharynx, et papillomavirus humain de type 16 pour l'oropharynx [2]. La vaccination préventive contre les papillomavirus fait actuellement ses preuves, non seulement contre les cancers génitaux concernés mais aussi contre les cancers des VADS [3,4].

Les cancers de l'oropharynx sont cependant en augmentation au niveau mondial, avec une population émergente de patients jeunes de moins de 50 ans, dont certains se révèlent ni alcooliques, ni tabagiques, ni infectés par le papillomavirus [5]. La compréhension de

Vignette (Photo © Inserm - Bertrand Kerebel).
[1] Rapports non protégés, partenaires multiples.

l'impact des expositions environnementales, notamment professionnelles, permettrait de prévenir un nombre important de cancers des VADS. Une augmentation de la prévalence en lien avec l'environnement, notamment chez les sujets jeunes, a été rapportée pour d'autres pathologies chroniques, telles que le diabète de type 2, la maladie de Crohn (une maladie inflammatoire du tube digestif) et certains cancers. L'augmentation de l'incidence de nombreux cancers (dont les cancers oraux) chez les jeunes (et notamment chez les femmes entre 25 et 39 ans) au cours des derniers décennies ne peut pas s'expliquer que par des facteurs génétiques. Elle pourrait en effet être liée à l'évolution des conditions environnementales et des habitudes de vie (incluant l'exposition à des carcinogènes environnementaux, l'alimentation, l'obésité) et certains agents infectieux [6].

Biphosphonates et ostéonécroses des mâchoires ?

Certains agents médicamenteux peuvent avoir des effets secondaires indésirables sur la sphère orale. Parmi ceux-ci, les biphosphonates présentent des effets très discutés et sans doute spécifiques à la sphère orale *(Figure 1)*. Les biphosphonates sont utilisés dans la prévention de l'ostéoporose, mais certains de leurs effets secondaires sur l'ostéonécrose des mâchoires, décrits en 2003 pour la première fois [7], ont conduit à débattre de leur utilisation. Ces événements rares peuvent en fait survenir indépendamment de la prise de ces médicaments, mais ils semblent plus fréquents chez les femmes traitées, en particulier chez celles subissant une intervention orale, telle qu'une extraction dentaire [8, 9]. Des publications récentes montrent les effets cellulaires des différents biphosphonates également utilisés dans la thérapie des cancers du sein, de la prostate, des lymphomes et des ostéosarcomes notamment [10], et apportent un éclairage nouveau sur leur possible implication dans les effets secondaires observés. Ces effets secondaires sur l'ostéonécrose des mâchoires semblent associés à des activités anti-angiogéniques de ces molécules *via* la voie de signalisation induite par le PDGF (*platelet-derived growth factor*) [11]. Reste à comprendre pourquoi l'os des mâchoires est spécifiquement ciblé et non d'autres os des squelettes axial et appendiculaire[2].

Le microbiote oral à l'origine de certaines pathologies ?

L'impact environnemental sur la santé repose sur l'implication de cibles moléculaires jouant le rôle de médiateurs directs ou indirects des agents environnementaux à l'origine des perturbations que l'on observe. Ces médiateurs peuvent être des récepteurs d'hormones, de neurotransmetteurs ou de facteurs de croissance, des canaux ioniques, qui stimulent les cellules afin qu'elles s'adaptent aux conditions auxquelles elles sont confrontées. Un élément constitutif de la cavité buccale, en plus des cellules et des tissus la constituant, est le microbiote oral *(Figure 1)*. Il s'agit d'une communauté de bactéries riche et diversifiée comptant plus de 1 500 espèces identifiées à ce jour. C'est un constituant majeur de la santé bucco-dentaire. Le microbiote oral est propre à chaque individu, puisqu'on dénombre 250 à 300 espèces de bactéries par individu qui colonisent les surfaces muqueuses de la bouche (langue, gencive, palais) ou minéralisées (surface amélaire), à l'interface entre la dent et le parodonte, ou dans la salive, que ce soit dans un état sain ou pathologique. Moins de 5 % des bactéries de ce microbiote oral identifiées à ce jour s'avèrent pathogènes [12], mais leur proportion par rapport aux bactéries associées à un état sain constitue une signature des parodontites [13]. Aujourd'hui, les états de déséquilibres entre l'hôte et son microbiote buccal à l'origine des maladies carieuse et parodontale sont de mieux en mieux caractérisés. Cependant, s'il est admis que le réservoir bactérien que constitue la cavité buccale représente une source d'infections pour des tissus distants, le rôle du microbiote buccal dans ces affections à distance reste discuté. Les populations bactériennes buccales, leurs métabolites et leurs facteurs de virulence, sont susceptibles d'entraîner une inflammation locale, dont la chronicité aboutit à une réponse immunitaire qui pourra exacerber, à distance, une pathologie d'organe. Inflammation, réponse immunitaire et microbiote se rejoignent ainsi dans un cercle vicieux. Les maladies parodontales, associées à une charge bactérienne importante et à une défaillance du système immunitaire, sont ainsi des facteurs de comorbidité de différentes maladies d'organes, comme les maladies pulmonaires et rénales. Elles ont également été associées à la polyarthrite rhumatoïde, à la maladie d'Alzheimer, à la maladie de Crohn et aux maladies cardio-vasculaires.

Un nombre croissant d'études cliniques suggère que la maladie parodontale aggrave également l'issue des accidents vasculaires cérébraux (AVC) [14, 15]. Cependant, les mécanismes sous-jacents restent mal connus. Les saignements gingivaux répétitifs caractéristiques de cette maladie entraînent une bactériémie retrouvée fréquemment, bien que cliniquement silencieuse, avec l'entrée de pathogènes parodontaux, tels que *Porphyromonas gingivalis*, dans la circulation sanguine. Lors de la restauration du flux sanguin, ou reperfusion, dans le cerveau ischémique à l'issue d'un AVC, la présence de cette bactérie dans la circulation pourrait perturber les fonctions cellulaires impliquées dans les processus de réparation du cerveau, notamment à cause des protéases produites par la bactérie, les gingipaïnes, dont on sait qu'elles sont capables de provoquer la protéolyse de certains récepteurs immunorégulateurs présents à la surface des cellules immunitaires et de certaines cellules stromales, ce qui pourrait affecter la récupération de l'AVC chez les patients atteints de maladie parodontale [16].

[2] Squelette constitué des os des membres.

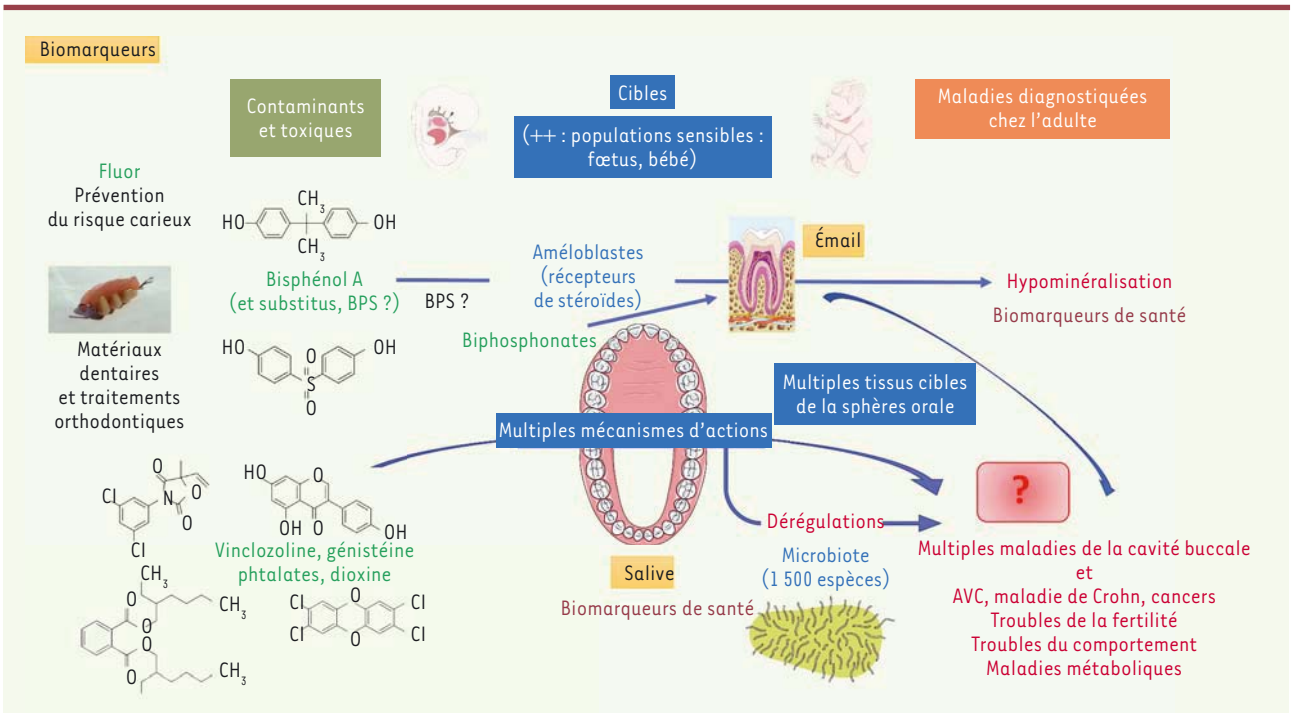


Figure 1. ***Les tissus de la sphère orale à la fois cibles et marqueurs d'exposition aux facteurs environnementaux.*** De nombreux facteurs environnementaux, dont des perturbateurs endocriniens et le fluor en excès, présents dans l'alimentation ou libérés par certains matériaux dentaires, peuvent irréversiblement altérer le développement de l'émail. De même, l'exposition chronique aux facteurs environnementaux identifiés (biphosphonates) ou supposés (HAP, perturbateurs endocriniens, etc.) peut conduire à des maladies de la cavité buccale (ostéonécroses, cancers, maladies dentaires, parodontites, etc.). La composition de la salive et celle du microbiote oral pourraient s'en trouver modifiées. Or, certains éléments pathogènes (*Porphyromonas gingivalis*) ont été associés à de multiples pathologies d'organe (AVC, maladie de Crohn, etc.). Compte tenu des caractéristiques spécifiques de l'émail et de la salive, les défauts dentaires et salivaires résultant de l'exposition aux toxiques environnementaux peuvent servir de marqueur de santé.

La cavité buccale marqueur d'exposition environnementale ?

Les maladies dentaires du développement (MIH[3] et fluoroses) et post-éruptives (dont la carie) sont extrêmement fréquentes [17,25] (➜). Elles résultent pour la très large majorité d'entre elles d'expositions à des agents environnementaux altérant l'émail [18-20], et à de mauvaises habitudes de vie *(Figure 1)*. Ces altérations irréversibles qui sont des marqueurs de santé générale, pourraient être utilisées comme marqueurs précoces d'exposition, voire comme des marqueurs de pronostic de maladies qui y sont associées et qui sont diagnostiquées tardivement [21].

(➜) Voir la Partie 1 page 225 de ce numéro

La salive est un autre constituant de la cavité buccale qui fait l'objet d'un intérêt croissant en tant que biomarqueur de santé. C'est un fluide biologique facile d'accès qui pourrait être utilisé comme substitut aux prélèvements sanguins, car moins invasif. La salive est constituée des produits de secrétion des glandes salivaires (facteurs de croissance, hormones notamment) et du fluide gingival, dont la composition est semblable à celle du plasma. L'utilisation de ce fluide buccal comme outil de diagnostic suscite donc un grand engouement. D'une part, le suivi de marqueurs biologiques, par ailleurs identifiés, pourrait permettre d'évaluer la réponse immunitaire muqueuse (secrétion d'immunoglobulines A [IgA], par exemple) avec un intérêt en allergologie notamment [22]. D'autre part, le développement de la métabolomique salivaire pourrait aider à identifier de nouveaux biomarqueurs comme outils de diagnostic. Cette approche est d'ailleurs explorée dans le cadre du cancer du sein [23] ou de cancers affectant directement la sphère orale, tels que les cancers des VADS [24].

Conclusion

Les tissus de la sphère orale, qu'ils soient minéralisés ou non, peuvent être la cible de multiples facteurs environnementaux dont l'exposition chronique peut conduire à un état pathologique. La compréhension et la caractérisation de l'impact environnemental dans la

[3] Hypominéalisation des molaires et des incisives.

sphère orale aidera à prévenir de multiples maladies non seulement de la cavité orale, mais également des maladies plus éloignées dont le lien avec la cavité orale n'a été établi que récemment. ◊

SUMMARY

Oral cavity as a target and a marker of environmental exposures: diseases diagnosed during adulthood

The oral cavity is one of the main route for environmental contaminations associated to many chronic diseases *via* alimentation, medications and respiration. Other factors may also impact the oral environment, some of them are endogenous, like microbiota, hormones and saliva, and others are exogenous, like dental materials and pathogens. The present report aims to review the state of knowledge, questions and controversies on common environmental factors in contact with the oral cavity involved in oral diseases of adults such as oral carcinomas, jaw osteonecrosis and parodontitis, the last being associated with systemic diseases such as ischemic stroke, Alzheimer's and Crohn's diseases. The characterization of environmental impact on oral microbiota, saliva, tooth enamel may be used as early marker of diseases resulting from these exposures and diagnosed later. ◊

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Marant-Micallef C, Shield KD, Vignat J, *et al*. Nombre et fractions de cancers attribuables au mode de vie et à l'environnement en France métropolitaine en 2015 : résultats principaux. *Bull Epidémiol Hebd* 2018 ; 21 : 442-8.
2. Cogliano VJ, Baan R, Straif K, *et al*. Preventable exposures associated with human cancers. *J Natl Cancer Inst* 2011 ; 103 : 1827-39.
3. Mehanna H, Bryant TS, Babrah J, *et al.* Human papillomavirus (HPV) vaccine effectiveness and potential herd immunity for reducing oncogenic oropharyngeal HPV16 prevalence in the UK - a cross-sectional study. *Clin Infect Dis* 2019 ; 69 : 1296-302.
4. Lazcano-Ponce E, Salmerón J, González A, *et al*. Prevention and control of neoplasms associated with HPV in high-risk groups in Mexico City: The Condesa Study. *Salud Publica Mex* 2018 ; 60 : 703-12.
5. Emmett S, Jenkins G, Boros S, *et al*. Low prevalence of human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinoma in Queensland, Australia. *ANZ J Surg* 2017 ; 87 : 714-9.
6. Kehm RD, Yang W, Tehranifar P, Terry MB. 40 Years of change in age - and stage-specific cancer incidence rates in US women and men. *JNCI Cancer Spectr* 2019 ; 3 : pkz038.
7. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 2003 ; 61 : 1115-7.
8. Wotton CJ, Green J, Brown A, *et al.* Use of oral bisphosphonates and risk of hospital admission with osteonecrosis of the jaw: Large prospective cohort study in UK women. *Bone* 2019 ; 124 : 69-74.
9. Watts NB, Grbic JT, Binkley N, *et al.* Invasive oral procedures and events in postmenopausal women with osteoporosis treated with denosumab for up to 10 years. *J Clin Endocrinol Metab* 2019 ; 104 : 2443-52.
10. Eleutherakis-Papaiakovou E, Bamias A. Antiresorptive treatment-associated ONJ. *Eur J Cancer Care* 2017 ; 26.
11. Adornato MC, Morcos I, Rozanski J. The treatment of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws with bone resection and autologous platelet-derived growth factors. *J Am Dent Assoc* 2007 ; 138 : 971-7.
12. Pérez-Chaparro PJ, Gonçalves C, Figueiredo LC, *et al*. Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. *J Dent Res* 2014 ; 93 : 846-58.
13. Meuric V, Le Gall-David S, Boyer E, *et al*. Signature of microbial dysbiosis in periodontitis. *Appl Environ Microbiol* 2017 ; 83 : e00462-17.
14. Pussinen PJ, Alfthan G, Jousilahti P, *et al*. Systemic exposure to Porphyromonas gingivalis predicts incident stroke. *Atherosclerosis* 2007 ; 193 : 222-8.
15. Sen S, Chung M, Duda V, *et al*. Periodontal disease associated with aortic arch atheroma in patients with stroke or transient ischemic attack. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2017 ; 26 : 2137-44.
16. Delbosc S, Rouer M, Alsac JM, *et al*. High-density lipoprotein therapy inhibits Porphyromonas gingivalis-induced abdominal aortic aneurysm progression. *Thromb Haemost* 2016 ; 115 : 789-99.
17. Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, *et al*. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet* 2019 ; 394 : 261-72.
18. Alaluusua S. Aetiology of molar-incisor hypomineralisation: a systematic review. *Eur Arch Paediatr Dent* 2010 ; 11 : 53-8.
19. Jedeon K, Houari S, Loiodice S, *et al*. Chronic exposure to bisphenol A exacerbates dental fluorosis in growing rats. *J Bone Miner Res* 2016 ; 31 : 1955-66.
20. Silva MJ, Scurrah KJ, Craig JM *et al.* Etiology of molar incisor hypomineralization: a systematic review. *Community Dent Oral Epidemiol* 2016 ; 44 : 342-53.
21. Houari S, Picard E, Wurtz T, *et al*. Disrupted iron storage in dental fluorosis. *J Dent Res* 2019 ; 98 : 994-1001.
22. Chardin H, Mercier K, Frydman C, Vollmer N. Surface plasmon resonance imaging: a method to measure the affinity of the antibodies in allergy diagnosis. *J Immunol Methods* 2014 ; 405 : 23-8.
23. Porto-Mascarenhas EC, Assad DX, Chardin H, *et al*. Salivary biomarkers in the diagnosis of breast cancer: A review. *Crit Rev Oncol Hematol* 2017 ; 110 : 62-73.
24. Guerra EN, Acevedo AC, Leite AF, *et al*. Diagnostic capability of salivary biomarkers in the assessment of head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 2015 ; 51 : 805-18.
25. Babajko S, Gayrard V, Houari S, *et al*. La sphère orale, cible et marqueur de l'exposition environnementale. I. Défauts du développement dentaire. *Med Sci (Paris)* 2020 ; 36 : 225-30.

TIRÉS À PART

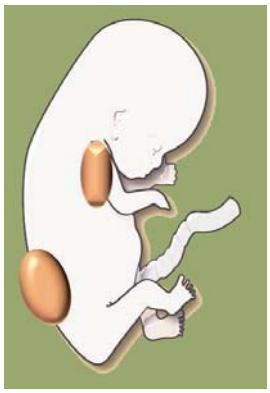
S. Babajko

médecine/sciences 2020 ; 36 : 235-42

Les syndromes de surcroissance segmentaire et les stratégies thérapeutiques

Quitterie Venot[1], Guillaume Canaud[1-3]

> Les syndromes de surcroissance sont un groupe de pathologies caractérisées par une croissance excessive généralisée ou segmentaire. Les syndromes de surcroissance segmentaires sont principalement dus à des anomalies génétiques apparaissant durant l'embryogenèse et aboutissant à un mosaïcisme. Le nombre de patients atteints d'un syndrome de surcroissance avec une mutation identifiée a fortement augmenté grâce à des avancées récentes en génétique moléculaire, en utilisant le séquençage de nouvelle génération (NGS). Cette revue détaille les différents syndromes de surcroissance segmentaire ainsi que les voies moléculaires impliquées et les options thérapeutiques envisageables. <



[1]Inserm U1151, Institut Necker Enfants Malades, 75015 Paris, France.
[2]Service d'Hypercroissance Pathologique, Hôpital Necker-Enfants Malades, AP-HP, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France.
[3]Université de Paris, Paris, France.
guillaume.canaud@inserm.fr

La régulation de la croissance tissulaire

La croissance d'un individu est un phénomène extrêmement complexe qui nécessite d'être finement régulé. Elle peut être influencée par de nombreux facteurs tels que l'environnement ou les déterminants génétiques.
Au niveau des tissus, la croissance est régulée par des hormones et des facteurs de croissance qui vont activer, à la membrane des cellules, des voies de signalisation intracellulaire [1]. La croissance peut se décomposer en plusieurs étapes. Tout d'abord, un effecteur moléculaire est produit (souvent une hormone ou un facteur de croissance) et libéré. Celui-ci va ensuite se lier à son récepteur spécifique à la surface cellulaire et déclencher la production de seconds messagers qui vont activer une cascade de signalisation permettant la transmission de l'information dans le noyau. Enfin, les différentes protéines permettant la régulation des voies de différenciation, de croissance et de prolifération cellulaire sont produites.

Mosaïcisme et surcroissance

Les syndromes de surcroissance segmentaire sont liés à un phénomène appelé mosaïcisme segmentaire. Celui-ci se produit lorsqu'une cellule acquiert une mutation durant l'embryogenèse, après la fécondation, qui va affecter la régulation de la croissance tissulaire [2]. Les cellules, présentant ou non la mutation, continuent de se diviser durant le développement de l'embryon afin de former les différents organes et tissus de l'organisme. Ce phénomène aboutira à la formation d'un individu possédant deux populations cellulaires génétiquement distinctes, chez lequel la pathologie liée à la mutation n'affectera que certaines parties du corps *(Figure 1)*. Ce mécanisme est appelé mosaïcisme segmentaire de type 1 [3]. Il existe un second type de mosaïcisme segmentaire. Le mosaïcisme segmentaire de type 2 correspond, lui, à un organisme portant une mutation post-zygotique, secondaire à un allèle muté hérité d'un parent hétérozygote. Il en résulte un individu présentant une mutation bi-allélique dans un certain nombre de cellules *(Figure 1)*. Si la mutation hétérozygote est à l'origine d'une pathologie, le mosaïcisme segmentaire entraînera alors une aggravation localisée des symptômes.
La surcroissance peut être due soit à un accroissement de la taille des cellules (ou hypertrophie cellulaire), soit à une augmentation de la prolifération cellulaire (ou hyperplasie). La gravité des symptômes dépend en fait du gène qui porte la mutation et de son importance dans les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la croissance, de la survie et/ou de la prolifération cellulaires. Les atteintes cliniques dépendent donc de l'impact de la mutation sur la fonction de la protéine atteinte, mais aussi de la localisation et de la temporalité de l'apparition post-zygotique de cette mutation : plus la mutation apparaît tardivement au cours de l'embryogénèse, plus le niveau de mosaïcisme sera faible, mais cela n'est pas toujours corrélé à la gravité du phénotype.

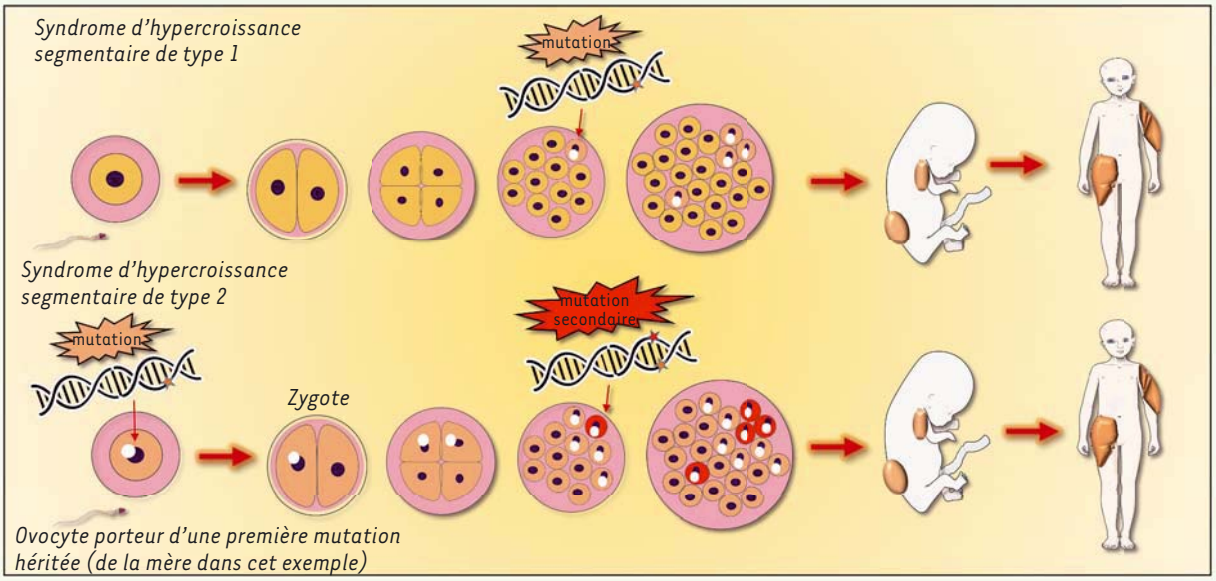


Figure 1. ***Mécanismes aboutissant au syndrome d'hypercroissance segmentaire.*** Le mosaïcisme peut avoir comme origine de deux mécanismes. Le mosaïcisme segmentaire de type 1 est issu d'une mutation qui survient pendant le développement embryonnaire dans une cellule et qui se transmet à la lignée cellulaire issue de cette cellule mère. Le mosaïcisme segmentaire de type 2 provient d'une mutation post-zygotique secondaire à un allèle muté hérité d'un parent hétérozygote (d'un spermatozoïde ou d'un ovocyte porteur de la première mutation).

Les récentes avancées technologiques dans le domaine du séquençage de génome entier ont permis le développement de nouveaux outils et techniques qui permettent dorénavant d'étudier le mosaïcisme dans de nombreux tissus avec plus de précision. Le diagnostic et la détection de mutations n'affectant que certaines cellules de l'organisme peut s'avérer particulièrement difficile. Une mutation peut également ne pas être retrouvée dans les échantillons sanguins qui sont traditionnellement utilisés dans les méthodes de séquençage. Les techniques plus récentes, comme le séquençage de nouvelle génération (NGS, ou séquençage haut débit) ou le séquençage de cellule unique, permettent désormais de détecter des niveaux de mosaïcisme très faibles, jusqu'à 1 %, et un certain nombre de gènes et de voies de signalisation impliqués dans les syndromes de surcroissance segmentaire ont ainsi pu être identifiés.

La voie des PI3-kinases

La voie de signalisation des PI3-kinases (phosphoinositide 3-kinases, PI3K) est une des principales voies qui participe à la régulation de la croissance cellulaire. Ces kinases transmettent les signaux provenant de nombreux récepteurs exprimés par la cellule, comme les récepteurs à tyrosine kinase (RTK) ou les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR).

Les PI3-kinases constituent une vaste famille d'enzymes qui ont pour rôle la phosphorylation des phospholipides membranaires, ou phosphoinositides, au niveau de l'inositol. Chez l'homme, la famille des PI3-kinases est composée de huit membres qui sont regroupés en trois classes selon leur structure, leur régulation et leur substrat : la classe I (composées de deux sous-familles Ia et Ib), la classe II et la classe III.

La première PI3-Kinase qui a été identifiée il y a plus de 30 ans par L. Cantley et ses collaborateurs, est la PI3-Kinase de classe Ia [4]. Elle est activée par l'insuline et d'autres facteurs de croissance. Elle catalyse la conversion du phosphatidylinisotol (3,4)-bisphosphate (PIP2) en phosphatidylinisotol (3,4,5)-triphosphate (PIP3). Les niveaux de ces seconds messagers lipidiques sont, en fait, strictement contrôlés par un équilibre établi entre les PI3-kinases, qui les synthétisent, et les phosphatases, qui les hydrolysent de façon spécifique [5] (➜).

(➜) Voir la Synthèse de J. Viaud et B. Payrastre, m/s n° 11, novembre 2015, page 996

L'un des principaux régulateurs négatifs de cette voie est la phosphatase PTEN (*phosphatase and TENsin homolog*) qui déphosphoryle le PIP3.

Le PIP3 joue un rôle important dans la signalisation cellulaire. Il permet le recrutement à la membrane de la cellule de nombreuses protéines, toutes présentant un motif particulier : le domaine PH (*Pleckstrin homology*). Parmi ces protéines, l'une des plus étudiées est la sérine/thréonine kinase AKT (ou protéine kinase B). La liaison d'AKT au PIP3 entraîne la phosphorylation au niveau de la thréonine en position 308 (Thr308) de la protéine par une autre kinase, la *phosphatidylinositol*

3-dependent kinase 1 (PDK1), puis la phosphorylation sur la sérine en position 473 (Ser473) par mTORC2 (*mechanistic target of rapamycin complex 2*). Ainsi activée, AKT favorise la prolifération, la taille et la survie de la cellule, notamment *via* mTOR. L'importance de cette signalisation est soulignée par le fait que des mutations activatrices de gènes impliqués dans cette voie, sont responsables de nombreuses pathologies humaines. De telles altérations sont en effet retrouvées dans de multiples cancers (25 à 40 % des cancers du sein, 30 % des cancers colorectaux). Certaines de ces mutations ont été identifiées, en 2012, dans des cas d'hypertrophie segmentaire non cancéreuse. Ces mutations apparaissent à un stade post-zygotique, durant le développement embryonnaire, et sont à l'origine de syndromes dits en mosaïque.

Les syndromes de surcroissance liés au gène *PIK3CA*

Dans la plupart des cas où une mutation a été identifiée, les syndromes de surcroissance segmentaires sont liés à des mutations affectant des gènes codant différents acteurs de la voie PI3K-AKT-mTOR *(Figure 2)*. Il est probable que des mutations germinales fortement activatrices de ces gènes soient majoritairement létales ; il n'existe en effet que de très rares cas répertoriés de mutations activatrices germinales touchant les gènes *PIK3CA* et *AKT1* [6]

Lors d'une conférence de consensus organisé par les *National Institutes of Health* (NIH) en 2014, les syndromes de surcroissance associés à des mutations du gène *PIK3CA* ont été regroupées dans une entité appelée PROS (*PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum*) [7]. Au cours de cette conférence, l'étude de 35 patients présentant des syndromes d'hypertrophie et des activations mosaïques du gène *PIK3CA* a en effet permis de regrouper un large spectre de syndromes déjà cliniquement décrits dans cette entité. Sous le terme syndrome de PROS ont ainsi été rassemblées plusieurs pathologies : le FAO (*fibroadipiose overgrowth*), la HHML (*hemihyperplasia-multiple lipomatosis*), la DMEG (*dysplatic megalencephaly*), le MCAP (*megalencephaly-capillary malformation*), le CLOVES (*congenital lipomatous asymetric overgrowth of the trunk with lymphatic, capillary, venous, and combined-type vascular malformations, epidermal naevi, scoliosis/skeletal and spinal anomalies*, OMIM[1] #613089) et, plus récemment, le syndrome K-T (ou Klippel-Trenaunay, OMIM #149000) qui a été inclus en 2016. Il s'agit donc d'une entité regroupant des patients présentant des phénotypes très divers et de gravité extrêmement variable, allant d'une simple macrodactylie isolée aux symptômes plus sévères retrouvés chez les patients CLOVES (scoliose, malformations vasculaires, malformations lipomateuses, etc.), ce qui contribue à la difficulté du diagnostic. La variabilité de la gravité des symptômes retrouvés dans le syndrome de PROS ne semble pas dépendre du type de la mutation. Elle ne paraît pas non plus être corrélée au pourcentage de mosaïcisme des patients. Elle s'avère plutôt liée au contexte cellulaire et temporel dans lequel la mutation apparaît.

Le gène *PIK3CA,* localisé sur le chromosome 3 à la position q26.32, code la sous-unité catalytique p110α de la PI3-kinase de classe Ia. Cette kinase est constituée de deux sous-unités : la sous-unité catalytique p110 (α, β, ou δ) et une sous-unité régulatrice, p85 α ou β, ou des variants appelés p50 α ou p55 β ou γ. La sous-unité p110α comporte 5 domaines protéiques : le domaine adaptateur de liaison (domaine ABD), le domaine de liaison à la protéine Ras (domaine RBD), le domaine C2, le domaine hélicoïdal et le domaine kinase. Les interactions entre les domaines ABD, C2, hélicoïdal, kinase et les différents domaines de la sous-unité régulatrice permettent de moduler l'activité de la p110α. Jusqu'à présent, une trentaine de mutations activatrices du gène *PIK3CA* ont été rapportées dans le syndrome de PROS. Elles sont disséminées sur toute la longueur du gène. On retrouve en particulier des mutations du glutamate 545 (Glu545), au niveau du domaine hélicoïdal, et de l'histidine 1047 (His1047), proche du site catalytique, qui sont part ailleurs des sites « *hotspots* » de mutations dans de nombreux cancers. Mais étonnement, les patients présentant un syndrome de PROS ne semblent pas être prédisposés à l'apparition de cancers. Ceci pourrait être dû à des différences de tissus affectés par la mutation dans les deux pathologies. En effet, les patients PROS sont particulièrement affectés au niveau de tissus issus de l'ectoderme (système nerveux, peau, etc.) et du mésoderme (muscle, derme, tissus adipeux, etc.) et on retrouve peu d'altérations génétiques dans les tissus issus de l'endoderme, qui sont eux principalement affectés par les cancers associés à des mutations de *PIK3CA.*

Jusqu'à récemment, il n'existait aucun modèle animal pour comprendre précisément la physiopathologie du syndrome de PROS. Plusieurs approches ont été suivies par différentes équipes afin de développer un modèle chez la souris. L'induction ubiquitaire de la mutation de *PIK3CA,* touchant l'histidine 1047 (H1047R) de la sous-unité p110α, aux jours embryonnaire E9.5-10.5 entraîne la mort de l'animal *in utero* [8]. Son induction spécifique dans certains tissus ou feuillets au cours de l'embryogenèse a été testée dans le mésoderme [9], dans les cellules endothéliales [9-11] et dans les cellules neurales [12], et les surexpressions qui en résultent ont permis de retrouver certains phénotypes du syndrome tels que des malformations vasculaires ou l'augmentation de la taille du cerveau. La mutation H1047R, induite de manière ubiquitaire ou sous tamoxifène, entraîne une augmentation de poids avec une organomégalie, une hypoglycémie, une augmentation générale de la vascularisation, ainsi qu'une mortalité précoce [13]. Ces différentes approches ont donc permis de

[1] *Online Mendelian Inheritance in Man* : base de données répertoriant les gènes et phénotypes associés.

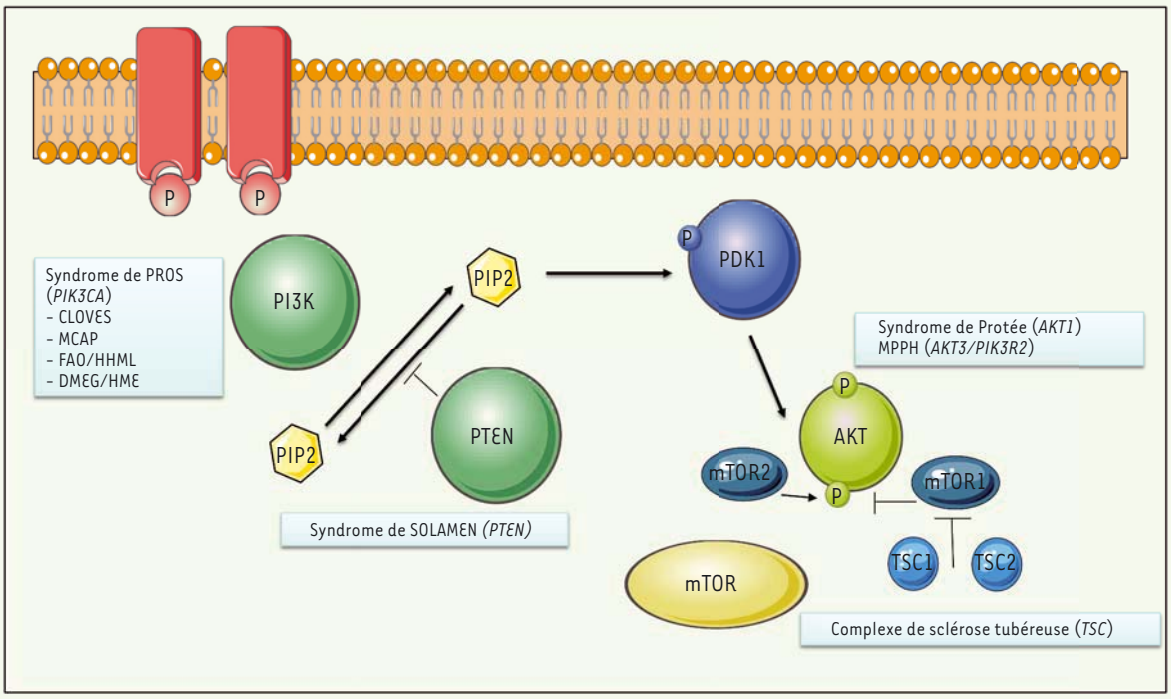


Figure 2. ***Les syndromes d'hypercroissance segmentaire liés à la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR.*** Des mutations activatrices dans les gènes des différents acteurs moléculaires de la voie de la PI3Kinase *(PIK3CA, PIKR2, PTEN, AKT1, AKT2* et *TSC*) peuvent entraîner des syndromes hypertrophiques. DMEG : *dysplastic megalencephaly* ; FAO : *fibroadipose overgrowth* ; HHML : *hemihyperplasia multiple lipomatosis* ; HME : *hemimegalencephaly ;* MCAP : *megalencephaly-capillary malformation* ; MPPH : *megalencephaly–polymicrosyria–polydactyly–hydrocephalus*.

reproduire une partie des lésions retrouvées chez les patients. Cependant aucune n'a modélisé l'ensemble des phénotypes observés.

Dans notre équipe, nous avons utilisé un transgène codant la sous-unité p110α constitutivement actif [14]. La transgenèse de souris avec cette construction entraîne une activation de la voie AKT/mTOR qui se révèle plus intense que celle due aux mutations retrouvées chez les patients. Ce modèle permet aussi une activation ubiquitaire du gène muté, après administration de tamoxifène. Ainsi, une dose élevée de tamoxifène (40 mg/kg) provoque une mort précoce et soudaine des souris dès 7 jours, comme cela avait été observé dans une étude précédente [13]. Cependant, une diminution de la dose (4 mg/kg) permet d'obtenir des souris qui développent la majorité des phénotypes observés chez les patients. Ces animaux présentent en effet de nombreuses anomalies d'organes, des malformations vasculaires et lymphatiques, des tumeurs localisées ainsi que des scolioses. Ce nouveau modèle murin présente donc des manifestations très similaires à celles observées chez les patients atteints du syndrome de PROS.

Les syndromes de surcroissance liés à la voie de signalisation PI3K

D'autres mutations touchant des gènes dont les produits participent à la voie de signalisation PI3K ont été identifiées dans des syndromes de surcroissance segmentaires. Il s'agit de mutations perte de fonction de gènes suppresseur de tumeurs, comme *PTEN (phosphatase and tensin homologue), TSC(tuberous sclerosis)1* (hamartine), et *2* (tubérine), ou des mutations gain de fonction de gènes codant des protéines impliquées dans la cascade de signalisation comme AKT et mTOR.

Les mutations perte de fonction

Il s'agit, notamment, de mutations inhibitrices du gène *PTEN*, un régulateur négatif de la voie PI3K. Ces mutations sont à l'origine d'une augmentation de la concentration de PIP3 et provoquent une activation de la voie AKT/mTOR. Les syndromes qui en découlent, regroupés sous le terme de *PTEN hamartoma tumor syndrome* (PHTS) [12], sont le plus souvent le fait de mutations germinales, mais il existe aussi des formes mosaïques. C'est le cas pour le syndrome SOLAMEN (*segmental overgrowth, lipomatosis, arteriovenous malformation, and epidermal nevus*) qui correspond à un mosaïsme segmentaire de type 2 [13]. Le syndrome SOLAMEN est lié à une perte mosaïque secondaire de l'allèle fonctionnelle du gène *PTEN* chez des individus porteurs

d'une mutation germinale. Il est caractérisé par des hypertrophies localisées, des malformations artério-veineuses et lymphatiques, une macrocéphalie accompagnés de nævus[2]. Il est corrélé à un risque accru de cancer du sein, de l'endomètre et colorectal.

Il existe également des patients atteint de sclérose tubéreuse de Bourneville (ou TSC pour *tuberous sclerosis complex*) sous des formes mosaïques. Cette pathologie est associée à des mutations des gènes *TSC1* ou *TSC2*, qui sont des régulateurs négatifs de mTOR. La sclérose tubéreuse de Bourneville est à l'origine de symptômes très variables : elle peut conduire à une épilepsie, à des signes autistiques, et à des tumeurs bénignes dans certains organes (notamment le rein, la peau, le cœur et le poumon). Chez certains patients, ce syndrome peut être aussi associé à des malformations vasculaires et des hypertrophies [15].

Les mutations gain de fonction

Des mutations activatrices touchant les gènes *PIK3R2, AKT1, AKT2, AKT3* et *CCND2* ont été identifiées dans certains syndromes de surcroissance segmentaire. Ainsi, l'activation somatique d'*AKT1* engendre le syndrome de Protée (OMIM #176920), qui est caractérisé par la présence asymétrique de lésions, notamment de nævus, de tumeurs lipomateuses et de malformations lymphovasculaires. Une hypercroissance asymétrique de certains tissus, comme les os, la graisse et les tissus connecteurs, est également observée. Ce syndrome est associé à un risque accru de cancers. Il n'existait pas de modèle animal spécifique du syndrome de Protée, mais l'activation d'*AKT1* dans les cellules des os et de l'épiderme ont récemment permis de retrouver certains des phénotypes des patients [16, 17]. L'équipe de Lindhurst *et al.* a développé deux modèles murins de ce syndrome [18] : un premier modèle transgénique, dans lequel la surexpression d'un allèle muté d'*AKT1* est induite par administration de tamoxifène chez la mère au jour embryonnaire E5,5 ; et un modèle dans lequel des chimères ont été générées en injectant des cellules souches embryonnaires mutées pour *AKT1* dans des embryons de souris sauvages. Ces deux modèles présentent tardivement (vers 12 mois) les mêmes phénotypes que les patients atteints du syndrome de Protée. Ils devraient donc permettre d'étudier les mécanismes physiopathologiques menant à ce syndrome et de tester de nouvelles options thérapeutiques. Les autres membres de la famille d'AKT (AKT2 et AKT3) ont aussi été incriminés dans certains syndromes de surcroissance.

Des mutations d'autres gènes participant à la voie PIK3-AKT-mTOR ont été retrouvées, notamment des mutations touchant *PIK3R2* qui code la sous-unité régulatrice de PIK3, et *CCND2* qui code la cycline D2 [19-21], un régulateur du cycle cellulaire et de la prolifération [22], dont l'abondance est contrôlée par GSK-3β (*glycogen synthase kinase 3 β*), elle-même modulée par la voie PI3K-AKT. Ces mutations sont à l'origine du syndrome MPPH (*megalencephaly-polymicrogyria-polydactyly-hydrocephalus syndrome* ; OMIM #603387, OMIM #615937, OMIM #615938)[3].

[2] « grain de beauté ».

[3] Le syndrome de mégalencéphalie-polymicrogyrie-polydactylie postaxiale-hydrocéphalie est caractérisé par une mégalencéphalie, une polymicrogyrie, une hydrocéphalie avec ou sans polydactylie. Il a été décrit chez six patients non apparentés. Les autres manifestations sont un déficit intellectuel ou un développement lent.

Les autres syndromes de surcroissance

Le syndrome de Beckwith–Wiedemann

Le syndrome de Beckwith–Wiedemann (ou BWS, OMIM #130650) est le syndrome de surcroissance ayant la plus haute prévalence avec environ 1 cas pour 13 000 naissances, mais son diagnostic est sans doute sous-estimé car les phénotypes qui lui sont associés sont très variables [23]. Les premiers cas ont été décrits dans les années 1960 par les médecins John Bruce Beckwit et Hans Rudolf Wiedemann. Il est caractérisé par une croissance excessive (une visceromégalie, une macroglossie, des défauts de la paroi abdominale, des zones hypertrophiées ainsi qu'une prédisposition tumorale). Les patients peuvent présenter des anomalies rénales, de l'hypoglycémie, des anomalies des oreilles, etc. Les causes génétiques de ce syndrome sont assez complexes. Elles peuvent être soit germinales, soit somatiques. Elles induisent la modification de l'expression ou de la fonction de gènes situés dans la région chromosomique 11p15, qui contient les gènes *IGF2* (*insulin-like growth factor 2*) et *CDKN1C* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*), et qui sont affectés chez certains patients. Dans la plupart des syndromes BWS de forme mosaïque, des défauts épigénétiques et une disomie uniparentale paternelle (lorsque tout ou un segment d'une paire chromosomique provient du père) touchant la région 11p15 du chromosome sont impliqués. Ces modifications entraînent une surexpression d'*IGF2* et une diminution l'expression de *CDKN1C* qui semblent contribuer aux phénotypes associés à ce syndrome.

Dans un modèle murin, fondé sur la surexpression d'*IGF2*, la plupart des symptômes observés chez les patients sont retrouvés [24]. Dans les modèles d'invalidation de la fonction de CDKN1C, si des défauts de développement similaires à ceux que présentent les patients atteints du syndrome de BW (dysplasie rénale, fente palatine, hypertrophie placentaire, des défauts de la paroi abdominale, etc.) ont été observés, aucune hypercroissance post-natale n'a été obtenue [25-27]. Néanmoins, Tunster *et al.* ont récemment montré que les fœtus déficients pour *cdkn1* présentaient bien une hypercroissance, mais que celle-ci était perdue très rapidement après la naissance dans les larges portées (qui sont soumises à une restriction alimentaire due au nombre de souriceaux pour la mère) [28].

Le syndrome de Parkes-Weber

Le syndrome de Parkes-Weber (OMIM 608354) tient son nom du médecin qui l'a identifié pour la première fois en 1907 [29]. Il est lié à des mutations du gène *RASA1* [30] qui code la protéine *p120 Ras GTPase-activating*

protein (RasGAP), un régulateur négatif du proto-oncogène p21 Ras. Il est caractérisé par des malformations lymphatiques et vasculaires (varices, fistules intramusculaires artério-veineuses) et une hypercroissance des membres. Plusieurs modèles animaux ont été établis pour le syndrome de Parkes-Weber. Des souris surexprimant Ras-p120 reproduisent en partie les phénotypes de ce syndrome, notamment les malformations lymphatiques [31] et un modèle établi chez le rat [32] mime les principales caractéristiques observées chez les patients.

Le syndrome de Schimmelpenning-Feurestein-Mims

Le syndrome de Schimmelpenning-Feurestein-Mims (OMIM #163200) est lié à des mutations post-zygotiques touchant les gènes *HRAS, NRAS* ou *KRAS*. Il entraîne des asymétries osseuses des jambes, des tumeurs lipomateuses sous-cutanées, des hyperpigmentations de la peau, des atteintes neurologiques, etc.

Le syndrome ECCL(lipomatose encéphalo-crano-cutanée)

Cette maladie (OMIM#613001) est due à une mutation post-zygotique du gène *FGFR1* (*fibroblast growth factor receptor 1*) situé sur le chromosome 8. Ce syndrome est caractérisé par des atteintes localisées sur le visage et le crâne, avec, en particulier, des lésions oculaires, des lésions du derme et la présence de tumeurs lipomateuses.

Les traitements

Il n'existe pas actuellement de traitement spécifique pour ces pathologies. La complexité des symptômes qui leurs sont associés, qui peuvent affecter de multiples organes, demande une approche thérapeutique pluridisciplinaire. Ils nécessitent d'être traités selon les recommandations des différentes spécialités qui sont impliquées : dermatologie, orthopédie, chirurgie, etc., et certains de ces syndromes peuvent engager le pronostic vital des patients : la surcroissance tissulaire peut en effet être à l'origine de compressions qui peuvent provoquer des problèmes vasculaires et des dysfonctions d'organes.

Le développement de traitements spécifiques pour la plupart de ces pathologies a été, en fait, ralenti par l'absence d'accès à des modèles animaux. Des stratégies thérapeutiques ont néanmoins été développées pour certains. Dans le cas du syndrome Parkes-Weber, par exemple, le traitement actuel est principalement symptomatique, mais un traitement a été testé sur un modèle animal développé par Zegrocka-Stendel [33]. Ces auteurs ont en effet développé et testé 30 composés semi-synthétiques à partir de la fraction non glucidique de l'escine (un mélange de saponines isolées à partir de marron d'Inde) qui présente des propriétés anti-inflammatoires. L'un de ces composés, la protoescigénine [33], un polyhydroxyl aglycone, semble améliorer les symptômes dans le modèle qu'ils ont établi, même s'il y a pas de données récentes. Pour ce syndrome, comme pour le syndrome de Schimmelpenning-Feurestein-Mims, qui impliquent tous deux la voie Ras/MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), le développement de nouveaux traitements de « RASopathies » devrait permettre d'inclure de nouvelles molécules, telles que le trametinib, un inhibiteur de MEK (MAPK/ERK[*extracellular signal-regulated kinase*] kinase) développé en oncologie et qui a montré, très récemment, une amélioration spectaculaire dans le syndrome de Nooman[4] chez deux nourrissons [34].

Les altérations génétiques de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR ont été reconnues comme des participants importants dans des cancers et de nombreux inhibiteurs ont été développés pour cibler cette voie. Certains de ces composés pourraient être repositionnés dans des syndromes dans lesquels cette voie de signalisation a été impliquée, ce qui a été testé dans deux syndromes d'hypercroissance : le syndrome de Protée et le syndrome de PROS.

Plusieurs inhibiteurs d'AKT sont actuellement en essai clinique en oncologie, notamment l'inhibiteur pan-AKT ARQ 092 ; cet inhibiteur a été testé, à une dose faible (5 mg/m^2/jour), dans une étude réalisée sur 6 patients âgés de 13 à 57 ans atteints du syndrome de Protée. Il s'est révélé actif pour diminuer la douleur chez les patients [35]. Ce traitement est actuellement en essai clinique de phase I/II pour les patients atteints du syndrome de Protée ainsi que pour les patients présentant un syndrome de PROS[5].

Des inhibiteurs allostériques de mTOR [36] (➜) dont le sirolimus (ou rapamycine), l'everolimus, le ridaforolimus ou le temsirolimus sont également autorisés dans de nombreuses pathologies. Ils ont été utilisés pour traiter des malformations vasculaires chez des patients porteurs de mutations de *PTEN* [37-39] (➜)

(➜) Voir la Synthèse de N. Pallet et *al.*, *m/s* n° 11, novembre 2006, page 947

Un essai clinique a aussi été mené pour étudier son action chez des patients atteints du syndrome de PROS. Un effet modeste a pu être observé sur les tumeurs, principalement à composante adipeuse [40], mais avec des effets secondaires assez invalidants.

(➜) Voir la Nouvelle de E. Seront *et al.*, *m/s* n° 6-7 juin-juillet 2016, page 574

Nous avons utilisé le modèle de syndrome de PROS, que nous avons développé, pour tester une molécule, appelée BYL719, inhibitrice de *PIK3CA*[6]. Ce traitement a été administré aux souris modèle après l'apparition des différentes malformations [14]. Les résultats obtenus ont été spectaculaires, avec, non seulement un arrêt de la progression des malformations, mais aussi la régression des tumeurs, dès les premiers jours de traitement, et un allongement de

[4] Ce syndrome se manifeste par un aspect particulier des traits du visage, des malformations du cœur et une petite taille. Il existe parfois un déficit intellectuel et un retard d'acquisition du langage.

[5] ClinicalTrials.gov: NCT02594215

[6] Cette molécule en développement en oncologie a obtenu en mai 2019 l'autorisation de la FDA (*Food and Drug Administration*) dans le cancer du sein HR+/HER2- avec une mutation de *PIK3CA* sur la base des résultats de l'essai clinique de phase III SOLAR-I.

la durée de vie des animaux. Nous avons également montré que dans ce modèle, le BYL719 était plus efficace que la rapamycine. Aussi, forts de ces résultats, nous avons proposé cette molécule à un jeune adulte de 27 ans atteint du syndrome de PROS ayant un pronostic vital engagé, et nous avons observé une nette réduction des tumeurs vasculaires et des malformations veineuses, une diminution de l'hypertrophie de sa jambe gauche ainsi qu'une amélioration des fonctions cardiaque et rénale. Après ce premier succès thérapeutique, nous avons été autorisés par l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament) à traiter 18 autres patients dont des enfants : 15 enfants de 4 à 16 ans et 3 adultes qui présentaient des symptômes mettant leur vie en danger ou pour lesquels une chirurgie mutilante était programmée. Ces 19 patients présentaient 10 mutations gain de fonction différentes du gène *PIK3CA*. Après 6 mois de traitement, nous avons observé des résultats positifs chez chacun de ces patients avec peu d'effets secondaires notables. À ce jour, tous continuent de recevoir le traitement, et un essai clinique doit être initié afin de valider ces premiers résultats prometteurs. Il s'agit donc d'un exemple de repositionnement de molécules dans le cadre de maladies rares qui pourrait être mis en place pour d'autres pathologies.

Conclusions et perspectives

Les syndromes de surcroissance segmentaire forment un groupe hétérogène de syndromes dont les manifestations peuvent être très sévères. L'amélioration des techniques de séquençage du génome a permis de découvrir un grand nombre de gènes qui sont impliqués dans ces pathologies, et qui sont possiblement des cibles pour des traitements à venir. Le repositionnement de molécules, par ailleurs développées en oncologie, se révèle très encourageant pour les patients atteints de certains de ces syndromes rares. Utilisées à de faibles doses, certaines de ces molécules présentent des effets thérapeutiques qui commencent à émerger et restent à confirmer. De nouvelles problématiques apparaissent néanmoins : ces patients nécessiteront certainement un traitement au long cours mais, alors, quelles seront les conséquences de ces traitements en termes d'effets secondaires ou d'échappement, comme cela est observé dans le cadre du cancer ? ◊

SUMMARY

Segmental overgrowth syndromes and therapeutic strategies

Overgrowth syndromes are a large group of rare disorders characterized by generalized or segmental excessive growth. Segmental overgrowth syndromes are mainly due to genetic anomalies appearing during the embryogenesis and leading to mosaicism. The numbers of patients with segmental overgrowth with an identified molecular defect has dramatically increased following the recent advances in molecular genetic using next-generation sequencing approaches. This review discusses various syndromes and pathways involved in segmental overgrowth syndromes and presents actual and future therapeutic strategies. ◊

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Hietakangas V, Cohen SM. Regulation of tissue growth through nutrient sensing. *Annu Rev Genet* 2009 ; 43 : 389-410.
2. Biesecker LG, Spinner NB. A genomic view of mosaicism and human disease. *Nat Rev Genet* 2013 ; 14 : 307-20.
3. Happle R. The categories of cutaneous mosaicism: a proposed classification. *Am J Med Genet A* 2016 ; 170 : 452-9.
4. Whitman M, Downes CP, Keeler M, *et al*. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* 1988 ; 332 : 644.
5. Viaud J, Payrastre B. Les phosphoinositides : ces lipides qui coordonnent la dynamique cellulaire. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 996-1005.
6. Orloff MS, He X, Peterson C, *et al*. Germline PIK3CA and AKT1 mutations in Cowden and Cowden-like syndromes. *Am J Hum Genet* 2013 ; 92 : 76-80.
7. Keppler-Noreuil KM, Sapp JC, Lindhurst MJ, *et al.* Clinical delineation and natural history of the PIK3CA-related overgrowth spectrum. *Am J Med Genet A* 2014 ; 164A : 1713-33.
8. Hare LM, Schwarz Q, Wiszniak S, *et al*. Heterozygous expression of the oncogenic Pik3caH1047R mutation during murine development results in fatal embryonic and extraembryonic defects. *Dev Biol* 2015 ; 404 : 14-26.
9. Castillo SD, Tzouanacou E, Zaw-Thin M, *et al.* Somatic activating mutations in Pik3ca cause sporadic venous malformations in mice and humans. *Sci Transl Med* 2016 ; 8 : 332ra43.
10. Castel P, Carmona FJ, Grego-Bessa J, *et al.* Somatic PIK3CA mutations as a driver of sporadic venous malformations. *Sci Transl Med* 2016 ; 8 : 332ra42.
11. di Blasio L, Puliafito A, Gagliardi PA, *et al*. PI3K/mTOR inhibition promotes the regression of experimental vascular malformations driven by PIK3CA-activating mutations. *Cell Death Dis* 2018 ; 9.
12. Roy A, Skibo J, Kalume F, *et al*. Mouse models of human PIK3CA-related brain overgrowth have acutely treatable epilepsy. *ELife* 2015 ; 4 : e12703.
13. Kinross KM, Montgomery KG, Mangiafico SP, *et al.* Ubiquitous expression of the *Pik3ca* ^{H1047R} mutation promotes hypoglycemia, hypoinsulinemia, and organomegaly. *FASEB J* 2015 ; 29 : 1426-34.
14. Venot Q, Blanc T, Rabia SH, *et al.* Targeted therapy in patients with PIK3CA-related overgrowth syndrome. *Nature* 2018 ; 558 : 540-6.
15. Jenkins D, McCuaig C, Drolet BA, *et al.* Tuberous sclerosis complex associated with vascular anomalies or overgrowth. *Pediatr Dermatol* 2016 ; 33 : 536-42.
16. Fukai A, Kawamura N, Saito T, *et al.* Akt1 in murine chondrocytes controls cartilage calcification during endochondral ossification under physiologic and pathologic conditions. *Arthritis Rheum* 2010 ; 62 : 826-36.
17. Segrelles C, Lu J, Hammann B, *et al.* Deregulated activity of Akt in epithelial basal cells induces spontaneous tumors and heightened sensitivity to skin carcinogenesis. *Cancer Res* 2007 ; 67 : 10879-88.
18. Lindhurst MJ, Brinster LR, Kondolf HC, *et al.* A mouse model of Proteus syndrome. *Hum Mol Genet* 2019 ; 28 : 2920-36.
19. Rivière JB, Mirzaa GM, O'Roak BJ, *et al.* Finding of rare disease genes (FORGE) Canada consortium. De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet* 2012 ; 44 : 934-40.
20. Mirzaa G, Parry DA, Fry AE, *et al.* De novo CCND2 mutations leading to stabilization of cyclin D2 cause megalencephaly-polymicrogyria-polydactyly-hydrocephalus syndrome. *Nat Genet* 2014 ; 46 : 510-5.
21. Terrone G, Voisin N, Abdullah Alfaiz A, *et al.* De novo PIK3R2 variant causes polymicrogyria, corpus callosum hyperplasia and focal cortical dysplasia. *Eur J Hum Genet* 2016 ; 24: 1359-62.
22. Kida A, Kakihana K, Kotani S, *et al.* Glycogen synthase kinase-3β and p38 phosphorylate cyclin D2 on Thr280 to trigger its ubiquitin/proteasome-dependent degradation in hematopoietic cells. *Oncogene* 2007 ; 26: 6630-40.
23. Weksberg R, Shuman C, Beckwith JB. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2010 ; 18 : 8-14.
24. Sun FL, Dean WL, Kelsey G, *et al*. Transactivation of Igf2 in a mouse model of Beckwith-Wiedemann syndrome. Nature 1997 ; 389 : 809.
25. Yan Y, Frisén J, Lee MH, *et al*. Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development. *Genes Dev* 1997 ; 11 : 973-83.

RÉFÉRENCES

26. Takahashi K, Nakayama K, Nakayama K. Mice lacking a CDK inhibitor, p57Kip2, exhibit skeletal abnormalities and growth retardation. *J Biochem (Tokyo)* 2000 ; 127 : 73-83.
27. Kanayama N, Takahashi K, Matsuura T, *et al.* Deficiency in p57Kip2 expression induces preeclampsia-like symptoms in mice. *Mol Hum Reprod* 2002 ; 8 : 1129-35.
28. Tunster SJ, Van de Pette M, John RM. Fetal overgrowth in the Cdkn1c mouse model of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Dis Model Mech* 2011 ; 4 : 814-21.
29. Weber PF. Angioma formation in connection with hypertrophy of limbs and hemihypertrophy. *Br J Derm* 1907 ; 19 : 231-5.
30. Revencu N, Boon LM, Mulliken JB, *et al.* Parkes-Weber syndrome, vein of Galen aneurysmal malformation, and other fast-flow vascular anomalies are caused by RASA1 mutations. *Hum Mutat* 2008 ; 29 : 959-65.
31. Lorenzo IM, Fleischer A, Bachiller D. Generation of mouse and human induced pluripotent stem cells (iPSC) from primary somatic cells. *Stem Cell Rev Rep* 2013 ; 9 : 435-50.
32. Bojakowski K, Janusz G, Grabowska I, *et al.* Rat model of Parkes-Weber syndrome. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0133752. 2.
33. Zegrocka-Stendel O, Bojakowski K, Dutkiewicz M, *et al.* New protoescigenin derivative for the treatment of Parkes Weber syndrome. *PeerJ Inc* 2015. https://peerj.com/preprints/1598/
34. Andelfinger G, Marquis C, Raboisson MJ, *et al.* Hypertrophic cardiomyopathy in Noonan syndrome treated by MEK-inhibition. *J Am Coll Cardiol* 2019 ; 73 : 2237-9.
35. Keppler-Noreuil KM, Sapp JC, Lindhurst MJ, *et al.* Pharmacodynamic study of Miransertib in individuals with Proteus syndrome. *Am J Hum Genet* 2019 ; 104 : 484-91.
36. Pallet N, Beaune P, Thervet E, *et al.* Inhibiteurs de mTOR : des antiprolifératifs pléiotropiques. *Med Sci (Paris)* 2006 ; 22 : 947-52.
37. Marsh DJ, Trahair TN, Martin JL, *et al.* Rapamycin treatment for a child with germline PTEN mutation. *Nat Clin Pract Oncol* 2008 ; 5 : 357-61.
38. Schmid GL, Kässner F, Uhlig HH, *et al.* Sirolimus treatment of severe PTEN hamartoma tumor syndrome: case report and in vitro studies. *Pediatr Res* 2014 ; 75 : 527-34.
39. Seront E, Limaye N, Boon LM, Vikkula M. La rapamycine ouvre l'ère des thérapies ciblées dans les malformations veineuses. *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 574-8.
40. Parker VER, Keppler-Noreuil KM, Faivre L, *et al.* PROMISE working group. Safety and efficacy of low-dose sirolimus in the PIK3CA-related overgrowth spectrum. *Genet Med* 2019 ; 21 : 1189-98.

TIRÉS À PART
G. Canaud

Global Registry for COL6-related dystrophies

Registre global des dystrophies liées au collagène de type VI

S'inscrire sur : www.collagen6.org

Ou contactez-nous par e-mail à l'adresse : collagen6registry@ncl.ac.uk

La traduction française sera bientôt disponible sur le site web.

Newcastle University · TREAT-NMD Neuromuscular Network · The John Walton Muscular Dystrophy Research Centre · Muscular Dystrophy UK Fighting muscle-wasting conditions · cureCMD a cure is among us · AFMTÉLÉTHON Innover pour guérir · fsrmm fondation suisse de recherche sur les maladies musculaires

Tarifs d'abonnement m/s - 2020

Abonnez-vous à *médecine/sciences*

> Grâce à *m/s*, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

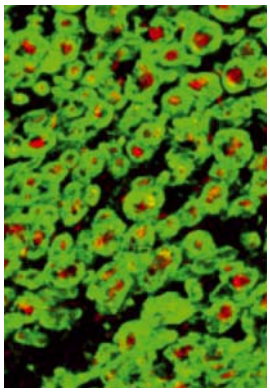
Bulletin d'abonnement page 294 dans ce numéro de *m/s*

médecine/sciences 2020 ; 36 : 243-52

La sclérose en plaques et les médicaments immuno-modulateurs des récepteurs de la sphingosine 1-phosphate

Franck Talmont, Anastassia Hatzoglou, Olivier Cuvillier

> La sclérose en plaques (SEP) est une maladie du système nerveux central à composante inflammatoire, très invalidante qui atteint généralement de jeunes adultes (20 à 40 ans). Cette maladie se caractérise par la destruction progressive, par les cellules du système immunitaire, de la gaine de myéline des axones, ce qui aboutit à une dégénérescence neuronale. Les lymphocytes T et B sont les acteurs principaux de cette maladie qui peut être rémittente ou progressive. Parmi les médicaments utilisés dans le cadre de son traitement, le fingolimod, un immunosuppresseur dont les cibles sont les récepteurs de la sphingosine 1-phosphate, administré par voie orale, agit en empêchant les lymphocytes de quitter le thymus et les ganglions lymphatiques, et de rejoindre les foyers inflammatoires cérébraux. Une recherche intense pour développer des traitements et des médicaments curatifs est actuellement en cours et d'autres immunosuppresseurs interagissant avec les récepteurs de sphingosine 1-phosphate sont en cours de développement. <



Vignette (Photo © Inserm – Alice Lieury).

Institut de pharmacologie et de biologie structurale, UMR 5089 CNRS, Université de Toulouse, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse, France.
olivier.cuvillier@ipbs.fr
franck.talmont@ipbs.fr

La sclérose en plaques

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune chronique très invalidante dont la prévalence est de 50 à 300 pour 100 000 individus, selon les régions du globe [1, 2]. On estime que 2 à 3 millions de personnes sont atteintes par cette maladie dans le monde, dont plus de 110 000 en France. Elle touche généralement de jeunes adultes, avec une prévalence de 3 patients femme pour un homme. Actuellement, les processus déclencheurs de la maladie ne sont pas connus. Néanmoins, des composantes génétiques mais aussi environnementales (ensoleillement et déficit en vitamine D) et sociales (telles que consommation de tabac) participent à la pathogenèse de la SEP [1].

La maladie est caractérisée par l'apparition de handicaps variables tous dus à l'infiltration progressive de cellules du système immunitaire adaptatif, les lymphocytes T et B, dans le système nerveux central (SNC). Ces cellules activées sont à l'origine de la destruction de la gaine de myéline des neurones et de l'apparition de dommages neuronaux et axonaux. On peut parfois observer la prolifération de cellules astrocytaires, ce qui peut conduire à des processus dichotomiques, en favorisant l'apparition de dommages supplémentaires, ou, au contraire, en contribuant aux phénomènes de réparation des lésions [3].

La SEP est une maladie auto-immune dont la progression est en relation directe avec le phénomène appelé « diversification antigénique » (*epitope spreading*). Dans plusieurs modèles murins de SEP, génétiques ou induits, la progression des dommages s'observe en effet en lien avec la présence de nouveaux épitopes qui sont reconnus par les anticorps produits par des lymphocytes B, et qui amplifie l'altération induite par les lymphocytes T spécifiques de séquences peptidiques présentées par les neurones [4].

On distingue trois types de SEP. Une forme cyclique ou rémittente (*relapsing-remitting multiple sclerosis*, SEP-RR), qui touche 80-85 % des patients, sans progression du handicap entre les poussées. Cette SEP peut évoluer en SEP secondairement progressive (ou SEP-SP). Pour plus de la moitié des malades, la SEP rémittente évolue vers la forme secondairement progressive en 15 à 20 ans [5]. Il existe également une

forme primaire progressive (ou SEP-PP) atteignant environ 15 % des patients [1, 2]. Dans cette forme de SEP, les phases de la maladie ne sont pas entrecoupées de phases de rémission et la maladie progresse inexorablement. La transition entre la SEP rémittente et la forme progressive intervient lorsque les dommages axonaux ne sont plus compensés par les capacités reconstructrices du système nerveux central.

Les symptômes

Les symptômes de la SEP sont caractérisés par des phases aiguës de déficits neurologiques en récidive. Ils dépendent des régions du système nerveux central qui sont atteintes, et du niveau de démyélinisation et d'inflammation présenté par ces zones. Ainsi, lorsque les lésions inflammatoires affectent le nerf optique, les symptômes sont une déficience visuelle et une douleur oculaire lors des mouvements des yeux. Dans cette névrite optique, l'action des cytokines inflammatoires et de l'oxyde nitrique, au niveau des lésions nerveuses du nerf optique, sont les déterminants majeurs des symptômes [1]. Les axones démyélinisés peuvent ainsi devenir hyperexcitables et générer spontanément la perception de lumière clignotante.

C'est un ensemble de données cliniques, sérologiques et d'imagerie cérébrale qui permettent de poser le diagnostic. Pour la grande majorité des patients, la maladie débute par un épisode clinique isolé, régressant spontanément, qui implique le nerf optique, le tronc cérébral ou la moelle épinière. Les symptômes observés sont très hétérogènes et non spécifiques. Ils peuvent être uniques ou associés. On distingue différents symptômes cliniques [1] :

– Les troubles visuels (perception de flashs lumineux, oscillopsie, baisse de l'acuité, douleurs lors des mouvements oculaires).
– Les troubles moteurs (dystonie musculaire, altération de la mobilité, ataxie et tremblements, spasticité).
– Les troubles urinaires, intestinaux, sexuels.
– Les troubles de l'humeur (dépression et instabilité émotionnelle).
– Les troubles cognitifs (langage).
– Les troubles de la sensibilité.
– Les troubles de l'équilibre (vertiges).

Ces troubles sont souvent associés à une fatigue importante et à des douleurs (neuropathique, névralgie du nerf trijumeau, musculosquelettique, migraine).

En raison de la multiplicité des symptômes, il est essentiel de pouvoir éviter les erreurs de diagnostic qui peuvent avoir des conséquences importantes. Des critères de diagnostic, dits critères de McDonald, ont ainsi été développés et validés à partir des données cliniques de plusieurs centres académiques [6, 7]. Validés sur une population d'adultes de moins de 50 ans d'origine génétique/ethnique européenne occidentale, les critères de McDonald peuvent néanmoins être utilisés pour des populations d'origines géographiques diverses, chez des enfants et des individus plus âgés. Les signes cliniques qui sont observés chez les patients sont confrontés aux résultats d'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) cérébrale et à une analyse du liquide céphalo-rachidien (LCR). L'analyse par IRM permet de rechercher la présence de lésions cérébrales, de définir leur localisation (dissémination spatiale), le moment de leur apparition (dissémination temporelle). Ces études d'imagerie cérébrale ont un rôle fondamental en terme de diagnostic, mais aussi pour le pronostic et l'évaluation de la réponse au traitement [8]. L'analyse du liquide céphalo-rachidien permet, elle, la recherche (en *western blot*) de bandes oligoclonales d'immunoglobulines. Elle représente un bon outil diagnostic de la SEP (avec une présence de ces bandes d'immunoglobulines observées chez plus de 95 % des patients) qui permet de confirmer la sécrétion d'anticorps au niveau intra-thécal[1].

Les traitements *(Tableau I)*

Le système immunitaire est responsable de la SEP et l'infiltration de cellules immunitaires dans le système nerveux central (SNC) est une caractéristique de toutes les formes de SEP. Les traitements disponibles permettent de modifier, de limiter ou d'inhiber la migration de ces cellules afin de réduire toute nouvelle agression. Actuellement, il n'existe en fait pas de traitement curatif de la SEP et les stratégies thérapeutiques visent à traiter les poussées, à mettre en place des traitements de fond et à traiter les symptômes associés. Les poussées, qui sont caractérisées par des symptômes apparaissant de manière soudaine, sont des signes pathologiques. Elles peuvent régresser spontanément plus ou moins complètement.

Ces crises inflammatoires, souvent très douloureuses, sont traitées à l'aide de perfusion de corticoïdes (Solumédrol®) par voie intraveineuse (flash ou bolus de corticoïdes)[2]. Pour des attaques sévères au cours desquelles la corticothérapie s'est révélée être inefficace ou contre-indiquée, des échanges de plasma ont parfois été réalisés afin de modifier la composition plasmatique du patient. Les traitements de fond sont assurés par des molécules immunomodulatrices. Mais en cas d'échecs du traitement, et pour les formes agressives ou résistantes, des immunosuppresseurs seront utilisés. On distingue ainsi des traitements de 1re, 2e et 3e ligne qui seront administrés selon l'évolution de la maladie.

Les traitements de 1re ligne

– Les interférons bêta 1a et 1b (Avonex®, Pelgridy®, Rebif®, Betaferon®, Extavia®) stimulent l'activité de certaines cellules immunitaires et favorisent la production de cytokines immunosuppressives qui diminuent celle de cytokines pro-inflammatoires. Ces molécules sont administrées par voie sous-cutanée ou intramusculaire. Elles permettent de réduire le nombre et

[1] Ou sous-arachnoïdien.

[2] Le flash ou bolus correspond à une injection intraveineuse d'une importante quantité de corticoïdes en une seule dose.

Médicament utilisé en clinique	Cible/Mécanisme d'action	Effets secondaires indésirables
Acétate de glatiramère	Immunomodulateur.	Réactions cutanées.
Alemtuzumab	Anticorps anti-CD20. Se lie aux cellules B et T. Immunosuppresseur par lymphodéplétion.	Cholécystite acalculeuse aiguë. Réactions cardiovasculaires graves, hépatites auto-immunes et lymphohistiocytoses hémophagocytaires.
Biotine	Activation de l'acetylCoA carboxylase. Néo-synthèse de myéline.	Diarrhées, effet toxique sur la reproduction. Incidence sur les résultats de tests biologiques (fonctions thyroïdiennes et cardiaques, grossesse, cortisol, sérologie VIH).
Cladribine	Cytotoxique immunomodulateur. Pro-drogue qui après phosphorylation perturbe la synthèse et la réparation de l'ADN.	Réduction du nombre de lymphocytes, infections. Risque potentiel de malignité.
Corticostéroïdes	Molécules et cellules de l'immunité. Anti-inflammatoire et immunosuppresseur	Troubles métaboliques, endocriniens, digestifs, psychiques. Aggravation d'états infectieux préexistants.
Cyclophosphamide	Immunosuppresseur. Agent alkylant.	Troubles digestifs. Surveillance sanguine.
Diméthyl fumarate	Activation de la voie Nrf2 et augmentation de l'expression de gènes antioxydants Nrf2-dépendants. Protection des neurones vis-à-vis du stress oxydatif.	Diarrhée, nausée, réduction du nombre de globules blancs.
Fingolimod	Antagoniste fonctionnel des récepteurs de la sphingosine 1-phosphate. Action par rétention lymphocytaire au niveau du thymus et des ganglions lymphatiques.	Bradycardie. Redistribution des lymphocytes.
Interféron Béta	Récepteur IFN-α de type 1. Inhibition de la production de cytokines Th1. Immunomodulateur. Anti-inflammatoire.	Syndrome pseudo-grippal. Réactions cutanées. Atteinte du foie bénigne.
Mitoxantrone	Immunosuppresseur. Agent intercalant.	Leucémies aiguës myéloïdes pouvant être fatales, insuffisance cardiaque congestive, aménorrhée, toxicité sur l'ADN.
Mycophénolate mofétil	Immunosuppresseur. Inhibiteur de la biosynthèse des purines.	Troubles digestifs. Surveillance sanguine.
Natalizumab	Anticorps anti-intégrine alpha 4 ($\alpha4\beta1$ et $\alpha4\beta7$). Permet de bloquer le passage des leucocytes exprimant les intégrines $\alpha4$ à travers la barrière hémato-encéphalique.	Infection urinaire, urticaire, céphalées. Augmente le risque de leucoencéphalopathie multifocale progressive.
Ocrelizumab	Anticorps anti-CD20. Se lie aux cellules B adultes et mémoire. Immunomodulateur par lymphodéplétion.	Irritation au site d'injection, fièvre, nausée, abaissement de la pression artérielle. Risque de cancers.
Tériflunomide	Immunomodulateur de la prolifération des lymphocytes par inhibition de la synthèse de la pyrimidine. Inhibition de l'activation et de la sécrétion des cytokines et de l'interféron gamma.	Symptômes digestifs, rétrécissement capillaire. Lymphopénie sévère.

Tableau I. ***Médicaments utilisés dans le cadre du traitement de la SEP.***

l'intensité des poussées. Elles ont cependant le désavantage d'entraîner l'apparition d'un syndrome pseudogrippal et des réactions cutanées après l'injection.

– L'acétate de glatiramère (Copaxone®) est un mélange de peptides de tailles aléatoires (40 à 100 résidus) qui sont constitués d'acides aminés (acide glutamique, lysine, alanine, et tyrosine) qui composent la MBP (*myelin basic protein*), l'un des constituants de la myéline. Ces acides aminés altéreraient la présentation des antigènes produits à partir de la myéline aux lymphocytes T auto-réactifs [9]. Ils auraient également la capacité d'induire la production de cytokines anti-inflammatoires.

– Le diméthylfumarate (Tecfidera®) induit la production de cytokines anti-inflammatoires et la prolifération de cellules dendritiques. Il améliore la protection des neurones contre le stress oxydatif, et favorise la mort par apoptose des lymphocytes T activés.

– Le tériflunomide (Aubagio®) agit en inhibant la prolifération des lymphocytes. Il peut néanmoins provoquer des dommages hépatiques importants.

Traitements de 2e ligne

– L'ocrelizumab (Ocrevus®) est un anticorps anti-CD20 humanisé recombinant. La liaison de cet anticorps à la large boucle extracellulaire de la protéine CD20, exprimée par les lymphocytes B, est à l'origine de la déplétion des lymphocytes B $CD20^+$. Cet anticorps agit par apoptose, en induisant une cytotoxicité dépendante du complément, une phagocytose et une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps. Les lymphocytes B $CD20^+$ sont impliqués dans la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, dans la présentation des auto-antigènes aux lymphocytes T et dans la sécrétion des auto-anticorps. La déplétion sélective des lymphocytes B $CD20^+$ a ainsi un effet bénéfique sur la SEP rémittente, mais également sur la SEP progressive primaire [10].

– L'anticorps monoclonal natalizumab (Tysabri®) est un anticorps dirigé contre la sous-unité $\alpha 4$ des intégrines $\alpha 4\beta 1$ [11] (➜) et $\alpha 4\beta 7$. Il permet de bloquer la migration des lymphocytes T à travers la barrière hématoencéphalique et d'atteindre le système nerveux central. Il peut, cependant, induire la réactivation du virus JC, un papovavirus qui provoque une leucoencéphalopathie multifocale[3].

(➜) Voir la Synthèse de C. Papeix et C. Lubetzki, *m/s* n° 12, décembre 2009, page 1113

– Le fingolimod (Gilenya®, FTY720) agit sur les récepteurs de la sphingosine 1-phosphate (S1P) qui sont exprimés par les lymphocytes T. Il permet de séquestrer les lymphocytes T activés, leur interdisant de rejoindre les foyers inflammatoires. Une surveillance cardiovasculaire doit cependant être pratiquée.

Comparé à un traitement initial par l'acétate de glatiramère ou l'interféron bêta, un traitement par le fingolimod, l'alemtuzumab (Lemtrada®), un anticorps humanisé recombinant dirigé contre la molécule CD52 exprimée à la surface des lymphocytes B et T, qui induit leur déplétion par cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps et/ou du complément, ou le natalizumab est associé à une réduction du risque de conversion vers la SEP secondairement progressive [12].

[3] C'est aussi le cas de l'anti-CD20, l'ocrelizumab.

– La cladribine (Mavenclad®) est une prodrogue, analogue nucléosidique de la désoxyadénosine, qui interfère dans la synthèse et la réparation de l'ADN. Cette molécule, active sous forme phosphorylée, entraîne la déplétion sélective des lymphocytes B et T [13].

Traitements de 3e ligne

- L'alemtuzumab présenté ci-dessus est utilisé en traitement de 3e ligne. La liaison de l'anticorps à la glycoprotéine CD52 provoque la lyse des lymphocytes B et T *via* le complément et une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante de l'anticorps. Cet anticorps induit donc une déplétion lymphocytaire mais, en raison d'effets secondaires pouvant se révéler très importants, ce traitement est réservé aux patients adultes atteints de SEP cyclique très active et réfractaire aux autres traitements de fond [14].

Les traitements par immunosuppresseurs

La mitoxantrone (Novantrone®) est un agent intercalant de l'ADN et un inhibiteur de la topoisomérase II. Elle est utilisée pour traiter les formes très sévères de SEP, mais elle présente des effets secondaires très importants, car associés au développement de cancers du sang. Le cyclophosphamide (Endoxan®) et le mycophenolate mofétil (Ellcept®) sont également des immunosuppresseurs (hors autorisation de mise sur le marché dans cette indication) qui permettent, dans une certaine mesure, de stabiliser la maladie dans le temps. Tous deux présentent des effets secondaires défavorables, en particulier digestifs, et nécessitent une surveillance sanguine.

Les traitements des symptômes associés

Ces traitements sont nécessaires pour améliorer la qualité de vie des patients. Ils incluent des médicaments antidouleurs, myorelaxants, antidépresseurs, antifatigues, anticonvulsants, laxatifs, antidiarrhéiques, des médicaments pour traiter les troubles urinaires, intestinaux et sexuels. Ils peuvent être associés à des kinésithérapies, des thérapies comportementales, de la méditation, etc.

Le fingolimod, la sphingosine 1-phosphate et la SEP

Depuis la mise sur le marché du fingolimod (FTY720) en 2010 et 2011, par les agences de médecine américaine et européenne, la famille regroupant les cinq récepteurs de la sphingosine 1-phosphate ($S1PR_{1-5}$) *(Figure 1)* est devenue une cible thérapeutique de choix dans le traitement de la SEP. Le fingolimod est un dérivé de la myriocine *(Figure 2)*, une molécule

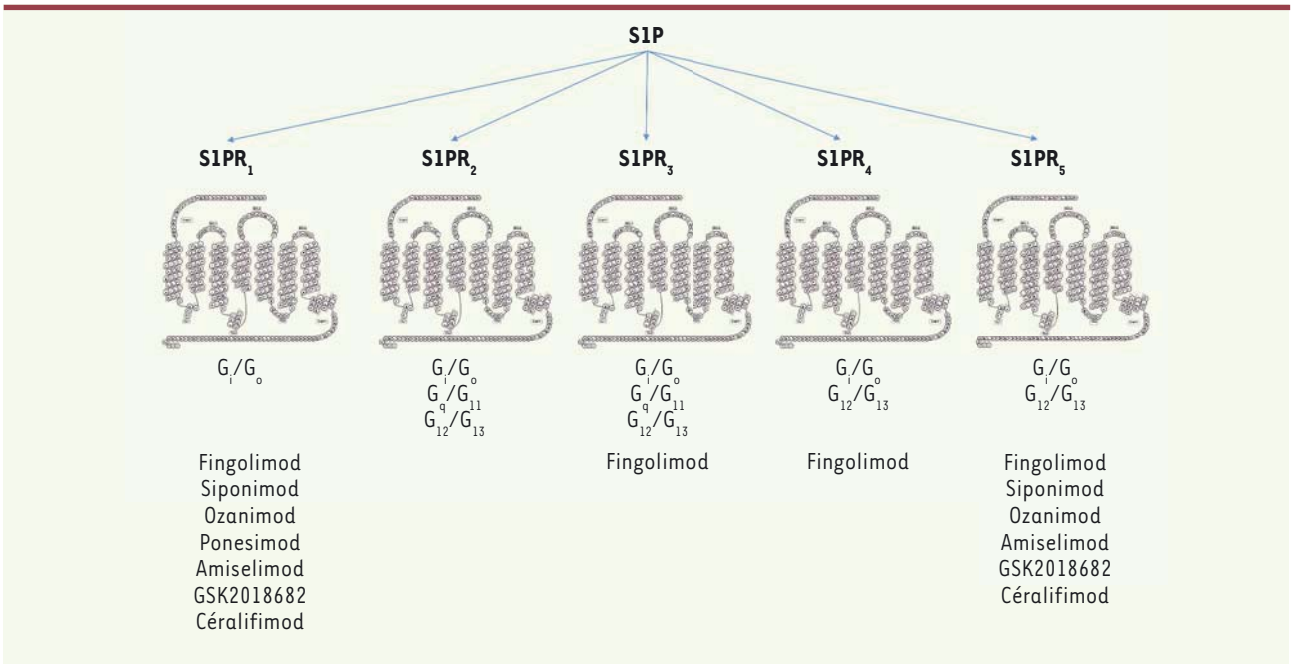


Figure 1. ***Activation des récepteurs de la sphingosine 1-phosphate par la sphingosine 1-phosphate et par les médicaments qui les ciblent.***

immunosuppressive extraite du champignon *Isaria sinclairii* utilisé dans la pharmacopée chinoise. Cette molécule a d'abord été utilisée dans le cadre de rejets aigus de greffe de rein, mais sans dépasser les essais cliniques de phase III pour cette indication, en raison d'absence d'effets thérapeutiques supérieurs à la thérapie de référence, et de la survenue d'effets secondaires délétères. Dans la SEP, le fingolimod est utilisé à des doses dix fois inférieures à celles utilisées en transplantation rénale, ce qui réduit les risques d'effets secondaires. Il permet de diminuer le nombre de rechutes cliniques et augmente les délais d'apparition des évènements conduisant à l'invalidité dans les formes récurrentes de SEP. Dans les formes primaires progressives, le fingolimod n'a néanmoins pas montré d'avantages par rapport à un placebo [15].

Il s'agit d'une prodrogue qui est phosphorylée par la sphingosine kinase 2 (SphK2) en fingolimod-P ou FTY720-P, une molécule qui mime les effets d'un médiateur lipidique naturel, la sphingosine-1-phosphate (S1P). Immunomodulateur, son principal mode d'action repose sur son effet sur le trafic des lymphocytes [13] : il favorise leur rétention dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires. L'inhibition de l'infiltration des lymphocytes dans le système nerveux central est ainsi une conséquence de leur rétention. Il agit en redistribuant de manière réversible les lymphocytes T et B de la circulation dans les organes lymphoïdes secondaires, tels que les ganglions lymphatiques périphériques et mésentériques et les plaques de Peyer (au niveau intestinal), provoquant un état de lymphopénie périphérique. Cette quasi absence de lymphocytes dans la circulation périphérique peut cependant avoir une conséquence délétère : le développement d'infections microbiennes opportunistes. Néanmoins, dans ce cas, l'arrêt du traitement permet une réactivation immédiate de la réponse immunitaire adaptative. La lymphopénie induite par le fingolimod ne correspond donc pas à une perte générale de lymphocytes dans tout l'organisme, contrairement à la véritable lymphopénie induite par irradiation ou traitement par l'alemtuzumab pour laquelle la restauration de l'immunité lymphocytaire nécessite une reconstitution du système immunitaire à partir des précurseurs cellulaires de la moelle osseuse.

Le fingolimod, la sphingosine 1-phosphate et les récepteurs de la sphingosine 1-phosphate

Structuralement, une fois phosphorylé, le fingolimod est un analogue de la sphingosine 1-phosphate (S1P) *(Figure 2)*.

La principale source de S1P est constituée par les érythrocytes et les cellules endothéliales [16]. Dans le sang, elle est véhiculée sous forme combinée à des protéines de transport, telles que les HDL (*high-density lipoprotein*, ~ 60 %) et l'albumine (~ 30 %), et dans une moindre mesure aux VLDL (*very low-density lipoprotein*) et aux LDL (*low-density lipoprotein*) [17]. Sa liaison aux HDL se réalise *via* l'apolipoprotéine ApoM qui agit comme une protéine chaperonne, contrôlant ainsi les niveaux de S1P dans le sang. Sa concentration est de l'ordre du micromolaire dans le plasma. Elle est moins importante dans les liquides des compartiments tissulaires, ce qui explique le gradient de concentration existant entre le sang et les tissus. La SP1 se lie, avec de fortes affinités (nanomolaires) à la famille de récepteurs de la S1P, initialement nommée famille de gènes

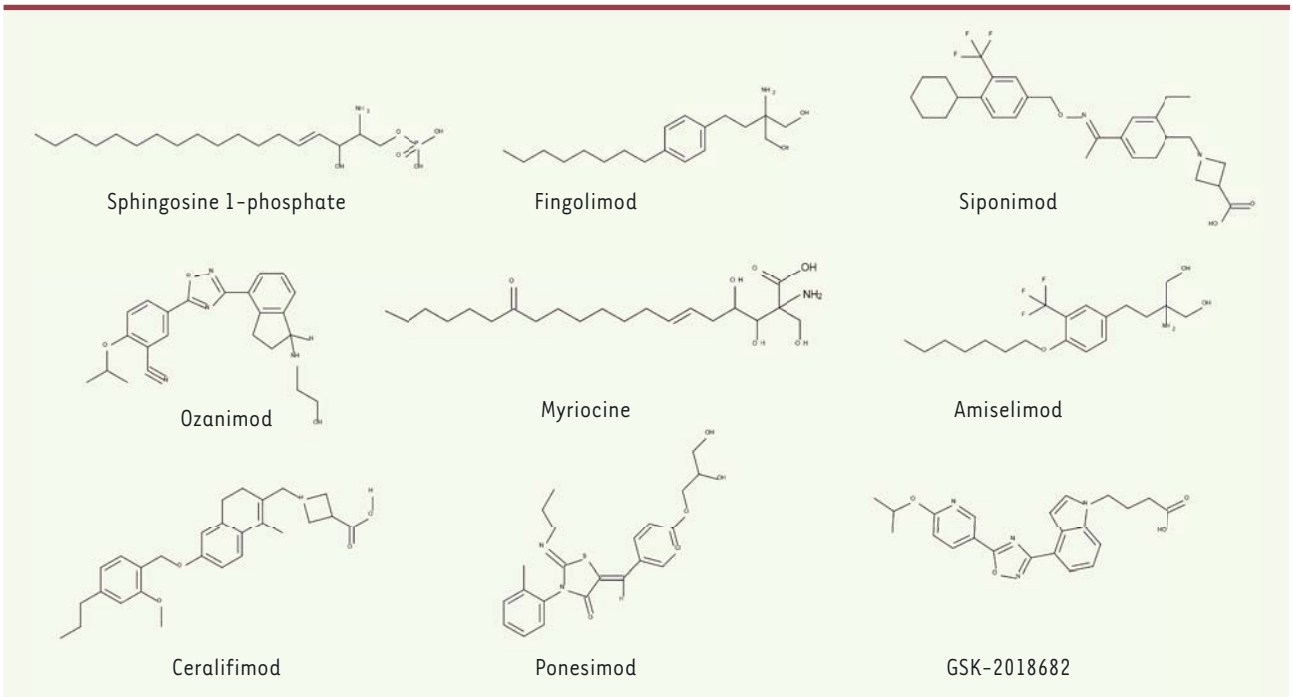


Figure 2. ***Structure de la sphingosine 1-phosphate et des médicaments ciblant les récepteurs de la sphingosine 1-phosphate et utilisés dans le traitement de la SEP.***

de différenciation endothéliale (EDG) des récepteurs lipidiques [18], qui compte cinq membres : $S1PR_{1-5}$ *(Figure 1)*. Ces cinq récepteurs partagent des similitudes de séquence et de structure génomique. Ils appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui sont impliqués dans de nombreux processus biologiques clés, tels que l'odorat, le goût et la vision [19]. Selon le séquençage du génome humain, 60 % des 800 RCPG identifiés appartiennent aux récepteurs dits olfactifs ou sensoriels. Les 40 % restants sont classés dans les cinq familles principales du système GRAFS (glutamate, rhodopsine, adhésion, *frizzled/taste2* et secrétine) [20]. Compte tenu de leur rôle dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, les RCPG sont devenus des cibles de choix pour le développement de nouveaux médicaments. Près de la moitié des médicaments commercialisés par l'industrie pharmaceutique ciblent en effet cette classe de récepteurs. Les récepteurs de la S1P font partie de la famille de la rhodopsine et sont couplés à différentes protéines G *(Figure 1)*. Leur liaison à la S1P induit l'activation de voies de signalisation variées impliquées dans les phénomènes de survie, croissance, migration et différenciation cellulaire [21] (➜).

(➜) Voir la Synthèse de O. Cuvillier, *m/s* n° 11, novembre 2012, page 951

Le récepteur $S1PR_1$ a été initialement détecté dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale (HUVEC) transformées par le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA). La voie de signalisation du $S1PR_1$ comprend le couplage à la famille de protéines Gi/o et donc l'inhibition de l'adénylate cyclase (ou adénylyl cyclase), l'activation de la phosphoinositide 3-kinase et de la phospholipase C. Chez la souris, l'analyse des transcrits codant $S1PR_1$ montre que ce récepteur est fortement exprimé dans le tissu adipeux, la rate, le poumon, le cerveau, le foie et le cœur, et faiblement dans le muscle squelettique, le thymus, l'utérus et les reins [22]. La délétion du gène $S1pr_1$ dans la lignée germinale de souris entraîne la létalité *in utero* [23]. En fait, le récepteur $S1PR_1$ joue un rôle vital dans le développement vasculaire et la létalité chez la souris est due à un défaut du développement des vaisseaux sanguins. $S1PR_1$ a également une fonction essentielle dans la migration cellulaire, en particulier dans le drainage des lymphocytes T du thymus vers le sang et les structures lymphoïdes environnantes [24].

Plusieurs études ont révélé l'expression des récepteurs S1PR dans le système nerveux central [25], plus précisément à la surface des astrocytes chez l'homme, et dans l'endothélium chez l'homme et les rongeurs. Les récepteurs $S1PR_{2-4}$ seraient, quant à eux, largement distribués et l'expression de $S1PR_5$ serait restreinte au cerveau et aux lymphocytes T. La localisation de ces récepteurs reste toutefois difficile à déterminer, la production d'anticorps spécifiques n'étant pas aisée [26-28].

$S1PR_2$ auquel ne se lie pas le fingolimod, est exprimé en particulier par les macrophages et les cellules progénitrices d'oligodendrocytes [29]. Chez la souris, l'inactivation du gène $S1pr_2$ permet de réduire la démyélinisation et d'augmenter la remyélinisation dans un modèle murin de SEP [30]. Cet effet très positif est cependant contrebalancé par l'apparition de lymphomes à lymphocytes B [31].

$S1PR_5$ est principalement exprimé dans la substance blanche tout au long du développement de la lignée des oligodendrocytes et dans les oligodendrocytes matures [32]. Il est aussi présent au niveau des capillaires cérébraux et son rôle dans la fonction de barrière endothéliale du cerveau a été suggéré [33]. La signalisation induite par $S1PR_5$ comprend le couplage à des protéines $G_{i/o}$ et $G_{12/13}$.

Mécanisme d'action du fingolimod

Le traitement thérapeutique qui repose sur le fingolimod est associé à sa phosphorylation *in vivo* par la sphingosine kinase-2 qui produira le fingolimod-P (FTY720-P). Contrairement à la S1P, le fingolimod est principalement transporté dans le sang en association avec l'albumine. Le FTY720-P est un véritable agoniste car il a la capacité d'activer ses récepteurs et d'induire une cascade d'évènements cellulaires. C'est aussi un antagoniste fonctionnel. En effet, après sa liaison aux récepteurs présents à la surface des lymphocytes, le FTY720-P induit l'internalisation des récepteurs et leur dégradation dans les compartiments intracellulaires [34], dégradation qui ne serait pas compensée par leur néosynthèse. Le FTY720-P est un puissant activateur de l'ubiquitination du récepteur $S1PR_1$. Cette modification, mise en évidence dans une étude réalisée sur les cellules 293 de rein embryonnaire humain (HEK) [35], entraîne une dégradation rapide et quantitative du récepteur. La capacité des agonistes pharmacologiques à induire la dégradation de $S1PR_1$, mais aussi des autres récepteurs, pourrait ainsi expliquer leurs propriétés immunosuppressives : après leur internalisation et leur dégradation, leur absence de la membrane conduirait à l'impossibilité pour les lymphocytes activés de « sentir » le gradient de S1P et donc à leur séquestration dans le thymus et les organes lymphoïdes secondaires. L'activation des récepteurs par le FTY720-P permettrait également d'accroître le rôle de barrière des cellules endothéliales [36]. Bien que qualifiées de non spécifiques car activées par des concentrations très importantes de produit, de l'ordre du µM, des cibles intracellulaires ont aussi été décrites pour le fingolimod et le fingolimod-P. Le fingolimod inhibe en effet des enzymes clés du métabolisme du céramide [36], modulant ainsi les effets pro-inflammatoires de cette classe de molécules dans le cadre du traitement de la SEP.

Les modulateurs des S1PR de deuxième génération

Les effets secondaires [36] occasionnés par l'administration journalière de fingolimod ont incité l'industrie pharmaceutique à développer des principes actifs possédant un meilleur profil de sécurité, une meilleure sélectivité et une durée de vie pharmacocinétique réduite. Le fingolimod est associé à une diminution transitoire de la fréquence cardiaque (brady-arythmie) ainsi qu'à des retards de conduction auriculo-ventriculaire. De même, dans un modèle animal et sur cœur perfusé [37], il a été montré que le récepteur $S1PR_3$ était impliqué dans la régulation du rythme cardiaque. Des effets indésirables cardiaques, dont des décès ont ainsi été rapportés chez des patients présentant déjà une maladie cardiaque. Des contre-indications ont donc été émises pour les patients ayant présenté, entre autres, un infarctus du myocarde ou une arythmie cardiaque sévère.

Des molécules ayant une meilleure sélectivité que le fingolimod tout en gardant une voie d'administration orale ont été développées *(Figure 2)*. Le ponesimod et l'amiselimod ciblent principalement les récepteurs $S1PR_1$. D'autres molécules ciblent à la fois les récepteurs $S1PR_1$ et $S1PR_5$, telles le siponimod, l'ozanimod, le ceralifimod, le GSK2018682. Ces modulateurs ne ciblant pas $S1PR_3$, les effets secondaires cardiaques pourraient être évités. L'activation de $S1PR_5$ aurait également un effet neuroprotecteur sur les oligodendrocytes. Certaines de ces molécules ont une activité immunomodulatrice intrinsèque qui ne nécessite pas de phosphorylation *in vivo* comme le fingolimod, ce qui permet d'éviter les effets éventuels hors du contexte des récepteurs que présente le fingolimod. Le siponimod (*Mayzent®*) vient ainsi d'être autorisé par la *Food and drug administration* (FDA) américaine, dans le cadre du traitement de la SEP secondairement progressive, en plus de ses indications dans la SEP rémittente [5]. Une analyse de progression d'incapacité à 3 mois révèle que ce médicament permet de réduire de façon significative le risque de progression de la maladie.

Vers des médicaments curatifs de la SEP

Remyéliniser les axones

La démyélinisation et les lésions axonales ont un rôle critique dans la survenue des déficits neurologiques des patients atteints de SEP. Un processus naturel permet la remyélinisation après l'apparition des dommages axonaux. Malheureusement, ce processus ne permet pas de compenser les atteintes dues à la progression des attaques auto-immunes. Les voies de recherche curative se focalisent donc sur des éléments qui permettraient de stopper la démyélinisation ou d'aider à la réparation ou à la régénération de la gaine de myéline [38].

Des travaux sont ainsi en cours concernant le rôle des histones déacétylases (HDAC) dans la myélinisation des axones. La délétion du gène codant une HDAC (l'HDAC11) permet d'améliorer les symptômes cliniques dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle murin de SEP [39]. L'inhibition de l'expression de cette protéine aurait un effet positif sur la différenciation des cellules précurseurs d'oligodendrocytes et des cellules souches neuronales et donc aiderait à la reconstruction de la gaine de myéline.

L'opicinumab®, un anticorps monoclonal spécifique de Lingo-1 (*leucine-rich repeat and immunoglobulin-like domain-containing protein 1*), une protéine extrêmement conservée présente au niveau de la gaine de myéline, a été testé [40]. Cet anticorps, qui inhibe Lingo-1, stimule la prolifération et la différenciation

des cellules précurseurs d'oligodendrocytes que cette protéine bloque [40]. Chez l'animal, après administration de cet anticorps, on observe une moindre destruction des gaines de myéline, une meilleure préservation des fibres nerveuses, une atténuation des signes cliniques, et une remyélinisation plus efficace. Des essais cliniques ont été réalisés et une amélioration de la conduction du nerf optique a été observée dans la névrite optique [41]. Malheureusement, aucun effet n'a été obtenu dans la SEP rémittente [42]. Les essais cliniques se poursuivent en introduisant des critères d'inclusion mieux adaptés.

La clémastine, un antagoniste antihistaminique des récepteurs H1 de l'histamine, a également montré des effets remyélinisants dans des modèles expérimentaux animaux. Chez des patients atteints de neuropathie optique chronique, on a pu observer une amélioration de leur état et des essais cliniques sont toujours en cours [43].

Les S1PR sont exprimés par de nombreuses cellules impliquées dans la myélinisation (cellules microgliales, oligodentrocytes, cellules progénitrices d'oligodendrocytes) [44]. Dans un modèle *in vitro* de démyélinisation induite chimiquement sur des cultures de sphéroïdes de télencéphale de rat, l'activation des S1PR par le fingolimod ou le siponimod permet d'augmenter l'expression des marqueurs de remyélinisation [45]. *In vivo*, dans un modèle murin, le fingolimod favorise la régénération nerveuse du nerf sciatique et, *ex vivo*, il stimule la production de myéline [46]. Cet effet de stimulation n'a cependant pas été confirmé dans le modèle animal d'induction de démyélinisation par la cuprizone [47], bien qu'un effet neuroprotecteur ait été observé, y compris avec le siponimod [48]. Les S1PR et leurs modulateurs, en développement, représentent ainsi un champ d'étude très intéressant dans un contexte protecteur, mais également stimulateur de myélinisation.

La biotine (ou vitamine B7) à haute dose, c'est-à-dire à des concentrations mille fois supérieures à celles recommandées pour un sujet sain, permet de réduire les symptômes des SEP progressives primaires et secondaires. La biotine activerait des enzymes impliqués dans la biosynthèse de la myéline et dans la production d'énergie dans les axones démyélinisés [49]. Elle est actuellement délivrée par les pharmacies hospitalières à des patients déjà traités en attendant une demande formelle d'autorisation de mise sur le marché.

Les thérapies fondées sur les cellules souches

Initié il y a déjà une vingtaine d'années, le traitement de la SEP à l'aide de cellules souches reste une voie encore prometteuse. Deux procédures ont été décrites [50].

La première fait appel à une immuno-ablation chimique à l'aide de cyclophosphamide et de rATG (une préparation d'immunoglobulines anti-thymocytes) [51, 52] suivie d'une transplantation autologue de cellules souches hématopoïétiques (aHSC). L'immuno-ablation par irradiation du corps entier n'est plus réalisée, en raison de toxicités sévères. Cette thérapie immuno-ablative, suivie d'une thérapie immuno-reconstitutive à l'aide de cellules hématopoïétiques, est considérée comme permettant au système immunitaire du patient de reprendre un état pré-pathologique. L'entrée en phase aplasique, caractérisée par un taux extrêmement bas de cellules hématopoïétiques dans le sang, nécessite l'administration en parallèle de traitements antiviraux et antibactériens. De nombreux essais cliniques ont été réalisés chez des patients présentant une SEP très active et réfractaire aux traitements pour lesquels cette thérapie a permis d'induire des rémissions et une amélioration de leur état [51-53]. L'efficacité et la sûreté des traitements sur le long terme nécessitent cependant encore d'être évaluées.

La deuxième thérapie est également une thérapie cellulaire. Elle repose sur l'injection aux patients de cellules multipotentes possédant à la fois des propriétés immunomodulatrices et régénératrices. Des études précliniques ont été réalisées à l'aide de cellules souches mésenchymateuses (MSC), neuronales (NSC), embryonnaires (hESC) ou pluripotentes inductibles (iPSC) [50]. Dans le modèle de souris présentant une encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), l'injection de MSC conduit à la diminution de l'infiltration des cellules immunitaires, de la démyélinisation et des dommages axonaux. Chez l'homme, de nombreuses études, réalisées dans des cohortes réduites, ont permis d'explorer la faisabilité et la sécurité de la transplantation de ces cellules. Leur injection à des patients s'est révélée avoir un bon profil de sécurité, mais une efficacité très variable [54]. Un essai clinique multicentrique de phase I/II, appelé MESEMS (*mesenchymal stem cell for multiple sclerosis*) actuellement en cours [55] devrait permettre d'évaluer avec certitude le profil de sécurité et l'efficacité de ce traitement. Les autres types de cellules souches sont l'objet de recherches qui sont essentiellement au stade préclinique avec quelques essais de sécurité chez l'homme [56]. Si peu d'effets secondaires défavorables ont été observés avec ces thérapies cellulaires, il existe néanmoins, sur le long terme, un risque non négligeable de transformation maligne.

Les voies de recherche de traitements palliatifs et curatifs de la SEP sont prometteuses. Les causes de la démyélinisation sont multiples. Elles reposent sur les lymphocytes T, les lymphocytes B et la sécrétion d'anticorps, ainsi que sur la production de cytokines. La connaissance des mécanismes à l'origine de l'infiltration anormale des cellules immunitaires à travers la barrière immuno-encéphalique reste essentielle. La compréhension globale des phénomènes inflammatoires et immunitaires participant à la pathogenèse de la SEP permettra ainsi de traiter de manière durable et peut-être d'éviter l'apparition de la maladie. ◊

SUMMARY

Multiple sclerosis and immuno-modulators of sphingosine 1-phosphate receptors

Multiple sclerosis (MS) is a disease of the central nervous system with a very debilitating inflammatory component that usually affects young people (years 20-40).

This disease is characterized by the progressive destruction of the myelin sheath of the axons by the cells of the immune system, which results in neuronal degeneration. The T and B lymphocytes are the main players in this disease, which can be remittent with relapses or progressive. Among the drugs used to treat MS is the immunosuppressor fingolimod, the targets of which are the sphingosine 1-phosphate receptors. This molecule acts orally by preventing lymphocytes from leaving the thymus and lymph nodes and from reaching inflammatory brain foci. Other immunosuppressive drugs affecting sphingosine 1-phosphate receptors are under development and an intense search for curative drugs and treatments is being conducted. ◊

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, *et al.* Multiple sclerosis. *Lancet* 2018 ; 391 : 1622-36.
2. Zephir H. Progress in understanding the pathophysiology of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)* 2018 ; 174 : 358-63.
3. Brambilla R. The contribution of astrocytes to the neuroinflammatory response in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol* 2019 ; 137 : 757-83.
4. Cornaby C, Gibbons L, Mayhew V, *et al.* B cell epitope spreading: mechanisms and contribution to autoimmune diseases. *Immunol Lett* 2015 ; 163 : 56-68.
5. Kappos L, Bar-Or A, Cree BAC, *et al.* Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet* 2018 ; 391 : 1263-73.
6. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, *et al.* Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011 ; 69 : 292-302.
7. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, *et al.* Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 2018 ; 17 : 162-73.
8. Cortese R, Collorone S, Ciccarelli O, Toosy AT. Advances in brain imaging in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* 2019 ; 12 : 1756286419859722.
9. Weber MS, Hohlfeld R, Zamvil SS. Mechanism of action of glatiramer acetate in treatment of multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* 2007 ; 4 : 647-53.
10. Gelfand JM, Cree BAC, Hauser SL. Ocrelizumab and other CD20+ B-cell-depleting therapies in multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* 2017 ; 14 : 835-41.
11. Papeix C, Lubetzki C. Anticorps monoclonaux dans la sclérose en plaques. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 1113-5.
12. Brown JWL, Coles A, Horakova D, *et al.* Association of initial disease-modifying therapy with later conversion to secondary progressive multiple sclerosis. *JAMA* 2019 ; 321 : 175-87.
13. Rommer PS, Milo R, Han MH, *et al.* Immunological aspects of approved MS therapeutics. *Front Immunol* 2019 ; 10 : 1564.
14. Holmoy T, Fevang B, Olsen DB, *et al.* Adverse events with fatal outcome associated with alemtuzumab treatment in multiple sclerosis. *BMC Res Notes* 2019 ; 12 : 497.
15. Lublin F, Miller DH, Freedman MS, *et al.* Oral fingolimod in primary progressive multiple sclerosis (INFORMS): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2016 ; 387 : 1075-84.
16. Gazit SL, Mariko B, Therond P, *et al.* Platelet and erythrocyte sources of S1P are redundant for vascular development and homeostasis, but both rendered essential after plasma S1P depletion in anaphylactic shock. *Circ Res* 2016 ; 119 : e110-26.
17. Proia RL, Hla T. Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *J Clin Invest* 2015 ; 125 : 1379-87.
18. Blaho VA, Chun J. Crystal clear? Lysophospholipid receptor structure insights and controversies. *Trends Pharmacol Sci* 2018 ; 39 : 953-66.
19. Sarramegna V, Muller I, Milon A, Talmont F. Recombinant G protein-coupled receptors from expression to renaturation: a challenge towards structure. *Cell Mol Life Sci.* 2006 ; 63 : 1149-64.
20. Schioth HB, Fredriksson R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol* 2005 ; 142 : 94-101.
21. Cuvillier O. Les récepteurs de la sphingosine 1-phosphate : de la biologie à la physiopathologie. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 951-7.
22. Alexander SPH, Christopoulos A, Davenport AP, *et al.* The concise guide to pharmacology 2019/20: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 2019 ; 176 (suppl 1) : S21-141.
23. Liu Y, Wada R, Yamashita T, *et al.* Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest* 2000 ; 106 : 951-61.
24. Schwab SR, Cyster JG. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 1295-301.
25. Healy LM, Antel JP. Sphingosine-1-phosphate receptors in the central nervous and immune systems. *Curr Drug Targets* 2016 ; 17 : 1841-50.
26. Talmont F, Mouledous L. Evaluation of commercial antibodies against human sphingosine-1-phosphate receptor 1. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2014 ; 387 : 427-31.
27. Talmont F, Mouledous L, Baranger M, *et al.* Development and characterization of sphingosine 1-phosphate receptor 1 monoclonal antibody suitable for cell imaging and biochemical studies of endogenous receptors. *PLoS One* 2019 ; 14 : e0213203.
28. Talmont F, Mouledous L, Boue J, *et al.* Denatured G-protein coupled receptors as immunogens to generate highly specific antibodies. *PLoS One* 2012 ; 7 : e46348.
29. Adada M, Canals D, Hannun YA, Obeid LM. Sphingosine-1-phosphate receptor 2. *FEBS J* 2013 ; 280 : 6354-66.
30. Seyedsadr MS, Weinmann O, Amorim A, *et al.* Inactivation of sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2) decreases demyelination and enhances remyelination in animal models of multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 2019 ; 124 : 189-201.
31. Cattoretti G, Mandelbaum J, Lee N, *et al.* Targeted disruption of the S1P2 sphingosine 1-phosphate receptor gene leads to diffuse large B-cell lymphoma formation. *Cancer Res* 2009 ; 69 : 8686-92.
32. Jaillard C, Harrison S, Stankoff B, *et al.* Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J Neurosci* 2005 ; 25 : 1459-69.
33. Van Doorn R, Lopes Pinheiro MA, Kooij G, *et al.* Sphingosine 1-phosphate receptor 5 mediates the immune quiescence of the human brain endothelial barrier. *J Neuroinflammation* 2012 ; 9 : 133.
34. Graler MH, Goetzl EJ. The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. *FASEB J* 2004 ; 18 : 551-3.
35. Oo ML, Thangada S, Wu MT, *et al.* Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 9082-9.
36. Huwiler A, Zangemeister-Wittke U. The sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod as a therapeutic agent: Recent findings and new perspectives. *Pharmacol Ther* 2018 ; 185 : 34-49.
37. Sanna MG, Vincent KP, Repetto E, *et al.* Bitopic sphingosine 1-phosphate receptor 3 (S1P3) antagonist rescue from complete heart block: pharmacological and genetic evidence for direct S1P3 regulation of mouse cardiac conduction. *Mol Pharmacol* 2016 ; 89 : 176-86.
38. Kremer D, Gottle P, Flores-Rivera J, *et al.* Remyelination in multiple sclerosis: from concept to clinical trials. *Curr Opin Neurol* 2019 ; 32 : 378-84.
39. Sun L, Telles E, Karl M, *et al.* Loss of HDAC11 ameliorates clinical symptoms in a multiple sclerosis mouse model. *Life Sci Alliance* 2018 ; 1 : e201800039.
40. Mi S, Miller RH, Lee X, *et al.* LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci* 2005 ; 8 : 745-51.
41. Cadavid D, Balcer L, Galetta S, *et al.* Safety and efficacy of opicinumab in acute optic neuritis (RENEW): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol* 2017 ; 16 : 189-99.
42. Cadavid D, Mellion M, Hupperts R, *et al.* Safety and efficacy of opicinumab in patients with relapsing multiple sclerosis (SYNERGY): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol* 2019 ; 18 : 845-56.
43. Green AJ, Gelfand JM, Cree BA, *et al.* Clemastine fumarate as a remyelinating therapy for multiple sclerosis (ReBUILD): a randomised, controlled, double-blind, crossover trial. *Lancet* 2017 ; 390 : 2481-9.
44. Bordet R, Camu W, De Seze J, *et al.* Mechanism of action of s1p receptor modulators in multiple sclerosis: the double requirement. *Rev Neurol (Paris)* 2019 ; Nov 19. pii: S0035-3787(18)30499-5.
45. Jackson SJ, Giovannoni G, Baker D. Fingolimod modulates microglial activation to augment markers of remyelination. *J Neuroinflammation* 2011 ; 8 : 76.
46. Szepanowski F, Derksen A, Steiner I, *et al.* Fingolimod promotes peripheral nerve regeneration via modulation of lysophospholipid signaling. *J Neuroinflammation* 2016 ; 13 : 143.
47. Kim HJ, Miron VE, Dukala D, *et al.* Neurobiological effects of sphingosine 1-phosphate receptor modulation in the cuprizone model. *FASEB J* 2011 ; 25 : 1509-18.
48. Gentile A, Musella A, Bullitta S, *et al.* Siponimod (BAF312) prevents synaptic neurodegeneration in experimental multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 2016 ; 13 : 207.
49. Sedel F, Papeix C, Bellanger A, *et al.* High doses of biotin in chronic progressive multiple sclerosis: a pilot study. *Mult Scler Relat Disord* 2015 ; 4 : 159-69.

RÉFÉRENCES

50. Cuascut FX, Hutton GJ. Stem cell-based therapies for multiple sclerosis: current perspectives. *Biomedicines* 2019 ; 7.

51. Burt RK, Balabanov R, Burman J, *et al.* Effect of nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation vs continued disease-modifying therapy on disease progression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomized clinical trial. *Jama* 2019 ; 321 : 165-74.

52. Kvistad SAS, Lehmann AK, Trovik LH, *et al.* Safety and efficacy of autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis in Norway. *Mult Scler* 2019 : 1352458519893926.

53. Muraro PA, Pasquini M, Atkins HL, *et al.* Long-term outcomes after autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis. *JAMA Neurol* 2017 ; 74 : 459-69.

54. Mansoor SR, Zabihi E, Ghasemi-Kasman M. The potential use of mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis. *Life Sci* 2019 ; 235 : 116830.

55. Uccelli A, Laroni A, Brundin L, *et al.* Mesenchymal stem cells for multiple sclerosis (MESEMS): a randomized, double blind, cross-over phase I/II clinical trial with autologous mesenchymal stem cells for the therapy of multiple sclerosis. *Trials* 2019 ; 20 : 263.

56. Shroff G. A review on stem cell therapy for multiple sclerosis: special focus on human embryonic stem cells. *Stem Cells Cloning* 2018 ; 11 : 1-11.

TIRÉS À PART

O. Cuvillier

www.myobase.org

Catalogue en ligne disponible gratuitement sur Internet publié par l'AFM-Téléthon. Retrouvez facilement toutes les références bibliographiques sur les maladies neuromusculaires, les situations de handicap qu'elles génèrent et leurs aspects psychologiques.

Myobase donne un accès libre à 75 % du fonds documentaire collecté depuis 1990, représentant plus de 40 000 références spécifiques du domaine des maladies neuromusculaires.

> **articles** de la littérature biomédicale et psycho-sociale

> **livres, thèses**

> **guides** d'associations et **rapports** institutionnels d'agences internationales

> **brèves en français**, synthèses des articles médico-scientifiques internationaux les plus pertinents

> **publications AFM-Téléthon** destinées aux professionnels de santé ou aux personnes atteintes de maladie neuromusculaire et à leur entourage

UN OUTIL ERGONOMIQUE, UNE INTERFACE BILINGUE

- Laissez-vous guider par les **tutoriels**
- Lancez une **recherche** et affinez votre sélection grâce aux filtres

TOUT **MYOBASE**

Rechercher... Ok

Recherche avancée

Histo

FILTRES

Type de document

- Article [3443]
- Publication AFM [176]
- Thèse/Mémoire [107]
- Brève [102]

▸ PUBLICATIONS AFM-Téléthon

▸ BRÈVES

▸ DOCUMENTS DE SYNTHÈSE

▸ INSTITUT DES BIOTHÉRAPIES PUBLICATIONS

- **Partagez** les résultats de votre recherche

UN ACCÈS facile et simple

Rechercher avec des opérateurs :

- guillemets pour une expression **"maladie de pompe"**
- **+** pour signifier **ET**, et retrouver tous les documents contenant les deux mots **"fauteuil +électrique"**
- **-** pour signifier **NON** et enlever le mot de la recherche : **"autonomie -établissement"**

Fils RSS
Les Fils RSS vous permettent de suivre quotidiennement les nouveautés de Myobase, mais aussi ...

Alertes Myobase
Les Alertes rassemblent une sélection des dernières acquisitions de Myobase et paraissent deux fo...

Veille Neuromusculaire
Publiée tous les 15 jours par le Service de documentation de l'AFM-Téléthon, La " V...

- Cliquez sur **l'onglet thématique** qui vous convient (haut de la page d'accueil)
- Créez vos alertes personnalisées en ouvrant un **compte personnel**
- Téléchargez la **Veille Neuromusculaire**
- Abonnez-vous aux **flux RSS**

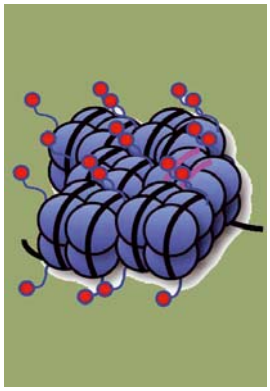
médecine/sciences 2020 ; 36 : 253-60

Les rétrovirus endogènes

Un rôle clé dans la programmation des lymphocytes T CD4

Véronique Adoue, Olivier Joffre

> Les lymphocytes T CD4 jouent un rôle clé dans le maintien de l'intégrité de l'organisme contre les dangers endogènes et exogènes. Ces cellules représentent donc un espoir thérapeutique majeur dans de nombreuses situations physiopathologiques. Dans cette synthèse, nous discuterons des mécanismes moléculaires qui définissent l'identité et les fonctions de ces cellules en réponse aux signaux de l'environnement. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux voies épigénétiques qui coordonnent leur différenciation et leur plasticité. Des données récentes de la littérature suggèrent qu'elles pourraient agir en régulant l'activité de séquences dérivées de rétrovirus endogènes qui auraient été cooptées en modules *cis*-régulateurs de gènes pour le bénéfice de l'hôte. <



Centre de Physiopathologie
Toulouse Purpan,
Inserm U1043 - BP 3028,
31024 Toulouse Cedex 3, France.
olivier.joffre@inserm.fr

Les lymphocytes T CD4 sont des cellules immunitaires extrêmement efficaces pour protéger l'organisme contre les dangers exogènes, tels que les virus, les bactéries ou les parasites. De nombreuses données de la littérature montrent aussi que ces cellules ont un rôle clé dans le processus d'immunosurveillance qui limite l'apparition et le développement de tumeurs [1]. Leur manipulation est donc porteuse d'immenses espoirs en clinique humaine, notamment en cancérologie et dans le domaine des maladies infectieuses. L'efficacité des lymphocytes T CD4 dépend de leur capacité à adapter leur phénotype et leurs fonctions au type de danger détecté par les cellules de l'immunité innée. Selon la nature de la menace, les cellules présentes dans les tissus lésés émettent en effet des signaux moléculaires différents qui engagent les lymphocytes T CD4 naïfs dans des lignages fonctionnellement distincts appelés *T helper* (Th) [2,3]. Nous allons ici discuter des mécanismes moléculaires qui contrôlent l'activation, la différenciation et la plasticité des lymphocytes T. Nous nous intéresserons tout d'abord aux voies de régulation épigénétiques dépendant de la marque H3K9me3, qui correspond à la triméthylation de l'histone H3 sur sa lysine 9, et aux éléments génomiques impliqués dans ces processus. Nous envisagerons enfin comment les découvertes récentes pourraient se traduire en avancées thérapeutiques dans un avenir proche.

Activation et différenciation des lymphocytes T CD4

Les lymphocytes T CD4 sont donc des cellules extrêmement plastiques, capables d'ajuster qualitativement et quantitativement leur programmation afin de délivrer une réponse adaptée au danger détecté. Lors d'une infection par un agent pathogène intracellulaire, l'IFN-γ (interféron-γ) et l'IL(interleukine)-12 produits notamment par les cellules de l'immunité innée, coordonnent par exemple un programme développemental qui aboutit à la différenciation des lymphocytes en cellules Th1, notamment caractérisées par l'expression du facteur de transcription T-bet et par la production d'IFN-γ *(Figure 1)*. En revanche, si un helminthe (vers parasite intestinal) pénètre dans l'organisme, les lymphocytes T CD4 spécifiques de ce pathogène se différencieront vers un phénotype Th2. Ils exprimeront alors GATA-3 et produiront des quantités importantes d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13.

Quel que soit le lignage T *helper* considéré, la différenciation des lymphocytes T CD4 obéit à un même schéma *(Figure 1)*. Leur activation initiale nécessite l'intégration de trois types de signaux [4,5]. Le signal antigénique, exposé sous la forme de complexes entre les molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) et des peptides provenant du pathogène à la surface des cellules dendritiques (DC), garantit la spécificité de la réponse immunitaire. Il est détecté par les lymphocytes T grâce à leur récepteur de l'antigène (*T Cell Receptor*, TCR). Le deuxième signal, dit « de co-stimulation », implique l'interaction entre les molécules CD28 et CD80 ou CD86, exprimées respec-

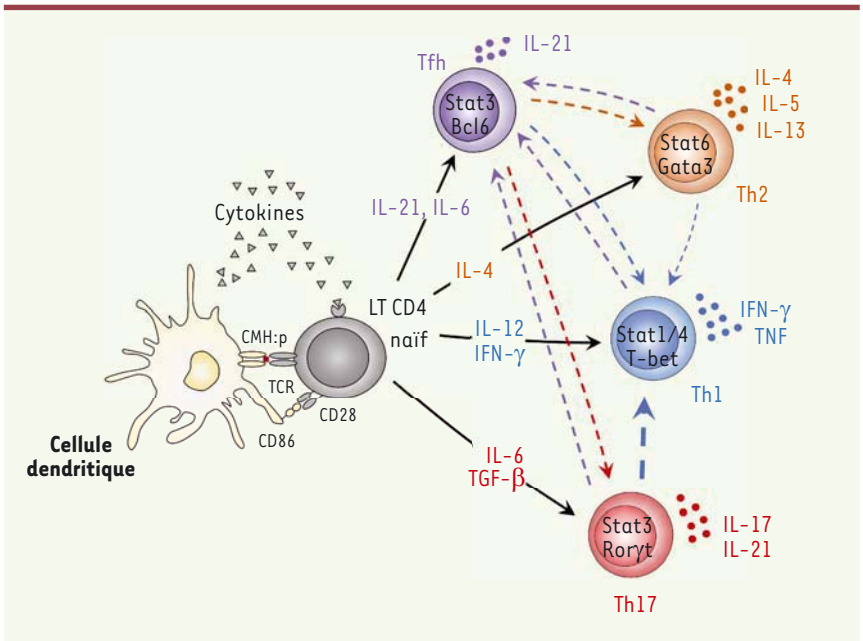


Figure 1. ***Hétérogénéité et plasticité du compartiment T CD4.*** L'intégration du signal antigénique (CMH:p/TCR), du signal de co-stimulation (CD86/CD28) et du signal polarisant (cytokines) permet au lymphocyte T CD4 naïf de se différencier vers le phénotype T helper (Th) adapté au danger (seules les principales populations de Th sont représentées). Lors de leur différenciation, les lymphocytes T perdent en potentialité mais conservent une certaine plasticité, variable selon les lignages. Ces processus d'engagement, de détermination et de plasticité cellulaire sont sous le contrôle de mécanismes de régulation épigénétique, à l'interface entre l'environnement et le génome (adaptée de [3]).

tivement à la membrane des lymphocytes T et des DC. Il a notamment un rôle clé dans la survie cellulaire et la régulation du métabolisme énergétique. Le troisième signal prend souvent la forme de cytokines sécrétées par les cellules dendritiques ou par des cellules tierces. Il est qualifié de polarisant car il instruit le choix du lignage de la cellule. Ce sont donc les facteurs de transcription mobilisés en aval des récepteurs des cytokines qui vont conférer la spécificité de programmation à chaque lignage T helper.

La plupart des récepteurs des cytokines impliqués dans la programmation des lymphocytes T CD4 activent des évènements de signalisation qui aboutissent à l'activation des protéines STAT (*signal transducer and activator of transcription*)[6]. C'est notamment le cas des récepteurs de l'IL-12 et de l'IFN-γ qui coordonnent l'engagement des lymphocytes T naïfs dans le lignage Th1 en mobilisant respectivement STAT-4 et STAT-1. Une fois activés par les tyrosines kinases JAK (*Janus kinase*), ces facteurs de transcription vont rejoindre le noyau afin d'induire l'expression du *master regulator* spécifique du lignage (*e.g.* T-bet, pour le lignage Th1 ; GATA-3, pour le phénotype Th2) et d'initier l'expression des cytokines effectrices [6]. Sous l'effet du *master regulator* et des protéines STAT mobilisées par les cytokines sécrétées par les lymphocytes T et les cellules du microenvironnement, un ensemble restreint de facteurs de transcription se met en place. C'est ce réseau de régulateurs transcriptionnels qui coordonne de façon dynamique le programme développemental qui permettra *in fine* aux lymphocytes T d'acquérir des fonctions effectrices propres au lignage, et adaptées à l'éradication du danger.

Une fois différenciés, et selon le contexte physiopathologique, les lymphocytes T *helper* vont devoir transmettre leur programmation à leur descendance sur de multiples cycles de division, notamment lors de la phase d'expansion clonale qui permet à une cellule spécifique d'un danger de générer des millions de cellules filles identiques et de même spécificité. Conserver la programmation établie lors de l'activation initiale est aussi nécessaire pour que les lymphocytes T mémoires puissent garantir une protection efficace de l'organisme à long terme, même dans un environnement cytokinique différent. En théorie, le répertoire de facteurs de transcription mobilisé lors de l'étape d'activation par les cellules dendritiques devrait être suffisant pour définir et maintenir l'identité des lymphocytes T *helper*. Les boucles de retrocontrôle positif qui se mettent en place permettent en effet à ces molécules d'être exprimées de façon stable, à travers les cycles de division cellulaire. En réalité, l'activité des facteurs de transcription est fortement conditionnée par le contexte nucléaire dans lequel ils agissent. Leur recrutement sur les régions *cis*-régulatrices des locus d'intérêt, tels que les promoteurs ou les *enhancers*, s'accompagne d'un remodelage massif mais ciblé de la chromatine. Cette réorganisation a un impact immédiat sur l'activité des autres facteurs de transcription et conditionne, à plus long terme, la réponse de la cellule aux signaux environnementaux. Ce remodelage épigénétique, initié par les facteurs de transcription et orchestré par des acteurs moléculaires qui restent encore largement à identifier, joue un rôle clé dans la biologie des lymphocytes T CD4 [2,7]. En rendant accessibles les locus spécifiques du lignage aux facteurs *trans,* il permet, par exemple, une forte expression des gènes d'intérêt tels que ceux qui codent les cytokines effectrices. À l'inverse, les facteurs de transcription mobilisés vont aussi verrouiller des locus propres aux phénotypes alternatifs. Ces mécanismes de répression génique ont un rôle causal dans la définition de l'identité des lymphocytes T [7–10]. Ceci explique

pourquoi ces mécanismes de régulation épigénétique sont aujourd'hui l'objet de beaucoup d'attention. Mieux les caractériser pourrait en effet permettre d'identifier des molécules chromatiniennes sur lesquelles agir afin de stimuler la génération de lymphocytes T mémoires dans un contexte vaccinal. Dans des situations physiopathologiques dans lesquelles la plasticité des lymphocytes T est délétère pour l'organisme, comme lorsque l'environnement tumoral désarme les lymphocytes Th1 censés éradiquer la tumeur, caractériser les voies de régulation épigénétique qui contrôlent l'ouverture et la fermeture de la chromatine au niveau des gènes spécifiques des cellules T *helper* devrait aussi permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques qui permettront de restaurer une immunité protectrice. Pour des raisons fondamentales et dans un but thérapeutique, il est donc aujourd'hui nécessaire de caractériser les voies moléculaires qui contrôlent la biologie des lymphocytes T au niveau de la chromatine.

Régulation épigénétique de l'expression génique

Le génome nucléaire humain, long d'environ deux mètres, ne se trouve jamais sous forme d'ADN nu à l'intérieur des cellules. Il est organisé et compacté dans leurs noyaux par de petites protéines basiques, les histones, qui ont une masse moléculaire d'environ 15 kDa et qui sont phylogénétiquement très conservées. L'ensemble ADN et histones forme la chromatine dont l'unité de base est le nucléosome [11] (➜). Deux copies des histones H2A, H2B, H3 et H4 s'associent pour en former le cœur protéique autour duquel s'enroule le brin d'ADN sur une longueur d'environ 146 paires de nucléotides *(Figure 2)*. Chez les eucaryotes, le nucléosome correspond au premier niveau de compaction de l'information génétique nucléaire. À ce stade, la chromatine prend la forme d'un collier de perles de onze nanomètres de diamètre, les nucléosomes étant reliés entre eux par de l'ADN de liaison. C'est sous cette forme de chromatine ouverte, appelée euchromatine, que se trouve les locus contenant les gènes exprimés par chaque cellule *(Figure 2)*. Les régions du génome contenant des gènes qui leur sont inutiles, car appartenant par exemple à un autre lignage, sont compactées sous forme de fibres pouvant atteindre plusieurs centaines de nanomètres, ce qui permet de prévenir le recrutement de protéines *trans*-activatrices et d'inhiber ainsi l'expression génique. Cette chromatine compacte, qui peut éventuellement être déverrouillée, prend le nom d'hétérochromatine facultative. Entre ces deux situations extrêmes, de nombreux locus existent sous une forme ambivalente (*poised*), prêts à être mobilisés, ou au contraire verrouillés, selon les informations environnementales qui seront reçues et intégrées par la cellule *(Figure 2)*. C'est notamment le cas des gènes qui codent les cytokines et les *master regulators* des différents lignages T *helper* dans les lymphocytes T naïfs. Le gène *Ifng*, qui code l'IFN-γ caractéristique du lignage Th1, sera par exemple complètement ouvert et relâché si la cellule se différencie dans ce lignage, ou, au contraire, compacté sous forme d'hétérochromatine facultative si elle s'engage dans le lignage antagoniste Th2 [7-9,12].

(➜) Voir la Synthèse de A. Bertin et S. Mangenot, *m/s* n° 8-9, août-septembre 2008, page 715

Les mécanismes de régulation qui contrôlent la compaction et le relâchement de la chromatine, et donc l'expression des gènes, impliquent le dépôt sur l'ADN et les histones de marques épigénétiques qui, bien que réversibles, sont transmissibles au cours des divisions cellulaires. Ce marquage est catalysé par différents types d'enzymes regroupées sous le nom de *chromatin writers*. À quelques rares exceptions près, leur positionnement sur la chromatine n'a pas d'effet biologique *per se*. Ces marques servent de point d'ancrage à des *chromatin readers* qui permettent l'assemblage de complexes protéiques multimériques qui, une fois échafaudés, modifient la composition, la structure et la fonction de la chromatine. Selon la marque épigénétique, sa localisation sur le génome, et le contexte chromatinien environnant, des complexes différents sont assemblés. Ceci explique que certaines marques, qualifiées de « permissives », sont associées à des effets positifs sur l'expression génique alors que d'autres, présentées comme « répressives », sont impliquées dans la répression de la transcription. Les marques épigénétiques ciblent les deux composantes principales de la chromatine, l'ADN et les histones.

La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupement méthyl sur le carbone 5 d'un résidu cytosine dans un contexte de di-nucléotide CpG, par une ADN méthyltransférase (DNMT) [13]. Lorsqu'elle affecte des régions *cis*-régulatrices, elle est de façon quasi-systématique associée à la répression de la transcription. Les cytosines méthylées peuvent directement interférer avec le recrutement de facteurs de transcription, servir de point d'ancrage à des *methyl-CpG-binding proteins* (MBP) qui entrent en compétition avec des molécules *trans*-activatrices, ou permettre le recrutement de complexes multimériques qui vont catalyser la déposition et la propagation d'autres marques répressives et la compaction de la chromatine [13]. La méthylation de l'ADN, lorsqu'elle est présente sur le corps des gènes, a également été associée à des régions actives d'un point de vue transcriptionnel et à l'épissage alternatif.

Les modifications post-traductionnelles covalentes des histones sont des marques épigénétiques qui jouent aussi un rôle majeur dans la régulation dynamique de l'expression génique. Les quatre histones de cœur sont des protéines riches en résidus lysine et arginine, des acides aminés basiques dont la charge positive permet une interaction avec les groupements phosphate de l'ADN chargés négativement. Elles possèdent un domaine carboxy-terminal globulaire très conservé contenant un domaine *histone fold* qui permet leur hétérodimérisation. Leur extrémité amino-terminale, plus variable et dépourvue de structure secondaire, s'expose à la surface du nucléosome. C'est elle qui est la cible de la plupart des

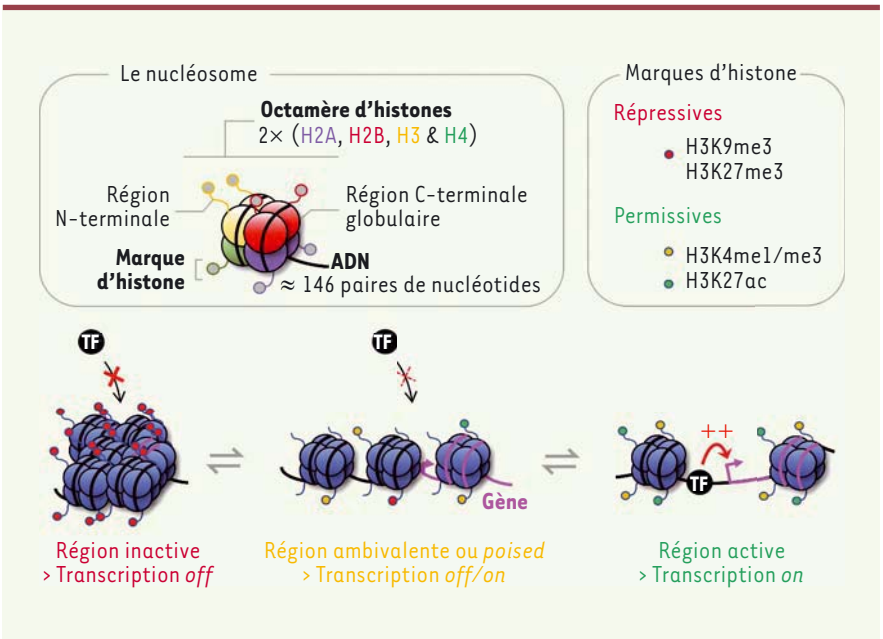


Figure 2. ***La régulation de l'expression génique dépend de mécanismes épigénétiques qui modifient la composition et la structure de la chromatine.*** Le nucléosome, qui constitue l'unité de base de la chromatine, est constitué d'un octamère d'histones autour duquel s'enroule le filament d'ADN. Selon les informations intégrées par la cellule, et selon le *locus* sur lequel elles sont présentes, ces structures sont compactées afin de prévenir le recrutement des facteurs de transcription (TF) et donc l'expression génique, ou, à l'inverse, déplacées et relâchées pour permettre l'initiation ou l'amplification de la transcription. Des voies épigénétiques complexes, impliquant différentes modifications des régions amino-terminales des histones, contrôlent ces processus.

modifications post-traductionnelles susceptibles de modifier la charge de l'histone, les interactions protéine/ADN et protéine/protéine. Les acides aminés les plus soumis à modifications, qui incluent l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, la SUMOylation et l'ubiquitination, sont les résidus lysine, arginine, sérine et thréonine. Au cours des dix dernières années, de nombreux travaux ont notamment documenté un rôle clé pour l'acétylation et la méthylation des lysines.

L'acétylation des lysines par les histones acétyltransférases (HAT) concerne principalement les résidus présents au niveau des extrémités amino-terminales des histones H3 et H4. Elle est systématiquement associée à des locus dont la transcription est active et elle a deux conséquences principales. Elle aboutit tout d'abord à la neutralisation de la charge positive de l'acide aminé, ce qui favorise le recrutement de la machinerie de transcription en diminuant l'interaction électrostatique entre le filament d'ADN et les histones. L'acétylation des lysines permet aussi le recrutement de protéines à bromodomaine (e.g. HAT, co-activateurs de la transcription) qui auront un effet positif sur l'expression génique.

Les conséquences de la méthylation des lysines sur les fonctions du génome sont beaucoup moins stéréotypées. En effet, selon le résidu et l'histone ciblés, le nombre de groupements méthyl ajoutés et la localisation de l'histone sur le génome, la méthylation peut être associée à une régulation positive ou négative de l'expression génique. La triméthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me3) est, par exemple, retrouvée au niveau des promoteurs actifs où elle est impliquée dans l'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription [14]. La monométhylation du même résidu (H3K4me1) est une marque caractéristique non pas des promoteurs mais des *enhancers* actifs (H3K27ac$^+$) et *poised* (H3K27ac$^-$), c'est-à-dire en pause mais prêts à être activés ou réprimés selon les signaux reçus par la cellule *(Figure 2)*. Les *enhancers* réprimés sont dépourvus d'H3K4me1, mais sont par contre enrichis en H3K27me3, une marque catalysée par l'histone méthyltransférase Ezh2 (*enhancer of zeste homolog 2*) qui fait partie du complexe répresseur PRC2 (*polycomb repressive complex 2*).

La marque H3K9me3 est elle-même extrêmement versatile [15]. Elle a été historiquement associée à la formation de l'hétérochromatine constitutive [16,17], c'est-à-dire aux régions péricentromériques et télomériques du génome, pauvres en gènes codants, riches en éléments répétés, et dont la chromatine est condensée dans toutes les cellules et à toutes les étapes du cycle cellulaire. Elle a depuis été impliquée dans la régulation positive et négative de l'expression génique. H3K9me3 permet notamment la répression de promoteurs de gènes codant des régulateurs développementaux et le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires [18]. Chez l'adulte, la répression de l'expression génique dépendant de H3K9me3 dans l'euchromatine et l'hétérochromatine facultative est également nécessaire pour définir et maintenir l'identité cellulaire [8,9,19]. Cependant, H3K9me3 peut également être retrouvée sur le corps des gènes transcriptionnellement actifs où elle serait impliquée dans l'élongation de la transcription et l'épissage alternatif [20,21]. Cette marque, extrêmement versatile, régule donc de nombreuses fonctions du génome. Son rôle dans la biologie des lymphocytes T CD4 commence juste à être révélé.

H3K9me3 joue un rôle clé dans la différenciation et la stabilité des lymphocytes T

La marque H3K9me3 peut être déposée par différentes lysine méthyltransférases, notamment celles de la

famille SUV39H (*histone-lysine N-methyltransferase*) qui inclue SUV39H1, SUV39H2 et SETDB1. Bien que SUV39H1 et SUV39H2 aient initialement été associées à l'échafaudage de l'hétérochromatine constitutive [17], des travaux récents ont mis en évidence un rôle de SUV39H1 dans la régulation de l'expression génique dans les lymphocytes T (*Tableau I*). Dans les lymphocytes Th2, la voie épigénétique SUV39H1/H3K9me3 réprime le promoteur du gène *Ifng* et est ainsi impliquée dans la stabilité du lignage Th2 [8,22] (➜).

(➜) Voir la Nouvelle de E. Zueva, *m/s* n° 12, décembre 2012, page 1032

L'importance fonctionnelle de cette voie a également été décrite récemment dans la différenciation des lymphocytes T CD8 effecteurs et mémoires [23]. Il a notamment été montré que SUV39H1 est nécessaire à la répression des gènes associés à la mémoire immunologique dans les lymphocytes T CD8 activés qui s'engagent dans le lignage effecteur. Tout comme SUV39H1 et SUV39H2, SETDB1 (*SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1*) a aussi été impliquée dans l'assemblage de l'hétérochromatine constitutive et dans la régulation dynamique de l'expression génique dans différents types cellulaires incluant les cellules T [9,24-26] (*Tableau I*). Dans les lymphocytes Th17, la voie de co-stimulation dépendante d'OX40 induit par exemple le recrutement de SETDB1 sur le locus *Il17* ce qui aboutit à sa répression [26]. Notre équipe a aussi récemment documenté un rôle clé pour cette enzyme dans la biologie des lymphocytes Th1 et Th2, notamment *via* la répression de rétrovirus endogènes (ERV) qui auraient, au cours de l'évolution, été cooptés en modules *cis*-régulateurs de gènes Th1 [9].

L'axe SETDB1/H3K9me3 contrôle l'identité des lymphocytes Th2 en réprimant des rétrovirus endogènes cooptés en modules cis-régulateurs des gènes *Th1*

Les séquences dérivées de rétrovirus endogènes représentent près de 10 % du patrimoine génétique de l'homme et de la souris. Elles correspondent à des vestiges de génomes rétroviraux dont l'activité de transposition, potentiellement dangereuse, a dû être réprimée par les cellules hôtes à l'aide de mécanismes épigénétiques impliquant la méthylation de l'ADN et la marque H3K9me3 [27–29]. Au fur et à mesure de leur découverte, les ERV ont été classés et nommés en fonction du rétrovirus exogène dont ils sont le plus proches. Chez l'homme, ils ont ainsi été répartis en trois classes selon leur lien de parenté avec les gammarétrovirus (classe I), les bêtarétrovirus (classe II) ou les spumavirus (classe III). Il est également commun qu'une ou deux lettres ai(en)t été ajoutée(s) au début de leur nom, pour indiquer l'espèce dans laquelle ils ont initialement été identifiés. Les HERV et MuERV ont, par exemple, été respectivement décrits pour la première fois chez l'homme et la souris. Le génome des ERV est essentiellement constitué des gènes gag (protéine d'encapsidation), pol (transcriptase inverse) et env (protéine d'enveloppe), qui codent des protéines essentielles à la réplication virale. Leur expression est régulée par des séquences LTR (*long terminal repeats*), généralement dupliquées aux extrémités des séquences codantes et comprenant des régions initiatrices et régulatrices de la transcription [30].

Les ERV, comme les autres éléments transposables, n'ont pas seulement représenté un danger pour nos organismes. Ils ont également été de formidables moteurs de l'évolution. Des études récentes suggèrent en effet que ces éléments génomiques ont été détournés en modules *cis*-régulateurs pour le bénéfice de l'hôte. Ils auraient notamment un rôle clé dans la régulation de réseaux géniques impliqués dans la protection de l'organisme contre les agents pathogènes [9,30–34]. Au cours de l'évolution, les gènes codant les protéines virales ont été excisés du génome par recombinaison homologue entre les séquences LTR qui les flanquent. Les LTR « solo » ainsi générés représentent aujourd'hui 90 % des séquences dérivées d'ERV chez l'homme [30,35]. Ce sont ces séquences, de par leur capacité intrinsèque à recruter des facteurs de transcription, qui ont largement été cooptées en éléments *cis*-régulateurs de l'expression des gènes. Il est par exemple estimé que 20 % des sites de fixation pour de nombreux facteurs de transcription tels que p53, OCT4, SOX2, et NANOG dérivent de LTR solo chez l'homme comme chez la souris. La présence de sites d'épissage donneur, conservés dans certaines classes d'ERV ou générés par mutation, a aussi probablement contribué à leur cooptation en tant que promoteurs alternatifs. C'est le cas par exemple de la séquence consensus de l'ERV MaLR (*mammalian apparent retrotransposon*) qui contient un site d'épissage donneur à l'origine de nombreux transcrits chimériques dans les oocytes de souris [36].

Comment expliquer que les séquences LTR aient ainsi pu échapper aux mécanismes de répression épigénétique visant à réprimer les ERV ? Comme indiqué ci-dessus, les données de la littérature obtenues au cours de la dernière décennie, notamment dans les cellules souches embryonnaires, suggèrent que la répression des ERV dépend en grande partie de mécanismes moléculaires impliquant la méthylation de l'ADN et la déposition de la marque épigénétique H3K9me3 par la lysine méthyltransférase SETDB1. Cette enzyme serait ciblée sur les ERV par des protéines à doigts de zinc et à domaine KRAB, les « KRAB-ZFP » (*krüppel-associated box domain zinc finger proteins*), le co-répresseur transcriptionnel TRIM28 (*tripartite motif-containing 28*) servant d'intermédiaire moléculaire entre les deux partenaires. Soulignons que la majorité des séquences consensus sur lesquelles se fixent les KRAB-ZFP se situent dans les séquences internes des ERV [32]. Comme les LTR solo en sont dépourvus, il est actuellement proposé que cela ait favorisé leur dérépression et leur cooptation en élément *enhancer* ou promoteur des gènes situés à proximité [35].

Molécule		Effet biologique	Référence
Nom	Type		
SETDB1	Lysine méthyltransférase	Répression d'ERV cooptés en éléments cis-régulateurs de gènes Th1 Régulation du priming Th1 et de la plasticité Th2	[9]
SUV39H1	Lysine méthyltransférase	Répression du promoteur du gène *Ifng* Régulation de la plasticité des cellules Th2	[8]
HP1a	*Chromatin reader*	Répression du promoteur du gène *Ifng* Régulation de la plasticité des cellules Th2	[8]
TRIM28	Co-répresseur transcriptionnel	Régulation de la production d'IL-2 et de TGF-β3 Contrôle de la balance cellules Th17/celules T régulatrices	[39]
HP1g	*Chromatin reader*	Répression du locus *FoXP3* dépendante de la SUMO E3 ligase PIAS1 Régulation du ratio cellules T CD4 conventionnelles/régulatrices	[40]
SETDB1	Lysine méthyltransférase	Contrôle du développement intrathymique des cellules T Répression du gène *FcγRIIb* dont la signalisation interfère avec la transduction du signal du complexe TCR	[41]
SUV39H1	Lysine méthyltransférase	Contrôle de l'expression d'un réseau de gènes impliqués dans la programmation des cellules T CD8 mémoires. Contrôle des lignages T CD8 effecteurs *vs* mémoires	[23]
TRIM28	Co-répresseur transcriptionnel	Régulation du développement intrathymique des cellules T Contrôle de la réponse des cellules T aux signaux cytokiniques et antigéniques	[42]
SETDB1	Lysine méthyltransférase	Contrôle du développement intrathymique des cellules T Répression du gène *FcγRIIb* dont la signalisation réprime l'activation de ERK	[43]
HP1b	*Chromatin reader*	Régulation de l'expression du co-récepteur CD4 dans les thymocytes en cours de développement et les cellules T matures Répression d'un silencer du gène CD4	[44]
HP1g	*Chromatin reader*	Accumulation sur le corps du gène *Il2* dans les cellules T activées Rôle dans la régulation positive de l'expression génique ?	[20]
SETDB1	Lysine méthyltransférase	Répression du locus *Il17A* dépendante de l'axe OX40/NF-κB dans les cellules Th17 (mécanisme de rétrocontrôle négatif)	[26]
TRIM28	Co-répresseur transcriptionnel	Régulation du réarrangement du locus *TCRα* Contrôle du développement des lymphocytes Tαβ et des cellules NKT	[45]

Tableau I. ***Principaux travaux impliquant les voies épigénétiques dépendantes d'H3K9me3 dans la biologie des lymphocytes T CD4.***

Le rôle des séquences dérivées d'ERV dans la régulation des réseaux géniques, ainsi que les mécanismes épigénétiques qui contrôlent leur activité, commencent donc à être caractérisés dans les cellules souches embryonnaires et les tissus adultes [9,27,30–34,37]. Notre équipe vient notamment d'identifier le rôle d'un réseau d'ERV dans la régulation des fonctions des lymphocytes T CD4 chez la souris [9]. Nous avons montré, à l'aide de tests de différenciation *in vitro* et d'un protocole d'immunisation *in vivo*, que les lymphocytes T CD4 naïfs déficients pour SETDB1 se différencient plus efficacement en cellules Th1 que leurs contreparties sauvages, et que les cellules Th2 mutantes ne sont plus déterminées dans leur lignage. En l'absence de la lysine méthyltransférase, les cellules Th2 sont en effet capables de se transdifférencier vers un phénotype Th1 en présence d'un signal instructeur spécifique de ce lignage. Des analyses transcriptomiques couplées à des expériences de ChIP-Seq (*chromatin immunoprecipitation followed by high-throughput sequencing*) et d'ATAC-seq (*assay for transposase-accessible chromatin with high-throughput sequencing*) visant à cartographier la distribution des marques H3K9me3,

H3K4me1 et H3K27ac à travers le génome ainsi que l'ouverture de la chromatine au niveau des locus spécifiques des lignages Th1 et Th2, nous ont de plus permis de montrer que les dérégulations observées à l'échelle cellulaire résultaient du déverrouillage d'un groupe restreint d'ERV normalement réprimés dans les lymphocytes T CD4. Nos données indiquent en effet que la déposition d'H3K9me3 par SETDB1 est nécessaire à la répression de séquences dérivées d'ERV qui agissent comme des modules *cis*-régulateurs de gènes clés du lignage Th1. Elles suggèrent de plus que la plupart des ERV qui régulent l'activation du programme d'expression génique Th1 ne se comportent pas comme des *enhancers* de gènes mais plutôt comme des modules régulant l'activité d'*enhancers* adjacents. Dans les cellules Th2, SETDB1 serait donc ciblée sur des séquences d'ERV spécifiques pour y déposer la marque répressive H3K9me3. La propagation de la marque jusqu'au *enhancer* pro-Th1 adjacent aboutirait ensuite à son verrouillage et à la répression du programme développemental associé.

L'impact de l'interaction entre les voies de régulation épigénétiques impliquant H3K9me3 et les séquences d'ERV se comportant comme des modules *cis*-régulateurs dans la régulation des réseaux transcriptionnels reste encore largement méconnu chez l'homme. Notre travail fait cependant écho à une étude publiée en 2016 dans laquelle les auteurs ont montré que les mécanismes de défense innés activés par l'IFN-γ dans différents types de cellules humaines dépendent de la mobilisation d'un panel d'ERV appartenant à la sous-famille MER41 [34]. Même si les éléments transposables sont peu conservés entre l'homme et la souris, il semble donc que les mêmes processus pourraient avoir été sélectionnés au cours de l'évolution pour contrôler l'identité et les fonctions cellulaires, notamment celles nécessaires à la protection de l'organisme.

Voies épigénétiques dépendantes d'H3K9me3 : des cibles thérapeutiques potentielles ?

Le travail que nous venons de publier, associé aux données récentes de la littérature, a donc permis d'identifier la molécule SETDB1 comme un régulateur majeur de la biologie des lymphocytes T CD4. Cette enzyme est en effet nécessaire pour réprimer le programme d'expression génique Th1 dans les lymphocytes T en cours de différenciation. D'un point de vue physiopathologique, ces données suggèrent que SETDB1 pourrait être nécessaire pour prévenir l'emballement des réponses immunitaires de type 1, et donc l'apparition d'immunopathologies, et pour stabiliser la programmation des cellules Th2. Les réponses Th1 jouant un rôle clé dans le rejet des tumeurs [38] et dans la protection de l'organisme contre les pathogènes intracellulaires, il pourrait être bénéfique en clinique humaine de manipuler l'expression ou l'activité de SETDB1 afin d'amplifier la réponse immunitaire chez des patients atteints de cancer ou développant une réponse anti-infectieuse non protectrice. Chez des individus souffrant de pathologies immunoinflammatoires de type Th2, interférer directement ou indirectement avec l'activité de cette enzyme, et plus généralement avec la déposition de la marque répressive H3K9me3 sur la chromatine, pourrait aussi être bénéfique. Cela devrait en effet permettre de dévier la réponse immunitaire vers un phénotype Th1, non pathogénique dans ce contexte. En accord avec cette hypothèse, des travaux récents montrent que l'inhibition de SUV39H1 par la chaetocine permet de diminuer la sévérité de la pathologie dans un modèle murin d'asthme allergique [8]. Cette molécule est d'ailleurs déjà utilisée en clinique humaine pour déstabiliser la programmation des cellules tumorales. C'est aussi le cas d'inhibiteurs non spécifiques de SETDB1 tels que le DZNep, la mithramycine A ou le paclitaxel. Dans un avenir proche, l'utilisation de ces agents pharmacologiques pourrait donc permettre de rapidement traduire nos observations en avancée thérapeutique pour l'homme. ◊

SUMMARY

Endogenous retroviruses: friend or foe of the immune system?

Upon priming by dendritic cells, naïve CD4 T lymphocytes are exposed to distinct molecular environments depending on the nature of the pathological stimulus. In response, they mobilize different gene networks that establish lineage-specific developmental programs, and coordinate the acquisition of specific phenotype and functions. Accordingly, CD4 T cells are capable of differentiation into a large variety of functionally-distinct T helper (Th) cell subsets. In this review, we describe the molecular events that control CD4 T cell differentiation at the level of the chromatin. We insist on recent works that have highlighted the key role of H3K9me3-dependent epigenetic mechanisms in the regulation of T cell identity. Interestingly, these pathways shape and control the developmental programs at least in part through the regulation of endogenous retroviruses-derived sequences that have been exapted into *cis*-regulatory modules of Th genes. ◊

REMERCIEMENTS

ANR - Contrats : EpiTreg (ANR-14- CE14-0021-01), ImmuneTrans (ANR-19-CE15-0022).
Région Occitanie NVEQ 2014 - Contrat : 14051291.
FRM - Contrat : AJE201212.

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, *et al.* Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002 ; 3 : 991-8.
2. Kanno Y, Vahedi G, Hirahara K, *et al.* Transcriptional and epigenetic control of T helper cell specification: molecular mechanisms underlying commitment and plasticity. *Annu Rev Immunol* 2012 ; 30 : 707-31.
3. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 2010 ; 327 : 1098-102.

RÉFÉRENCES

4. Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, *et al.* Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 1999 ; 162 : 3256-62.
5. Harding FA, McArthur JG, Gross JA, *et al.* CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 1992 ; 356 : 607-9.
6. O'Shea JJ, Lahesmaa R, Vahedi G, *et al.* Genomic views of STAT function in CD4+ T helper cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2011 ; 11 : 239-50.
7. Wilson CB, Rowell E, Sekimata M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2009 ; 9 : 91-105.
8. Allan RS, Zueva E, Cammas F, *et al.* An epigenetic silencing pathway controlling T helper 2 cell lineage commitment. *Nature* 2012 ; 487 : 249-53.
9. Adoue V, Binet B, Malbec A, *et al.* The histone methyltransferase SETDB1 controls T helper cell lineage integrity by repressing endogenous retroviruses. *Immunity* 2019 ; 50 : 629-44.
10. Bird JJ, Brown DR, Mullen AC, *et al.* Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 1998 ; 9 : 229-37.
11. Bertin A, Mangenot S. Structure et dynamique de la particule coeur de nucléosome. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 715-9.
12. Grogan JL, Mohrs M, Harmon B, *et al.* Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity* 2001 ; 14 : 205-15.
13. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 2006 ; 31 : 89-97.
14. Lauberth SM, Nakayama T, Wu X, *et al.* H3K4me3 interactions with TAF3 regulate preinitiation complex assembly and selective gene activation. *Cell* 2013 ; 152 : 1021-36.
15. Mozzetta C, Boyarchuk E, Pontis J, Ait-Si-Ali S. Sound of silence: the properties and functions of repressive Lys methyltransferases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015 ; 16 : 499-513.
16. Lachner M, O'Carroll D, Rea S, *et al.* Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 2001 ; 410 : 116-20.
17. Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, *et al.* Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 2001 ; 107 : 323-37.
18. Bilodeau S, Kagey MH, Frampton GM, *et al.* SetDB1 contributes to repression of genes encoding developmental regulators and maintenance of ES cell state. *Genes Dev* 2009 ; 23 : 2484-89.
19. Liu J, Magri L, Zhang F, *et al.* Chromatin landscape defined by repressive histone methylation during oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci* 2015 ; 35 : 352-65.
20. Vakoc CR, Mandat SA, Olenchock BA, Blobel GA. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1γ are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell* 2005 ; 19 : 381–91.
21. Saint-André V, Batsché E, Rachez C, Muchardt C. Histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1γ favor inclusion of alternative exons. *Nat Struct Mol Biol* 2011 ; 18 : 337-44.
22. Zueva E, Allan RS, Cammas F, *et al.* Contrôle épigénétique de la stabilité phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes Th2 par la voie Suv39h1/HP1a. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 1032-4.
23. Pace L, Goudot C, Zueva E, *et al.* The epigenetic control of stemness in CD8+ T cell fate commitment. *Science* 2018 ; 359 : 177-86.
24. Loyola A, Tagami H, Bonaldi T, *et al.* The HP1α–CAF1–SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO Rep* 2009 ; 10 : 769-75.
25. Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, *et al.* SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev* 2002 ; 16 : 919-32.
26. Xiao X, Shi X, Fan Y, *et al.* The costimulatory receptor OX40 inhibits interleukin-17 expression through activation of repressive chromatin remodeling pathways. *Immunity* 2016 ; 44 : 1271-83.
27. Bulut-Karslioglu A, De La Rosa-Velázquez IA, Ramirez F, *et al.* Suv39h-dependent H3K9me3 marks intact retrotransposons and silences LINE elements in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell* 2014 ; 55 : 277-90.
28. Karimi MM, Goyal P, Maksakova IA, *et al.* DNA methylation and SETDB1/H3K9me3 regulate predominantly distinct sets of genes, retroelements, and chimeric transcripts in mESCs. *Cell Stem Cell* 2011 ; 8 : 676-87.
29. Rebollo R, Karimi MM, Bilenky M, *et al.* Retrotransposon-induced heterochromatin spreading in the mouse revealed by insertional polymorphisms. *PLOS Genet* 2011 ; 7 : e1002301.
30. Thompson PJ, Macfarlan TS, Lorincz MC. Long terminal repeats: from parasitic elements to building blocks of the transcriptional regulatory repertoire. *Mol Cell* 2016 ; *62* : 766-76.
31. Rowe HM, Kapopoulou A, Corsinotti A, *et al.* TRIM28 repression of retrotransposon-based enhancers is necessary to preserve transcriptional dynamics in embryonic stem cells. *Genome Res* 2013 ; 23 : 452-61.
32. Ecco G, Cassano M, Kauzlaric A, *et al.* Transposable elements and their KRAB-ZFP controllers regulate gene expression in adult tissues. *Dev Cell* 2016 ; 36 : 611-23.
33. Chuong EB, Elde NC, Feschotte C. Regulatory activities of transposable elements: from conflicts to benefits. *Nat Rev Genet* 2017 ; 18 : 71-86.
34. Chuong EB, Elde NC, Feschotte C. Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses. *Science* 2016 ; 351 : 1083-87.
35. Friedli M and Trono D. The developmental control of transposable elements and the evolution of higher species. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2015 ; 31 : 429-51.
36. Peaston AE, Evsikov AV, Graber JH, *et al.* Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev Cell* 2004 ; 7 : 597-606.
37. Sundaram V, Cheng Y, Ma Z, *et al.* Widespread contribution of transposable elements to the innovation of gene regulatory networks. *Genome Res* 2014 ; 24 : 1963-76.
38. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012 ; 12 : 298-306.
39. Chikuma S, Suita N, Okazaki IM, et al. TRIM28 prevents autoinflammatory T cell development in vivo. Nat Immunol 2012 ; 13 : 596-603.
40. Liu B, Tahk S, Yee KM, et al. The ligase PIAS1 restricts natural regulatory T cell differentiation by epigenetic repression. Science 2010 ; 330 : 521-5.
41. Martin FJ, Xu Y, Lohmann F, et al. KMT1E-mediated chromatin modifications at the FcγRIIb promoter regulate thymocyte development. Genes Immun 2015 ; 16 : 162-9.
42. Santoni de Sio FR, Barde I, Offner S, et al. KAP1 regulates gene networks controlling T-cell development and responsiveness. FASEB J 2012 ; 26 : 4561-75.
43. Takikita S, Muo R, Takai T, et al. A histone methyltransferase ESET is critical for T cell development. J Immunol 2016 ; 197 : 2269-79.
44. Taniuchi I, Sunshine MJ, Festenstein R, Littman DR. Evidence for distinct CD4 silencer functions at different stages of thymocyte differentiation. Mol Cell 2002 ; 10 : 1083-96.
45. Zhou ZF, Yu J, Chang M, et al. TRIM28 mediates chromatin modifications at the TCR enhancer and regulates the development of T and natural killer T cells. Proc Natl Acad Sci USA 2012 ; 109 : 20083-9.

TIRÉS À PART

O. Joffre

médecine/sciences 2020 ; 36 : 261-3

REVUES

SYNTHÈSE

Organoïdes (4)

L'émergence des modèles miniatures de foie gras humain en 3D générés en laboratoire

Alexandra Collin de l'Hortet[1], Hélène Gilgenkrantz[2]

> Les organoïdes constituent une approche de choix pour modéliser *a minima* une maladie humaine et tester l'efficacité thérapeutique de certaines drogues. La stéatopathie métabolique ou maladie du foie gras, dont l'incidence a considérablement augmenté avec l'accroissement de l'obésité dans les pays développés, se caractérise par l'accumulation de triglycerides dans l'hépatocyte et une atteinte hépatique pouvant évoluer vers la fibrose. Il n'existe pas de traitement efficace, mais de nombreuses pistes sont actuellement explorées. Deux équipes américaines ont récemment utilisé les cellules souches pluripotentes induites (iPS) et la culture muticellulaire pour modéliser un mini-foie stéatosique par deux approches différentes, offrant ainsi de nouveaux outils pour tester les drogues en cours de développement. <

[1]Department of Pathology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, États-Unis.
[2]Université de Paris, Centre de recherche sur l'inflammation, Inserm-UMR1149, 75018 Paris, France.
alexandra.collin@gmail.com

L'épidémie mondiale d'obésité entraîne une augmentation inquiétante du nombre de personnes atteintes de stéatose hépatique, encore appelée NAFLD (*non alcoholic fatty liver disease*) [1]. La NAFLD se caractérise par une accumulation excessive de triglycérides dans les hépatocytes. Elle peut évoluer vers une stéatohépatite, ou NASH (*non alcoholic steatohepatitis*), puis vers la cirrhose et ses complications, l'hépatocarcinome et l'insuffisance hépatocellulaire. Cette maladie est asymptomatique aux stades de NAFLD et de NASH, ce qui retarde souvent son diagnostic. Son étude est également rendue complexe en raison d'une part de son origine multi-factorielle, mêlant facteurs environnementaux (sédentarité, alimentation) et génétiques (prédisposition de régulateurs métaboliques du foie) [2] et, d'autre part de la pertinence des modèles murins qui sont majoritairement utilisés mais dont le régime alimentaire et le métabolisme diffèrent de ceux de l'homme [3]. Ainsi, les essais thérapeutiques de molécules issues des études pré-cliniques se sont le plus souvent soldés par des résultats peu concluants, voire parfois contradictoires [4].

Vignette (Photo © Inserm - Inserm U49).

Pour pallier cette difficulté, de nouvelles approches expérimentales ont vu le jour, combinant les dernières techniques de différenciation cellulaire avec celles des cultures multicellulaires [5, 6] (➜).

(➜) Voir la Synthèse de J.L. Galzi *et al.*, *m/s* n° 5, mai 2019, page 467

Des mini-organes humains ont ainsi été développés en laboratoire à partir de cellules souches pluripotentes induites (cellules iPS) [6, 7]. Ces outils sont rapidement devenus particulièrement précieux pour modéliser des maladies humaines. Ainsi, récemment, deux études « preuve de concept » ont mis en évidence le potentiel de ces nouvelles techniques dans notre compréhension de la NAFLD.

Des iPS déficientes en sirtuine pour modéliser un mini-foie stéatosique humain

Dans la première étude, que nous avons publiée dans la revue *Cell Metabolism*, notre équipe (*Department of Pathology, University of Pittsburgh,* États Unis) a eu comme objectif de modéliser une stéatose sur un mini-organe humain. Dans ce but, nous nous sommes intéressés au rôle de régulateur métabolique de la déacétylase sirtuine 1 (SIRT1) dans le développement de la NAFLD [8]. SIRT1 est en effet connue pour exercer un rôle protecteur vis-à-vis de la stéatose hépatique, en modulant différentes voies de signalisation métaboliques, en particulier au niveau du tissu adipeux et du foie. Elle joue également un rôle anti-inflammatoire au niveau des cellules macrophagiques, ce qui

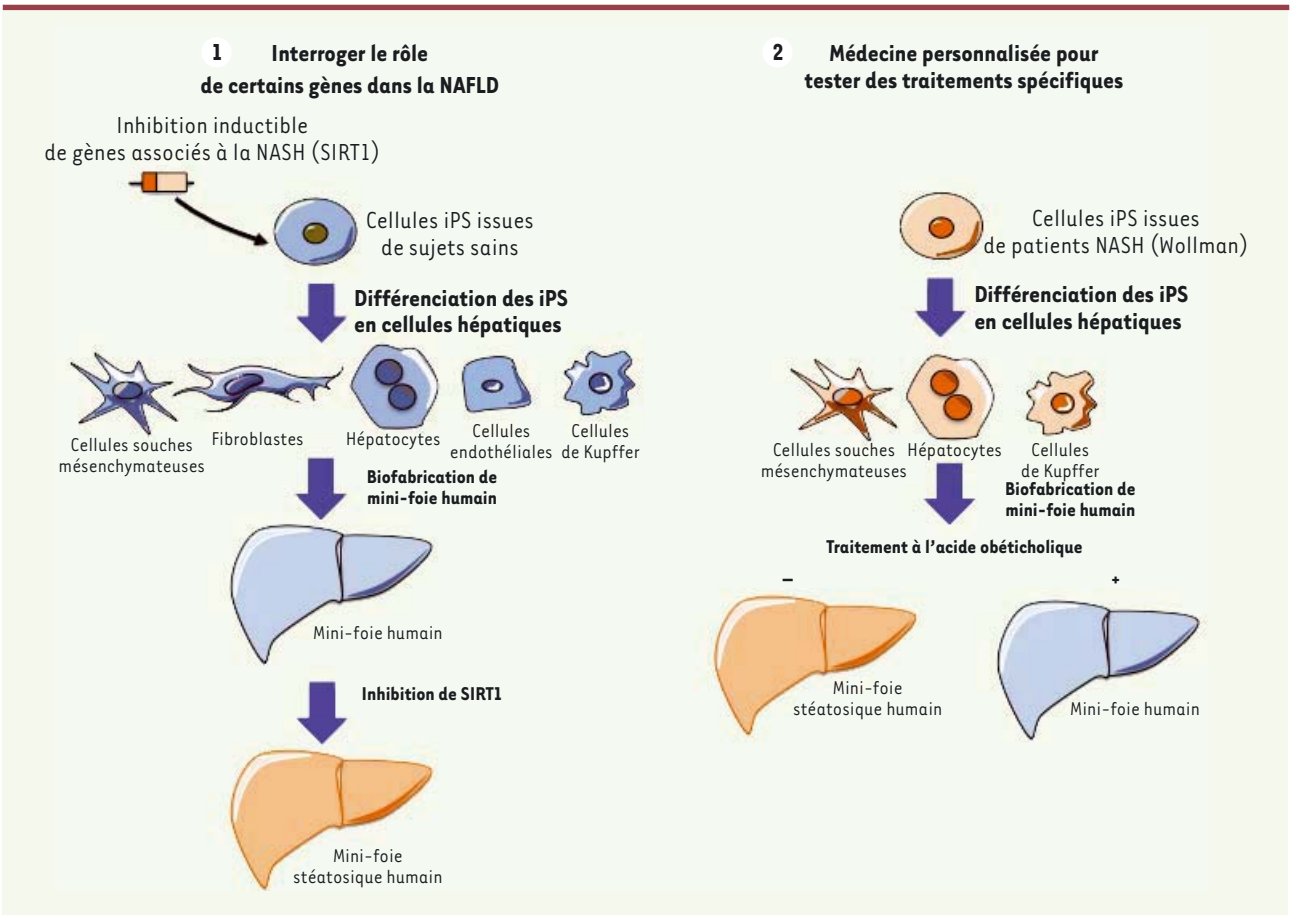


Figure 1. ***Intérêt des modèles de mini-foie steatosique dans le traitement de la NAFLD.*** L'émergence de modèles de mini-foies humains issus de cellules souches pluripotentes induites a le potentiel d'être utilisée pour : (1) tester le rôle de certains gènes dans l'origine de la NAFLD en modifiant génétiquement des cellules iPS saines (2), modéliser des mini-foies à partir de cellules souches issues de patients au foie stéatosique, afin de tester des traitements à la carte.

explique qu'en son absence, l'inflammation et le stress oxydant contribuent à la progression de la NAFLD vers la NASH [9] (➜).

(➜) Voir la Nouvelle de H. Gilgenkrantz et C. Perret, *m/s* n° 3, mars 2012, page 269

(➜) Voir la Brève de H. Gilgenkrantz, *m/s* n° 10, octobre 2010, page 819

Nous avons donc modifié des cellules iPS humaines afin de contrôler à la demande, l'expression de SIRT1. Pour construire un mini-foie humain, nous avons utilisé la technique de décellularisation d'un foie de rat [10] (➜) afin d'obtenir une matrice cellulaire servant de support à différents types cellulaires, dont des hépatocytes humains dérivés d'iPS, des macrophages, des fibroblastes, des cellules souches mésenchymateuses et des cellules endothéliales.

Des hépatocytes humains dérivés d'iPS et invalidés pour l'expression de SIRT1 ont été utilisés pour générer de tels mini-foies. L'analyse de ces derniers a montré qu'ils se gorgeaient rapidement de gouttelettes lipidiques, modélisant ainsi une stéatose hépatique macrovésiculaire, accompagné d'un profil de réponse proinflammatoire des cellules associées. La comparaison du profil lipidique contenu dans ces mini-foies stéatosiques reconstitués, avec des foies stéatosiques humains, a révélé une surcharge de lipides identiques et l'analyse des voies métaboliques induites, une activation de la majorité (41 sur 50) des voies stimulées dans un foie stéatosique humain. Afin d'étudier la transition entre stéatohépatite et fibrose, il sera intéressant d'intégrer à l'avenir dans ce modèle les principales cellules productrices de matrice extracellulaire, les cellules étoilées. En attendant, cette stratégie innovante consistant à modifier génétiquement des cellules iPS humaines pour étudier le rôle de certains gènes, pourrait d'ores et déjà, être testée pour créer d'autres tissus et modéliser d'autres maladies.

Des iPS de patients atteints de la maladie de Wollman source d'organoïdes de foie stéatosique

Une approche différente, suivie par Takanori Takebe (*Division of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition & Division of Developmental Biology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center,* Cincinatti, États-Unis), également parue dans la revue *Cell Metabolism*,

a quant à elle cherché à dériver des cellules iPS issues de patients atteints de stéatose hépatique afin de déterminer les mécanismes moléculaires et inflammatoires propres à chaque patient [11]. Takebe a tout d'abord mis un point un modèle d'organoïdes du foie dérivés d'iPS humains issus de sujets sains par différenciation séquentielle en sphéroïdes de l'intestin antérieur (*foregut spheroids*) puis en tissu hépatique (*liver organoids*). L'addition d'acides gras libres dans le milieu de culture a permis de reproduire la progression de la maladie, allant de la stéatose à la stéatohépatite et à la fibrose hépatique. Ces résultats ont ensuite été reproduits en utilisant des cellules iPS issues de patients atteints de la maladie de Wollman, dont le déficit en lipase acide lysosomale (LIPA) induit une accumulation massive de lipides dans différents organes, en particulier le foie. Cette maladie autosomique récessive concerne environ 1 personne sur 50 000 en Europe. Elle est considérée comme la manifestation la plus sévère du déficit en LIPA. Elle se manifeste dès les premières semaines de vie et mène rapidement à une insuffisance hépato-cellulaire grave. Les organoïdes hépatiques issus de foies de patients atteints de cette maladie ont été traités avec l'acide obéticholique, un activateur du récepteur nucléaire Farnésoïde X (FXR), actuellement en phase III dans les essais thérapeutiques visant à corriger la NASH. Ce traitement a permis de diminuer l'accumulation de lipides dans les organoïdes hépatiques, et a prolongé leur survie, soulignant ainsi l'efficacité potentielle de ce traitement, non seulement dans la maladie de Wollman mais également dans la NAFLD.

Une des limites de cette étude pour affirmer la pertinence pré-clinique de cette approche est cependant l'absence de caractérisation fonctionnelle du tissu qui est obtenu. Cette nouvelle technologie pourrait à l'avenir devenir un outil de médecine personnalisée, en offrant la possibilité de tester différents traitements à la carte pour chaque patient.

Conclusion

Quel que soit le type d'approche utilisée pour modéliser la NAFLD/NASH sur des tissus humains, ces technologies restent expérimentales et ont besoin d'être optimisées. En effet, la différenciation hépatocytaire de cellule iPS, semble encore incomplète, ne permettant l'obtention que de cellules hépatiques immatures, à mi-chemin entre hépatocytes fœtaux et hépatocytes adultes. Par ailleurs, l'agencement des cellules qui forment le mini-organe n'est pas toujours optimal et induit une variabilité phénotypique entre les modèles. Enfin, les mini-foies stéatosiques que nous avons décrits ici ont un temps de vie limité qui est bien inférieur à celui nécessaire pour le développement des maladies hépatiques dont le spectre, en particulier l'évolution vers une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire, n'est pas reproduit dans sa totalité. Néanmoins, l'incidence galopante de la NASH et l'absence de traitement efficace pour enrayer sa progression justifient déjà pleinement l'utilisation de ces modèles de foie humain stéatosique pour la compréhension de la maladie et le développement de nouvelles cibles thérapeutiques. ◊

SUMMARY

Emergence of 3D human fatty liver models engineered in the laboratory

Organoids offer an elegant approach to model human diseases and test new drugs. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) whose incidence has dramatically increased in recent years with the rise of obesity, is defined by triglyceride accumulation in hepatocytes, inflammation, liver injury, and progression to fibrosis. There is currently no approved therapy but many pathways are being explored. Two American teams have created mini-steatotic livers using different approaches, both using induced pluripotent stem cells (iPS), thus offering new tools to test developing drugs. ◊

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Spengler EK, Loomba R. Recommendations for Diagnosis, Referral for Liver Biopsy, and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mayo Clinic Proc* 2015 ; 90 : 1233-46.
2. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol* 2015 ; 62 : S47-64.
3. Van Herck MA, Vonghia L, Francque SM. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. A starter's guide. *Nutrients* 2017 ; 9 : 1072.
4. Ding RB, Bao J, Deng CX. Emerging roles of SIRT1 in fatty liver diseases. *Intern J Biol Sci* 2017 ; 13 : 852-67.
5. Galzi JL, Jouault T, Amédée J. Les organoïdes : des mini-organes au service de la biomédecine. *Med Sci (Paris)* 2019 ; 34 : 467-9.
6. Prior N, Inacio P, Huch M. Liver organoids: from basic research to therapeutic applications. *Gut* 2019 ; 68 : 2228-37.
7. Beckwitt CH, Clark AM, Wheeler S, *et al.* Liver, organ on a chip. *Exp Cell Res* 2018 ; 363 : 15-25.
8. Collin de l'Hortet A, Takeishi K, Guzman-Lepe J, *et al.* Generation of human fatty livers using custom-engineered induced pluripotent stem cells with modifiable SIRT1 metabolism. *Cell Metab* 2019 ; 30 : 385-401.
9. Gilgenkrantz H, Perret H. Le silence parlant de la sirtuine 1. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 269-71.
10. Gilgenkrantz H. Un greffon de foie implantable dérivé d'une matrice décellularisée. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 10 : 819.
11. Ouchi R, Togo S, Kimura M, *et al.* Modeling steatohepatitis in humans with pluripotent stem cell-derived organoids. *Cell Metab* 2019 ; 30 : 374-84.

TIRÉS À PART

A. Collin de l'Hortet

Abonnez-vous à *médecine/sciences*

Bulletin d'abonnement page 294 dans ce numéro de *m/s*

médecine/sciences 2020 ; 36 : 264-70

George Lucas Prophète du transhumanisme ?

Bettina Couderc[1,2]

> La *Guerre des étoiles*, saga cinématographique « grand public », permet de se questionner sur la nature humaine et sur le transhumanisme. Elle met en effet en scène différents personnages qui ne sont ni de « vrais » humains, ni des robots, des créatures pouvant être assimilées à des humains évolués (des *cyborgs*, des chimères ou des humains génétiquement modifiés). À partir de cette approche cinématographique, nous aborderons certains moyens de modification de la personne humaine à la fois dans son corps et dans sa conscience, et nous nous interrogerons sur l'homme de demain, en se demandant si George Lucas (réalisateur du premier film) n'était pas un visionnaire des hommes de demain. <

[1]Institut Claudius Regaud - Institut universitaire du cancer de Toulouse (IUCT), Oncopole, Université de Toulouse, 31000 Toulouse, France.
[2]Inserm UMR1027, Département d'épidémiologie et de santé publique, Faculté de médecine, 37 allées Jules Guesde, 31000 Toulouse Cedex 9, France.
bettina.couderc@inserm.fr

Il y a 42 ans, en 1977, j'assistais au premier épisode d'un film qui allait devenir culte : la *Guerre des étoiles* de George Lucas. Aujourd'hui, en 2019, nous en sommes au 9e épisode, réalisé par Jeffrey J. Abrams. Il n'a pas pris une ride. Ce film de science-fiction montre le combat entre le bien et le mal, avec certaines notes religieuses ou philosophiques, et la recherche d'une unité dans le bien pour le bonheur de tous. On y retrouve donc des valeurs éthiques (la recherche du bien pour le plus grand nombre). Il permet également de s'interroger sur ce qu'est l'homme à l'aube de sa transformation (transhumanisme) et quelle sera sa nature dans les prochains siècles.

En utilisant les réseaux sociaux, j'ai demandé à « mes amis » s'ils pensaient que Dark Vador, personnage central de l'épopée (un cyborg, ou *cybernetic organism*) était « une personne humaine ». Il n'était pas question de faire un discours philosophique sur « qu'est-ce que l'homme ? » mais d'aborder la notion de « personne humaine » de façon simple. Une discussion s'est engagée. Dark Vador est à l'origine un humain qui a été détruit physiquement (son corps) et psychiquement (sa conscience) avant d'être reconstruit et *augmenté*. Il a donc un esprit (une conscience du bien et du mal), il est libre (volonté de choisir telle ou telle action), il pense et communique (langage, abstraction), il a des relations interpersonnelles et possède un corps. Quatre-vingt-quinze pour cent des sondés pensaient donc que c'est bien une personne humaine. J'ai alors demandé si D2-R2 et Z-6PO, les gentils robots de la série, étaient des personnes humaines : 100 % de réponses négatives m'ont été retournées. J'ai enfin demandé si maître Yoda et Chewbacca étaient également des personnes humaines et, là aussi, 100 % de réponses négatives. Et pourtant... Maître Yoda, comme Chewbacca, ont un esprit (une conscience du bien et du mal), ils pensent et ils communiquent (langage), ils sont capables d'abstraction et ont une conscience de la vie après la mort. Dans la saga, George Lucas se permet même de les faire interagir avec les humains après leur mort, suggérant qu'ils aient une « âme » immortelle (Maître Yoda). Ce qui gênerait pour les qualifier de personnes humaines serait l'aspect particulier (différent) de leurs corps (et bien sûr, l'impossibilité probable d'avoir une descendance avec des humains plus « standards »). George Lucas n'aurait-il pas eu la préscience d'humains issus du transhumanisme ? Dark Vador est issu d'une fécondation sans père et est largement reconstruit et augmenté, Chewbacca pourrait très bien provenir d'une expérience de chimèrisme, et Maître Yoda et tous ses camarades, d'édition du génome utilisant le « *gene drive* » mal maîtrisé. Ce sont ces possibilités que nous allons explorer dans ce forum.

Homme créé

Notre premier exemple de transhumanisme est le personnage central de « la guerre des étoiles » : Anakim Skywalker qui deviendra par la suite Dark Vador.

Dans l'épisode I, il est dit qu'il est né d'une mère mais qu'il n'a pas de père. Il aurait été conçu par « *la Force* ». Certains y verront une analogie avec le Christ, mais je ne m'aventurerai pas dans cette voie. Donc, Anakim n'a pas de père. Comment a-t-il été conçu ? Est-ce qu'une telle genèse de personne humaine est possible à plus ou moins court terme ? Il semblerait que oui.

m/s n° 3, vol. 36, mars 2020
https://doi.org/10.1051/medsci/2020021

En 2012, Shinya Yamanaka recevait le prix Nobel de physiologie ou médecine, avec John B. Gurdon[1], pour ses travaux sur la reprogrammation de cellules adultes. Il avait montré qu'en modifiant génétiquement des cellules de peau de souris adultes (des fibroblastes) [1,2], puis de cellules humaines [3], avec un vecteur viral codant 4 facteurs (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc), il était possible de les rendre pluripotentes. Pour rappel, une cellule pluripotente est une cellule capable de se différencier en n'importe quelle cellule du corps humain ; la cellule pluripotente la plus connue est la cellule souche embryonnaire (ou cellule ES) [4]. Depuis les travaux de Yamanaka, l'ensemble de la communauté scientifique s'est attaché à perfectionner la méthode de déprogrammation des cellules adultes et leur re-différenciation en cellules de différents organes [5]. Les applications princeps de ses recherches sont la création de modèles d'étude du développement embryonnaire ou des différents organes humains [6], la genèse de modèles des principales pathologies humaines, et la thérapie cellulaire.

Un autre axe de recherche concerne la genèse, à partir de cellules pluripotentes reprogrammées, de gamètes afin de proposer des fécondations *in vitro* à des couples souffrant d'infertilité (cette dernière ayant pu pour un membre du couple être due à une chimiothérapie). Il a en effet été montré qu'il est possible de générer des ovocytes ou des spermatozoïdes à partir de fibroblastes murins [7]. Le groupe de Ryuhei Hayashi, *Department of Anatomy and Cell Biology*, *Kyoto University*, au Japon, a fait la démonstration de la faisabilité de la conversion de fibroblastes murins en cellules souches pluripotentes induites (ou iPS) puis de la conversion de ces iPS en cellules progénitrices germinales, puis en gamètes [8]. À partir d'une souris de genre masculin, il est même possible de générer à la fois des ovocytes (porteur du chromosome X) et des spermatozoïdes (porteur du chromosome X ou Y) [9]. Une fécondation entre des gamètes (ovocyte et spermatozoïde) tous deux issus d'un individu mâle est donc possible. Cela a été montré chez la souris [10]... On peut donc imaginer que ce qui a été décrit, il y a 42 ans, par George Lucas, soit la génération d'une personne à partir d'un individu unique, est effectivement envisageable. Nous parlons ici d'une génération d'un individu par fécondation avec des gamètes. Bien entendu, le clonage (génération d'un individu à partir d'un noyau prélevé sur une cellule adulte et inséré dans un ovocyte énucléé) ou la complémentation tétraploïde sont également envisageables [11]. L'individu obtenu par fécondation à partir de gamètes d'un individu unique, ou de deux hommes distincts, ou par clonage, serait bien sûr une personne humaine. Le fait d'appartenir à l'espèce humaine ne dépend pas de la façon dont la conception a été réalisée (clonage ou auto-fécondation). En 2020, il n'a pas encore été possible, à ma connaissance, de générer des gamètes humains pouvant donner une fécondation à partir d'un individu unique. Ceci est dû, entre autres, qu'à la différence des gamètes murins, les gamètes humains obtenus à partir d'iPS gardent une empreinte épigénétique identique à celle de la cellule adulte ayant permis l'obtention de l'iPS. Toutefois de très nombreuses équipes de recherche travaillent sur ce sujet [12].

Figure 1. ***Dark Vador. Homme augmenté*** (© Render by Jonathan Rey).

Homme augmenté dans son corps

Anakim subira une première blessure dans l'épisode numéro II de la saga et on lui greffera un nouvel avant-bras. On parle donc ici d'un homme soigné. Il livrera ensuite une bataille impressionnante à la fin de l'épisode III où il tombera dans un volcan en irruption et sera sauvé de la mort *in extremis*. Il sera reconstruit à plus de 80 % (tout le bas du corps à partir de la taille, un bras et la moitié de la tête). Il ne respirera que grâce à son casque et deviendra alors le célèbre Dark vador *(Figure 1)*. Peut-on ici parler d'homme augmenté ? de transhumanisme ? oui et non. La reconstruction n'est pas une augmentation. Elle s'apparente à un soin. Le fait d'utiliser une canne pour se déplacer, des lentilles de contact pour voir, des prothèses auditives ou un cœur artificiel n'est pas une augmentation de l'homme. Ce sont des soins. De très nombreuses personnes portent des prothèses plus ou moins élaborées pour pallier un déficit moteur[2]. On parle de personnes *cyborg* lorsque la prothèse est reliée non seulement aux nerfs et aux muscles du patient, mais qu'elle peut également être commandées par sa pensée[3] [13]. Les patients greffés parlent de leurs prothèses comme d'un élément de leur corps, et elles sont vraiment, pour eux, partie intégrante de leur corps.

[1] The Nobel Assembly at Karolinska Institutet has today decided to award The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012 jointly to John B. Gurdon and Shinya Yamanaka for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent : https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2012/press-release/

[2] https://www.pinterest.de/limbionics/

[3] http://www.robotblog.fr/robots-humanoides/luke-arm-le-bras-robotique-artificiel-479

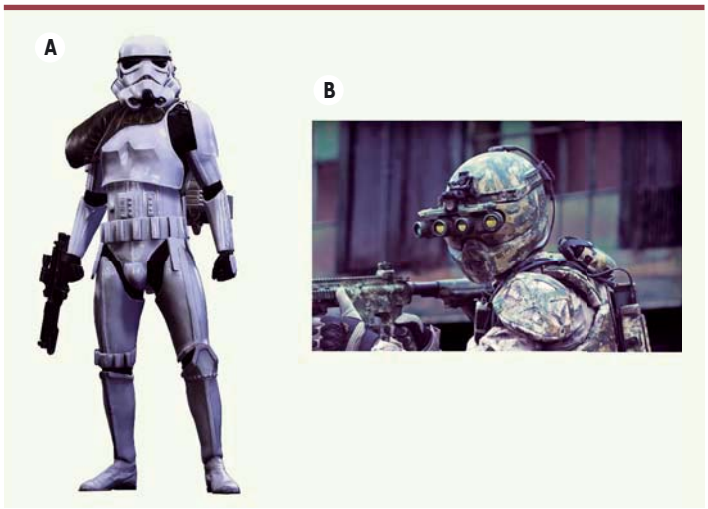


Figure 2. ***Personnages de la « Guerre des étoiles » (A) ou soldats de l'armée (B).***

On parle d'augmentation lorsque les prothèses donnent un avantage par rapport aux autres êtres humains. Dans un avenir proche, nous pourrons disposer de lentilles de contact permettant de voir plus loin que la vision classique humaine, de voir la nuit, de zoomer sur un objet, de lire ses mails sans ordinateur, etc. Des prothèses auditives permettront également d'avoir une ouïe plus fine que nos congénères. Il s'agira alors d'une augmentation. Les plus anciens lisant cet article se rappelleront sûrement de « *Super Jaimie* » et de « *L'homme qui valait 3 milliards* »[4]. Les personnages de ces séries, comme dans la *Guerre des étoiles*, sont reconstruits, suite à un accident, et augmentés. Ils disposent également de membres artificiels greffés qui possèdent plus de force que des membres classiques (on court plus vite et on soulève des poids plus importants). De telles augmentations sont possibles de nos jours. L'industrie de l'armement promeut des exosquelettes capables d'augmenter la force de ses soldats, de les protéger tout en analysant en temps réel leur condition physique[5]. Et, curieusement, lorsqu'on examine les photos mises à disposition par les fabricants, nous retrouvons les soldats de l'empire de la *Guerre des étoiles (Figure 2 A, B)*.

Toutes ces augmentations physiques ne modifient pas la condition des personnes. Les prothèses font partie de leur corps, elles sont leurs corps. L'être humain est certes augmenté mais il n'est pas transformé. Il est difficile d'utiliser le terme de transhumanisme ici et la nature de l'homme n'est pas modifiée.

Homme augmenté (modifié) dans sa conscience

Dans l'épisode III, en parallèle de sa transformation physique, Anakim voit sa conscience se modifier sous l'influence d'une personne extérieure, l'Empereur. On dit, tout au long de la série, qu'il choisit « *le côté obscur de la force* ». George Lucas a repris ici le mythe de Faust où un homme « *vend son âme au diable* » afin d'obtenir quelque chose. On assiste à une modification de la personnalité d'Anakim. Il n'arrive progressivement plus à discerner le bien du mal et sera asservi à une force extérieure. Est-ce toujours une personne humaine puisqu'il n'a plus de conscience, que sa volonté est altérée, et qu'il est donc privé de liberté de choix. Assurément oui, car de naissance (et de fondement), il en a la capacité.

Mais est-il possible, de nos jours, de prendre le contrôle de la conscience d'un tiers ? de modifier son comportement ? de le rendre incapable de discerner le bien du mal, et de le priver de sa capacité à choisir librement entre deux actions (ce qui est le propre de l'homme [14]) ? Oui. De tous temps, des substances chimiques ont été capables de modifier le comportement humain (alcool à petite échelle, puis drogues plus ou moins naturelles)[15]. De nos jours, le développement rapide des neurosciences a non seulement permis une cartographie précise du cerveau et une identification des zones impliquées dans la mémorisation, la prise de décision, le sens moral [16] mais également le moyen de modifier le comportement d'un individu [17]. Le balbutiement de ces travaux est expliqué dans l'excellent livre de Antonio R. Damasio [18]. Il raconte le cas de cet ouvrier anglais qui, suite à un accident de mine, a subi une lésion importante de son cerveau. Il s'en suivit qu'il avait perdu tout sens moral. A.R. Damasio poursuit par des études d'imagerie du cerveau où les chercheurs ont cartographié les zones du cerveau activées lorsque nous prenons des décisions d'ordre moral. Elizabeth A. Phelps et son groupe ont travaillé sur les modifications du cerveau. Ils ont généré des impulsions électriques, soit grâce à des dispositifs externes, soit *via* des puces implantées sur des volontaires. Ils ont rapporté être capables de modifier le comportement et surtout le jugement des volontaires. Ils sont capables de rendre quelqu'un de phobique, normal, quelqu'un de timoré, sûr de lui ; et surtout ils sont capables de changer la perception d'un évènement par un individu. Ce dernier peut devenir exempt de tout sens moral, sans aucune empathie et incapable d'analyser un évènement du point de vue moral [17].

Est-ce qu'une personne privée de sens moral par un tiers et incapable de discerner le bien du mal est toujours une personne humaine ? Vaste débat qui est pris actuellement à bras le corps par les juristes nord-américains qui proclament que quelqu'un dénué de sens moral est irresponsable de ses actes. Ces juristes voudraient dépénaliser les crimes de personnes souffrant d'altération du cerveau.

[4] https://fr.wikipedia.org/wiki/Super_Jaimie

[5] https://www.surplus-militaire.com/talos-armure-exosquelette-revolutionnaire-developpee-larmee-americaine/

Peut-on parler de transhumanisme si on génère des personnes sous influence par des manipulations cérébrales plus ou moins consenties ? Difficile à dire. Comme les augmentations dans le corps, les modifications cérébrales peuvent être transitoires. L'essence même de l'homme n'est alors pas modifiée.

Homme chimère

Quittons Anakim/Dark Vador pour nous intéresser désormais à Chewbacca[6]. Est-ce une personne ? Est-il humain ? Si on s'arrête à son aspect physique et à sa manière de communiquer, que seul Hans Solo[7] est capable de décrypter, la question est légitime *(Figure 3)*. Pourtant il a une conscience, il communique, etc. Peut-on dire que George Lucas a pensé à un descendant des chimères, actuellement à l'étude de nos jours ?

La pénurie d'organes qu'il est possible de greffer de nos jours fait que les recherches se développent non seulement sur la génération d'organes à partir de cellules pluripotentes différenciées greffées sur des échafaudages (ou *scaffolds*) biocompatibles et biodégradables [19,20], mais également sur des organes humanisés obtenus à partir d'animaux chimères [5,21,22].

Les animaux chimères sont obtenus par la fécondation *in vitro* d'un animal (une souris, un cochon, etc.). L'œuf fécondé, puis le zygote, se développe jusqu'au stade blastocyste. Ce dernier est composé d'un corps embryonnaire constitué de cellules souches embryonnaires pluripotentes et d'une enveloppe, formées des cellules précurseurs des annexes. Il est possible d'implanter dans ce blastocyste, des cellules ES d'une autre espèce (humaines par exemple). Ainsi l'embryon, puis le fœtus, obtenu sera composé des cellules de l'animal et des cellules humaines. Zhong *et al.* ont publié des fœtus chimères obtenus à partir de cellules de porc et de cellules humaines composés de 2 % de cellules humaines dans le cœur, 10 % dans les reins, etc. [23]. Wu *et al.* ont voulu ensuite accroître la proportion de cellules humaines dans certains organes (le cœur par exemple) afin d'obtenir des organes humanisés qui puissent être greffés à des hommes. Pour cela, ils ont réalisé une édition du génome d'un œuf fécondé d'un porc afin d'inactiver le gène *NKX2-5* (*NK2 homeobox 5*) responsable de la différenciation des cellules pluripotentes en cardiomyocytes. Ils ont obtenu ensuite le blastocyste et ont incorporé des cellules iPS humaines pouvant, elles, se différencier en cardiomyocytes. L'embryon, puis le fœtus, s'est développé. Ces auteurs ont alors montré que le cœur du fœtus était composé de 10 % de cellules humaines, montrant la faisabilité de la technique [21, 24]. Ces recherches se développent de façon considérable. Mais au vu des craintes légitimes de l'opinion publique de voir des animaux naître avec des neurones ou des gamètes humains, un groupe japonais a récemment rapporté être capable de générer, grâce à l'édition du génome, des animaux chimères dépourvus de cellules humaines dans le cerveau et les organes sexuels [25]. À l'heure actuelle, il est interdit de laisser se développer le fœtus au-delà du tiers de la gestation, ceci afin d'éviter la naissance d'animaux chimères homme/porc. Mais s'il est possible de générer des cœurs humanisés qu'il est possible de greffer, on peut penser que cette interdiction pourrait être remise en question, et Chewbacca ne serait plus alors de la science-fiction [26]. Mais est-ce qu'une chimère homme/animal serait une personne humaine ? À partir de quel pourcentage de cellules humaines doit-on parler de personne humaine ? Ou d'animal ?

Figure 3. ***Chewbacca. Homme chimère.***

Homme transgénique (édition du génome et *gene drive*)

Le transhumanisme ne peut pas être évoqué sans parler de l'édition du génome et du forçage génétique (*gene drive*). Ce thème a largement été développé en novembre 2018 avec la naissance de Lulu et Nana, premiers bébés génétiquement modifiés par Jiankui He en République populaire de Chine [27] (➜).

(➜) Voir la Chronique génomique de B. Jordan, *m/s* n° 3, mars 2019, page 266

L'édition du génome consiste à inactiver ou à modifier la séquence d'un gène précis au sein d'un génome. Elle peut affecter un seul des deux allèles d'un gène (on obtient alors un individu

[6] Chewbacca était un Wookiee originaire de la planète Kashyyyk. Guerrier, contrebandier et résistant, il devint le copilote et ami de Han Solo.

[7] Originaire de la planète Corellia, Han Solo est un contrebandier, pilote et ancien élève officier impérial.

hétérozygote pour la mutation) ou les deux (on obtient un individu homozygote). Dans le cas des bébés Lulu et Nana, He dit avoir obtenu un bébé hétérozygote (Nana) pour l'inactivation du gène *CCR5* (*C-C chemokine receptor type 5*) et un bébé homozygote (Lulu). Peut-on parler d'augmentation de l'homme ? Comme précédemment : oui et non. Oui car 1) CCR5 est impliqué dans la sensibilité des cellules à une infection par le VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine de type 1) [28] donc Lulu serait insensible à une infection par le virus, et 2) CCR5 serait impliqué dans le développement cérébral et les individus dont le gène *CCR5* est muté (2 % de la population [29]) récupèreraient plus vite leurs fonctions cérébrales que les individus hétérozygotes ou homozygotes porteurs du gène en cas d'accident vasculaire cérébral ou de traumatisme crânien [30]. Et non car la protéine CCR5 aurait d'autres fonctions et serait impliquée notamment dans le développement osseux [31], l'incidence d'une rétinopathie en cas de diabète de type 1, le développement d'une encéphalite après infection par le virus TEBV (virus de l'encéphalite à tiques ou *tick-borne encephalitis virus*) véhiculé par les tiques [32], la susceptibilité à la néphrite lupique et même dans la pathogenèse du carcinome épidermoïde des voies aérodigestives supérieures [33]. On ne connaît donc pas toutes les conséquences de l'inactivation du gène *CCR5*, même si 2 % de la population sont homozygotes mutés et semblent se porter très bien. Cette édition du génome réalisée sur des humains a suscité une vive réaction de la communauté internationale [34] (➜).

(➜) Voir la Chronique bioéthique de H. Chneiweiss, *m/s* n° 3, mars 2019, page 263

Le génome humain a été modifié ici pour la première fois par l'homme d'une façon à ce que la modification soit transmissible à la descendance. Un moratoire international a même été publié [35].

Entre Lulu et maître Yoda *(Figure 4)*, il y a bien entendu un gouffre que je ne saurai évoquer. Mais est-ce que la communauté scientifique, sous la demande sociétale, va s'arrêter là ? Revenons à l'exemple de ce qui a été réalisé en termes de manipulation génétique germinale sur Lulu et Nana. L'édition du génome a ici un intérêt (si intérêt il y a) uniquement sur Lulu qui est homozygote mutée. On va dire ici que le fait d'être homozygote mutée lui donne, selon He, un avantage (une augmentation). Lulu peut avoir des enfants. En ayant une descendance avec quelqu'un qui est homozygote sauvage, ses enfants perdront l'inactivation du gène *CCR5* et n'hériteront pas de l'avantage supposé, avancé par Jiankui He, Lulu n'est donc qu'un individu de plus sur la terre avec un gène *CCR5* inactivé. Certes cela a été obtenu par action humaine sur le génome d'un individu mais les conséquences sur les générations futures restent *a priori* limitées. C'est pourquoi le moratoire international condamnant l'édition du génome reste modéré, le rendant acceptable en cas d'intérêt thérapeutique.

Mais est-ce que le moratoire aurait la même essence si la modification génique amenait un réel avantage au bébé obtenu ? Est-ce qu'on se limiterait à soigner le bébé à naître sans s'intéresser aux générations suivantes ? On ne voudrait pas que les générations suivantes redeviennent désavantagées. On voudrait que la modification se transmette à la descendance et que le gain obtenu par la manipulation génétique se perpétue dans des générations suivantes.

Figure 4. ***Homme transgénique.***

Ceci est possible grâce au forçage génétique déjà testé sur différentes espèces dont les moustiques [31-33].

Dans le forçage génétique, les médecins généticiens insèrent dans le génome de l'œuf fécondé non seulement le(s) gène(s) codant les guides d'ARN ciblant le gène visé, mais également le gène codant Cas9 (recombinase). La cellule génétiquement modifiée contiendra dans son génome tous les éléments nécessaires à la modification du gène ciblé. Le gène sera ainsi modifié sur les deux allèles dans l'ADN de toutes les cellules de l'organisme dont les gamètes (génome haploïde). En cas de descendance, l'hémigénome de la personne transgénique amènera tous les éléments nécessaires à la modification génique (guides, Cas9) de l'allèle non muté. L'hémigénome de la personne partenaire subira donc la même modification génique que l'hémigénome de son partenaire. Il y aura donc une édition du génome « naturelle » sur l'allèle venant du partenaire. Leur descendance sera donc automatiquement également homozygote mutée. Imaginons que la modification visée concerne un gène codant un facteur de transcription ciblant un gène dont l'expression est impliquée dans la croissance (le but serait d'induire un individu transgénique de grande taille). Dans ce cas, on modifierait l'espèce humaine puisque la modification apportée par l'homme se transmettrait à la descendance dont les individus seraient tous homozygotes modifiés, donc tous grands. Ici, on ne parle pas de réparation mais bien d'augmentation de l'espèce humaine, car on peut imaginer que les modifications qui seraient apportées viseraient à améliorer le destin de l'humanité, quoique.

On pourrait même aller beaucoup plus vite en réalisant des modifications sur des gènes codant des ARN régulateurs de l'expression génique (microARN [miRNA] ou long ARN non codant). Sachant qu'un miARN ou un long ARN non codant [39] peut moduler l'expression de plusieurs centaines de gènes, les conséquences sur l'individu modifié devraient être bien plus importantes.

Bien entendu de telles expériences ne sont pas autorisées à ce jour dans l'espèce humaine. En revanche, elles sont conçues et effectuées pour éliminer des espèces nuisibles pour l'homme (les moustiques, par exemple) et pour améliorer des végétaux [37]. La technique est maîtrisée. He (actuellement en prison avec deux de ses collègues) a été en pourparlers avec des structures privées américaines afin de monter une *start-up* qui proposerait aux futurs parents une édition du génome de leurs embryons afin de leur donner des caractéristiques particulières[8]. Est-ce que George Lucas a pressenti les effets du forçage génétique à très long terme sur les humains en imaginant les personnages de Maître Yoda, Jabba the hunt, Bib fortuna, Jan Jan Binx, Darkmaul, etc. Bien sûr, il y aura des décennies entre un *Jean Martin* né en 2025 et Maître Yoda, mais cela reste envisageable. Si cela était possible seraient-ce des créatures assimilables à des personnes humaines ? Il semblerait que oui, mais l'essence même de la personne serait modifiée.

Créatures crées *ex nihilo*

Enfin, dans cette magnifique saga de la *Guerre des étoiles*, des créatures résolument non humaines sont décrites. Elles sont issues de l'imagination féconde des concepteurs. On peut citer le petit compagnon de Jabba the Hunt.

Bien sûr, de telles créatures pourraient être issues de l'évolution naturelle. Elles pourraient aussi être créées *ex nihilo* par biologie synthétique. Cette dernière consiste à créer des organismes vivants à partir de « briques d'ADN » synthétiques. Le pionnier dans ce domaine est Craig Venter [40] (➜).

(➜) Voir la Synthèse de V. Baby *et al.*, *m/s* n° 10, octobre 2019 ; page 753

Il existe trois techniques : une dite de *bottom up*, une autre de *top down* et enfin l'expansion de l'alphabet numérique. La première repose sur l'assemblage de fragments d'ADN synthétiques (des gènes minimum) afin de tenter de créer un génome. La deuxième consiste, à partir d'un génome déjà constitué (bactérie ou même levure), à éliminer tous les gènes qui ne sont pas indispensables à la croissance et à la survie de l'organisme monocellulaire. À partir de ce « squelette » d'ADN on ajoute des gènes d'intérêt afin de créer un organisme monocellulaire capable d'avoir une fonction (synthèse de cacao, de caoutchouc, de vanille, etc.). Dans la troisième, un ADN semi-synthétique, composé non pas de quatre lettres comme d'ordinaire, mais de six [45] (➜), est ajouté au génome d'une bactérie, telle que *Escherichia coli*. On enrichit donc le patrimoine génétique de la bactérie de deux nouvelles bases azotées totalement artificielles [41-43].

(➜) Voir la Chronique génomique de B. Jordan, *m/s* n° 6-7, juin-juillet 2016, page 651

En 2019, l'homme est donc capable de créer des organismes synthétiques, certes monocellulaires, mais aptes à se multiplier et à exercer une fonction. On est, bien sûr, loin de la créature de George Lucas et loin de synthétiser une personne humaine *ex nihilo*.

Conclusion

Depuis 42 ans, nous nous sommes appropriés les personnages de la *Guerre des étoiles*. Ces personnages sortis de l'imagination de leurs concepteurs peuvent être assimilés à des individus issus de l'évolution accélérée de l'espèce humaine par transhumanisme. Il est impressionnant de se rendre compte que des cinéastes et scénaristes aient pu prédire, des décennies en avance, ce que la science permettra un jour de réaliser. Dans *Bienvenue à Gattaca*, le film culte réalisé en 1997, Andrew Niccol avait imaginé la banalisation des tests génétiques bien avant que la société *23andMe* les rende célèbres [44] (➜).

(➜) Voir la Chronique génomique de B. Jordan, *m/s* n° 1, janvier 2011, page 103

Voilà qui pourrait faire réfléchir la communauté scientifique sur le monde que nous souhaitons pour demain. Dans aucune constitution, il n'y a de définition de l'homme ou de la personne humaine. On peut définir notre substance et elle est identique aux milliards d'homme. Mais si on réfléchit l'homme en tant que personne, chacun de nous est individuel, singulier. Il n'y a pas de constat universel. Il existe la déclaration des droits de l'homme. Nous reconnaissons (du moins dans nos sociétés européennes) la dignité humaine (égale pour chacun) mais il n'existe aucune définition de ce qu'est l'homme. Si l'homme est augmenté par des prothèses, modifié dans sa conscience ou comporte des cellules animales, on parlera de post-humain ; il ne sera pas modifié dans son essence. En revanche, si certains hommes étaient modifiés profondément par édition du génome (transhumains), pourra-t-on parler encore d'un statut de « personne humaine » universel ? ◊

SUMMARY

George Lucas: prophet of transhumanism?

Star Wars, a "general public" film saga, raises questions about human nature and transhumanism. It features different characters who are neither "real" humans nor robots; there are creatures that can be likened to advanced humans (cyborgs, chimeras or genetically-modified humans). Based on the "Star Wars" movie, we will approach some ways of modifying the human person

[8] Regalado A. Disgraced CRISPR Scientific Rad plans to start a designer-baby business. MIT Technology review 2019. https://www.technologyreview.com/s/614051/crispr-baby-maker-explored-starting-a-business-in-designer-baby-tourism/

both in his body and in his consciousness and we will wonder about the man of tomorrow by asking ourselves if George Lucas (director of the first film released) might have not been a visionary of the men of tomorrow. ◊

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteure déclare n'avoir aucun lien 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. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007 ; 448 : 313-7.
3. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 ; 131 : 861-72.
4. Thomson JA. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998 ; 282 : 1145-7.
5. Shi Y, Inoue H, Wu JC, *et al.* Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov* 2017 ; 16 : 115-30.
6. Karagiannis P, Takahashi K, Saito M, *et al.* Induced pluripotent stem cells and their use in human models of dsease and development. *Physiol Rev* 2019 ; 99 : 79-114.
7. Moreno I, Míguez-Forjan JM, Simón C. Artificial gametes from stem cells. *Clin Exp Reprod Med* 2015 ; 42 : 33.
8. Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, *et al.* Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* 2011 ; 146 : 519-32.
9. Hirota T, Ohta H, Powell BE, *et al.* Fertile offspring from sterile sex chromosome trisomic mice. *Science* 2017 ; 357 : 932-5.
10. Hayashi K, Saitou M. Generation of eggs from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2013 ; 8 : 1513-24.
11. Jeanisch R, Eggan K, Humpherys D, *et al.* Nuclear cloning, stem cells, and genomic reprogramming. *Cloning Stem Cells* 2002 ; 4 : 389-96.
12. Bhartiya D, Anand S, Patel H, *et al.* Making gametes from alternate sources of stem cells: past, present and future. *Reprod Biol Endocrinol* 2017 ; 15 : 89.
13. Kuiken TA, Barlow AK, Hargrove LJ, *et al.* Targeted muscle reinnervation for the upper and lower extremity. *Techn Orthopaedics* 2017 ; 32 : 109-16.
14. Gazzaniga MS. *Le libre arbitre et la science du cerveau*. Paris : Odile Jacob, 2013.
15. Chneiweiss H. Augmenter les performances du cerveau : un leurre ? *Pour la Science* 2012 ; 422 : 98-105.
16. Greene JD, Nystrom LE, Engell AD, *et al.* The neural bases of cognitive conflict and control in moral judgment. *Neuron* 2004 ; 44 : 389-400.
17. Phelps EA, Hofmann SG. Memory editing from science fiction to clinical practice. *Nature* 2019 ; 572 : 43-50.
18. Damasio AR. *Spinoza avait raison : joie et tristesse, le cerveau des émotions*. Paris : Odile Jacob, 2014.
19. Richards DJ, Coyle RC, Tan Y, *et al.* Inspiration from heart development: biomimetic development of functional human cardiac organoids. *Biomaterials* 2017 ; 142 : 112-23.
20. Bredenoord AL, Clevers H, Knoblich JA. Human tissues in a dish: the research and ethical implications of organoid technology. *Science* 2017 ; 355 : eaaf9414.
21. Wu J, Greely HT, Jaenisch R, *et al.* Stem cells and interspecies chimaeras. *Nature* 2016 ; 540 : 51-9.
22. Wu J, Belmonte JCI. Interspecies chimeric complementation for the generation of functional human tissues and organs in large animal hosts. *Transgenic Res* 2016 ; 25 : 375-84.
23. Zhong C, Wu J, Izpisua Belmonte JC. Pig chimeric model with human pluripotent stem cells. In : Hyun I, De Los Angeles A, eds. *Chimera research*. New York, NY : Springer New York, 2019 : 101-24.
24. Wu J, Platero-Luengo A, Sakurai M, *et al.* Interspecies chimerism with mammalian pluripotent stem cells. *Cell* 2017 ; 168 : 473-86.e15.
25. Hashimoto H, Eto T, Yamamoto M, *et al.* Development of blastocyst complementation technology without contributions to gametes and the brain. *Exp Anim* 2019 ; 68 : 361-70.
26. Koplin J, Wilkinson D. Moral uncertainty and the farming of human-pig chimeras. *J Med Ethics* 2019 ; 45 : 440-6.
27. Jordan B. Bébés CRISPR : anatomie d'une transgression. *Med Sci (Paris)* 2019 ; 35 : 266-70.
28. Liu R, Paxton WA, Choe S, *et al.* Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996 ; 86 : 367-77.
29. Solloch UV, Lang K, Lange V, *et al.* Frequencies of gene variant CCR5-Δ32 in 87 countries based on next-generation sequencing of 1.3 million individuals sampled from 3 national DKMS donor centers. *Hum Immunol* 2017 ; 78 : 710-7.
30. Joy MT, Ben Assayag E, Shabashov-Stone D, *et al.* CCR5 is a therapeutic target for recovery after stroke and traumatic brain injury. *Cell* 2019 ; 176 : 1143-1157.e13.
31. Xie Y, Zhan S, Ge W, *et al.* The potential risks of C-C chemokine receptor 5-edited babies in bone development. *Bone Res* 2019 ; 7 : 4.
32. Mickienė A, Pakalnienė J, Nordgren J, *et al.* Polymorphisms in chemokine receptor 5 and Toll-like receptor 3 genes are risk factors for clinical tick-borne encephalitis in the Lithuanian population. *PLoS One*2014 ; 9 : e106798.
33. Tanyel CR, Cincin ZB, Gokcen-Rohlig B, *et al.* Effects of genetic variants of CCR5 chemokine receptors on oral squamous cell carcinoma. *Genet Mol Res* 2013 ; 12 : 5714-20.
34. Chneiweiss H. De retour de Hong Kong ou l'éthique à l'heure d'une génétique d'augmentation » de la personne humaine. *Med Sci (Paris)* 2019 ; 35 : 263-5.
35. Lander ES, Baylis F, Zhang F, *et al.* Adopt a moratorium on heritable genome editing. *Nature* 2019 ; 567 : 165-8.
36. Burt A, Crisanti A. Gene Drive: Evolved and Synthetic. *ACS Chem. Biol.* 2018 ; 13 : 343-6.
37. Rudenko L, Palmer MJ, Oye K. Considerations for the governance of gene drive organisms. *Pathogens Global Health* 2018 ; 112 : 162-81.
38. Macias V, Ohm J, Rasgon J. Gene drive for mosquito control: where did it come from and where are we headed? *IJERPH* 2017 ; 14 : 1006.
39. Gourvest M, Brousset P, Bousquet M. Long noncoding RNAs in acute myeloid leukemia: functional characterization and clinical relevance. *Cancers* 2019 ; 11 : 1638.
40. Baby V, Labroussaa F, Lartigue C, *et al.* Chromosomes synthétiques : réécrire le code de la vie. *Med Sci (Paris)* 2019 ; 35 : 753-60.
41. Cameron DE, Bashor CJ, Collins JJ. A brief history of synthetic biology. *Nat Rev Microbiol* 2014 ; 12 : 381-90.
42. Bartley BA, Kim K, Medley JK, *et al.* Synthetic biology: engineering living systems from biophysical principles. *Biophysical Journal* 2017 ; 112 : 1050-8.
43. Davies J. Using synthetic biology to explore principles of development. *Development* 2017 ; 144 : 1146-58.
44. Jordan B. Les tests génétiques grand public en caméra cachée. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 103-6.
45. Jordan B. Synthétique, vous avez dit synthétique ? *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 651-3.

TIRÉS À PART

B. Couderc

Retrouvez toutes les Actualités de la Myologie sur les sites de :

la **Société Française de Myologie**
www.sfmyologie.org

la filière de santé neuromusculaire **FILNEMUS**
www.filnemus.fr

médecine/sciences 2020 ; 36 : 271-3

Les laboratoires ouverts *Tous Chercheurs*

Jean Thimonier[1], Annick Brun-Jacob[3], Marion Mathieu[1,2], Jonas Durand[3], Pascale Frey-Klett[3], Constance Hammond[1]

> L'enjeu d'une culture scientifique pour tous est d'importance face à la difficulté des citoyens à critiquer les données de la science avec des arguments rationnels, notamment en ce qui concerne la biologie et la santé (vaccination, procréation médicalement assistée, etc.), car le grand public ne veut plus croire sur parole ce que disent les experts. Dans ce contexte, rapprocher les citoyens de la recherche scientifique représente un réel défi pour l'avenir, que les laboratoires ouverts *Tous Chercheurs*[1] ont voulu relever. <

[1]Tous Chercheurs, INMED UMR 1249, Inserm et Aix Marseille Université, 163 route de Luminy, 13273 Marseille, France.
[2]UMR 7268 ADES - Aix Marseille Université - EFS - CNRS–, faculté de médecine, département des sciences humaines et sociales, 27 boulevard Jean-Moulin, 13385 Marseille, France.
[3]Tous Chercheurs, Laboratoire d'Excellence ARBRE, UMR INRAE Université de Lorraine 1136 , Centre INRAE Grand Est-Nancy, 54280 Champenoux, France.
constance.hammond@inserm.fr
pascale.frey-klett@inrae.fr

Mieux connaître les méthodes de raisonnement, d'argumentation et d'expérimentation de la recherche permet à tout un chacun de se placer dans un rôle actif par rapport aux sciences et de devenir un citoyen éclairé. Il faut pour cela disposer des clés permettant de disséquer le processus de production d'un résultat scientifique : par qui (des chercheurs ou non, indépendants[2] ou non) et comment (par quelles méthodes d'analyse, de quantification, expériences témoins[3]) ce résultat a-t-il été obtenu et validé ? Les laboratoires Tous Chercheurs se sont fixés comme objectif de permettre à tout citoyen d'appréhender ce processus par l'expérience, au cours de stages de recherche. Ils ont, pour cela, investi dans trois domaines : le temps, le lieu et les interactions.

Le temps, le lieu et les interactions

Le temps

La formation à l'investigation scientifique, qui comprend l'éducation à la curiosité (questionnement), la compréhension d'un problème posé, l'imagination (l'invention d'un monde possible [1]), l'expérimentation avec du matériel scientifique de pointe, la discussion argumentée des résultats (esprit critique), la compréhension de ses erreurs, et la communication, ne peut se faire sur des temps courts. C'est pourquoi sont privilégiés les stages de plusieurs jours ou les camps d'été, si possible récurrents, ainsi que les recherches participatives.

Le lieu

Les stagiaires travaillent dans des laboratoires ouverts au public (*open labs*), équipés comme tout laboratoire de recherche avec du matériel de pointe. Les espaces de travail dédiés aux questionnements, aux expériences et aux interactions, sont organisés pour une pédagogie active.

Les interactions

Les tuteurs de stages (des doctorants) sont formés aux pédagogies actives. Ils guident les apprentissages des stagiaires vers la réalisation d'une production concrète, soit un exposé scientifique argumenté, soit une émission de radio sur internet (web radio), soit la rédaction d'une lettre (du type des *newsletters*), soit enfin par leur participation à la rédaction d'un article scientifique [2-4].

Nous exposerons succinctement, comme exemple, le déroulement des stages de recherche en immunologie/écologie des agents pathogènes qui ont concerné trois publics différents : des scolaires, des membres d'associations de malades et le grand public *(Figure 1)*.

Stage pour lycéens

La classe (de lycéens) accueillie pendant 3 jours [5], est divisée en 4 groupes d'élèves qui, accompagnés d'un tuteur, vont commencer le

[1] Le réseau *Tous Chercheurs* comprend actuellement les laboratoires de Marseille (biologie/santé) depuis 2004 (tête de réseau), Hippocampe Math (mathématiques) depuis 2005 et les trois laboratoires de la région Grand Est, à Metz (développement durable, mesures physiques) et à Vittel (physico-chimie, écotoxicologie de l'eau) depuis 2016, et à Nancy (biologie et microbiologie) depuis 2018.

[2] Chercheurs indépendants : qui ont mené une recherche en l'absence de toute relation commerciale ou financière pouvant être interprétée comme un conflit d'intérêts potentiel.

[3] Expériences témoins : chaque expérience témoin diffère de l'expérience principale par un seul facteur. Si les résultats sont différents c'est par conséquent le facteur différent au départ qui en est responsable. Les expériences témoins sont indispensables à la vérification de tout résultat.

Figure 1. *De haut en bas : scolaires, grand public ou membres d'association de malades effectuant des expériences par équipe, dans les laboratoires ouverts Tous Chercheurs.*

stage par l'analyse du résultat de la même expérience (il s'agissait dans ce cas de l'observation au microscope confocal de macrophages dans une coupe de peau lésée). Une fois définis les mots incompris, les élèves décrivent aux tuteurs ce qu'ils voient et tentent d'apporter des réponses possibles aux interrogations inhérentes aux observations qui ont été faites. À l'issue de cette étape, émerge la problématique : « Quelles sont les réponses possibles du macrophage face à une infection bactérienne ? ». Les élèves émettent plusieurs hypothèses de recherche (élimination des bactéries par « ingestion » et/ou production de molécules toxiques, synthèse de messagers de l'inflammation) qui seront traitées de manière indépendante par les groupes et testées chacune par une ou deux expériences. Les protocoles correspondants sont imaginés dans leurs grandes lignes par les élèves, en particulier les expériences témoins, support principal de discussions lors de la présentation finale des résultats.

Les manipulations réalisées par les quatre groupes répondent aux questions suivantes : est-il possible de visualiser la phagocytose des bactéries avec un microscope optique ? Peut-on détecter le lysozyme dans les milieux de culture de macrophages et tester son pouvoir bactéricide par spectrophotométrie ? Comment mettre en évidence l'expression de la protéine iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) et quantifier le monoxyde d'azote (NO) produit après stimulation des macrophages par un composant bactérien, tel que le lipopolysaccharide (LPS), constituant de la membrane externe de certaines bactéries ? Les macrophages activés par le LPS libèrent-ils des cytokines, comme l'interleukine 1β (IL-1β), et peut-on en mesurer la production ?

Stage pour les membres d'associations de malades

Chaque stage de 3 jours est proposé à un groupe de 12 personnes (malades, apparentés, aidants) concernés par une pathologie chronique [6]. Dans le cas des maladies auto-immunes, les stagiaires observent un résultat d'analyse biologique ou d'expérience scientifique. Ils posent plusieurs questions : Quels dérèglements immunitaires se produisent dans l'organisme et quelles en sont les causes ? Quelles pistes thérapeutiques pour permettre un retour à l'équilibre chez le patient ?

Après un bref exposé des notions de base en immunologie, nous leur faisons observer des cellules immunitaires au microscope. Ils analysent comment ces cellules répondent à un stimulus étranger en dosant la production de messagers chimiques en réponse à ce stimulus. La discussion porte ensuite sur la reconnaissance du danger par le système immunitaire, des mécanismes de régulation mis en jeu et des dérèglements possibles. Le deuxième jour est consacré au questionnement autour du volet diagnostique des pathologies auto-immunes : qu'est-ce qu'un biomarqueur ? Que mesurer, à partir de quel échantillon et comment le faire ? Ce marqueur aide-t-il à poser un diagnostic, à anticiper des poussées de la maladie ou à prédire une réponse à un traitement ?

Les stagiaires réalisent un test de détection d'auto-anticorps associés à la maladie auto-immune. La discussion porte sur la difficulté de concevoir et d'obtenir des biomarqueurs qui soient spécifiques et fiables pour chaque pathologie auto-immune, les avantages et les limites de ces techniques et les pistes de recherche. Le volet thérapeutique est abordé le dernier jour, avec une attention particulière aux anticorps monoclonaux. Les stagiaires isolent, à l'aide d'anticorps monoclonaux couplés à des billes aimantées, des lymphocytes B à partir d'une culture contenant différents types de cellules. Les avantages et les limites de telles approches sont ensuite discutées. Le stage se clôt par une discussion avec un chercheur ou un médecin chercheur spécialiste de la pathologie.

Stages pour le Grand Public : recherche participative CiTIQUE

Les stagiaires, âgés de 10 à 99 ans, sont accueillis par groupe d'une dizaine de personnes pendant 2 jours au cours desquels ils participent à CiTIQUE, un programme de recherche participative sur l'écologie des tiques et des maladies associées [7,8]. Placés devant des images choisies pour introduire le contexte de ces recherches participatives, ils s'interrogent sur le risque pour la santé humaine que représentent les tiques véhiculées par les animaux familiers (chien et chat) et formulent des questions de recherche : les tiques qui piquent le chat et le chien sont-elles les mêmes que celles qui piquent l'homme ? Les tiques qui piquent le chat et le chien véhiculent-elles des agents pathogènes pour l'homme ? Pour y répondre, les stagiaires observent et identifient des tiques ayant piqué des chiens et des chats, envoyées au laboratoire Tous Chercheurs de Nancy par des citoyens dans le cadre de CiTIQUE. Ils comparent leurs résultats à ceux de la littérature scientifique sur la diversité des tiques qui piquent l'homme. Ils extraient l'ADN contenu dans ces tiques et recherchent par une approche d'amplification génique la présence dans ces tiques d'agents pathogènes pour l'homme, notamment la bactérie responsable de la maladie de Lyme. Plusieurs temps de discussion sur la démarche de recherche et les résultats obtenus ont lieu pendant le stage entre les stagiaires et les scientifiques présents. En fin de stage, une discussion plus large est engagée sur la portée, pour le programme CiTIQUE, des nouveaux résultats acquis pendant le stage, et sur les conséquences en termes de prévention du risque de piqûre de tiques.

Conclusion

Les retombées des stages Tous Chercheurs sont multiples, comme l'apprentissage de la cohésion de groupe, l'orientation, car les scolaires découvrent un campus universitaire et rencontrent des professionnels[4], la confiance en soi et le développement de l'autonomie notamment des malades dans leurs discussions avec les équipes médicales, le plaisir de participer à une recherche importante pour la société, pour les citoyens engagés dans des recherches participatives, le soutien vers l'emploi pour les tuteurs lorsqu'ils sont en attente d'emploi ou en reconversion. ◊

The open labs *Tous Chercheurs*

[4] Incitation au projet professionnel par l'orientation active sur un campus scientifique. Réalisée en 2013 par Gayraud L, Rousset P, le Céreq, pour le compte du Fonds d'expérimentation pour la jeunesse sur l'action de Tous chercheurs, met en évidence une augmentation de près de 50 % de l'engagement dans des études scientifiques longues des élèves issus de ZEP dans l'académie d'Aix-Marseille : 34 % de ceux qui ont participé au projet, contre 24 % pour le groupe-témoin. https://www.touschercheurs.fr/wp-content/uploads/2019/04/EvalhippoS.pdf

REMERCIEMENTS

Remerciements aux autres membres des équipes des laboratoires Tous Chercheurs et en particulier Amina Mokrane, Lionel Vaux, Elodie Stamm (Marseille) ; Harry Ramenah, Frédéric Lecerf, Souad Morsli, Moustapha Ba, Michel Kam (Metz) ; Blandine Caquet, Michelle Cussenot (Vittel) et à nos partenaires (voir touschercheurs.fr). Le Laboratoire Tous Chercheurs Nancy a bénéficié d'aides de la Région Grand Est, du FEDER et de l'État au titre du Programme Investissements d'Avenir : ANR-11-LABX-0002-01 (Laboratoire d'Excellence ARBRE), ANR-15-IDEX-04-LUE, Territoire d'Innovation « Des Hommes et Des Arbres ».

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Orange C. Peut-on faire des sciences sans modéliser ? Peut-on enseigner les sciences sans faire modéliser ? In : Evrard T, Amory B (dir.). *Les modèles, des incontournables pour enseigner les sciences.* Bruxelles : de Boeck. 2015 : 11-33.
2. Schlaepfer G, Weber M. Thought experiments in biology. In : Michael T. Stuart, Yiftach Fehige, James Robert Brown eds. *The Routledge companion to thought experiments.* London : Routledge, 2018 : 243-56.
3. Aditomo A, Goodyear P, Bliuc AM, Ellis RA. Inquiry-based learning in higher education: principal forms, educational objectives, and disciplinary variations. *Studies Higher Education* 2013 : 38 : 1239-58.
4. Healey M. Linking research and teaching: exploring disciplinary spaces and the role of inquiry-based learning. In : Barnett R, ed. *Reshaping the University: nnew relationships between research, scholarship and teaching.* New York : McGraw Hill/Open University Press, 2005 : 67-78.
5. Hammond C, Karlin D, Thimonier J. Creative research science experiences for high school students. *PLoS Biol* 2010 : 21 : e1000447.
6. Mathieu M, Hammond C, Karlin DG. An innovative lab-based training program to help patient groups understand their disease and the research process. *PLoS Biol* 2015 : 13 : e1002067.
7. Houlier F. Rapport sur les sciences participatives en France. État des lieux, bonnes pratiques et recommandations. https://inra-dam-front-resources-cdn.wedia-group.com/ressources/afile/320323-7bb62-resource-rapport-de-la-mission-sciences-participatives-fevrier-2016.html
8. Guerrini CJ, Majumder MA, Lewellyn MJ, McGuire AL. Citizen science, public policy. *Science* 2018 : 361, 134-6.

TIRÉS À PART

C. Hammond

Abonnez-vous à *médecine/sciences*

Bulletin d'abonnement page 294 dans ce numéro de *m/s*

médecine/sciences 2020 ; 36 : 274-88

Partenariat *médecine/sciences* – Écoles doctorales – Masters (27)

L'actualité scientifique vue par les étudiants du Master Biobanks and Complex Data Management

> Le Master *Biobanks and Complex Data Management* forme les *managers* des biobanques. Créé en 2017 à l'Université Côte d'Azur par le Professeur Paul Hofman, ce master prépare les étudiants au management des biobanques (humaines, animales, plantes et autres organismes vivants) et des données complexes. Au-delà du stockage des collections d'échantillons biologiques, il faut en assurer la qualité, la conservation, la disponibilité auprès des réseaux de chercheurs en respectant la législation et l'éthique. Les enseignements du master se partagent entre les compétences disciplinaires en qualité, hygiène et sécurité, réglementation, bioéthique, biobankonomics et les enseignements techniques réalisés à la biobanque du CHU de Nice, puis mis en pratique lors de deux stages de 6 mois.

Dans le cadre de l'UE de Management de projet, les étudiants ont mené ce projet d'écriture à partir de publications scientifiques débattues avec l'équipe pédagogique.

Une Nouvelle portant sur le système de gestion de l'information a été rédigée par des étudiantes anglophones. Nous remercions la rédaction de *médecine/sciences* d'avoir autorisé sa publication en anglais. <

UNIVERSITÉ CÔTE D'AZUR

BIOBANKS & COMPLEX DATA MANAGEMENT

L'actualité scientifique vue par les étudiants du Master Biobanks and Complex Data Management

Équipe pédagogique

Paul Hofman (professeur, Université Côte d'Azur)
Marius Ilié (professeur, Université Côte d'Azur)
Elodie Long-Mira (maître de conférences, Université Côte d'Azur)
Nicole Arrighi (maître de conférences, Université Côte d'Azur)

Contact

MSc Biobanks and Complex Data Management,
Université Côte d'Azur, Centre Hospitalier Universitaire de Nice,
Hôpital Pasteur, Biobanque BB-0033-00025, masterbiobank@univ-cotedazur.fr
http://univ-cotedazur.fr/UCA/uca/en/education/informations-utiles/les-informations-utiles/biobanks-complex-data

Série coordonnée par Sophie Sibéril.

NOUVELLE

Les biobanques, des structures essentielles à la recherche médicale

Thomas Liney, Alexandre Mitov, Gbago Laurent Onivogui, Nicole Arrighi

MSc *Biobanks and Complex Data Management*,
Université Côte d'Azur, Centre Hospitalier Universitaire de Nice,
Hôpital Pasteur, Biobanque BB-0033-00025, Nice, France.
thomas.liney@etu.univ-cotedazur.fr
alexandre.mitov@etu.univ-cotedazur.fr
gbago.onivogui@etu.univ-cotedazur.fr
nicole.arrighi@unice.fr
masterbiobank@univ-cotedazur.fr

> La collecte d'échantillons biologiques s'inscrit dans une longue tradition de conservation du vivant. Maillons essentiels de la recherche scientifique, les collections d'échantillons humains sont conservées par des structures appelées historiquement Centres de Ressources Biologiques (CRB). Après avoir défini l'organisation des biobanques, nous expliquerons comment celles-ci jouent un rôle majeur dans la recherche médicale et quels sont les nouveaux défis auxquels elles sont confrontées.

La définition des biobanques, leur structure et leur organisation

Le concept de CRB a été introduit en 2001 par l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), pour désigner les structures qui se professionnalisent dans la gestion

m/s n° 3, vol. 36, mars 2020
https://doi.org/10.1051/medsci/2020040

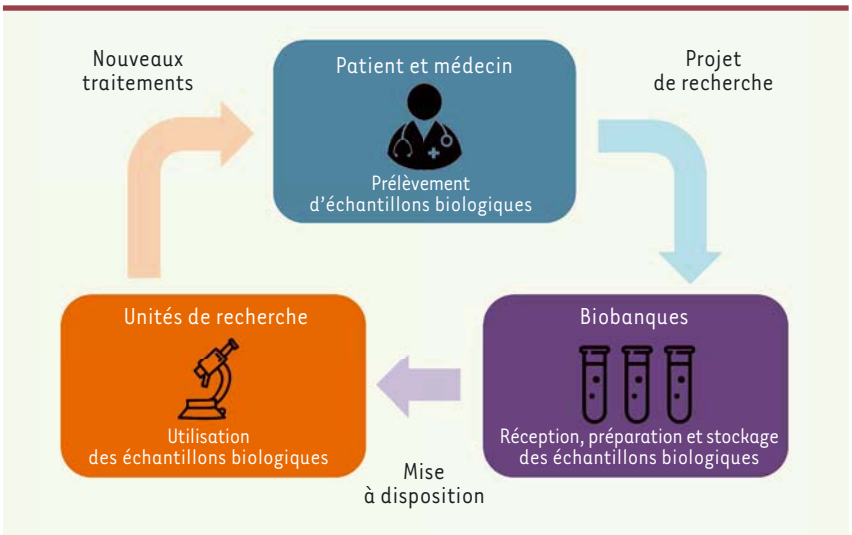


Figure 1. Les acteurs du projet de recherche biomédicale. Le médecin prélève l'échantillon biologique en s'assurant du consentement du patient. Cet échantillon est traité et conservé par la biobanque. Le chercheur utilisera cet échantillon et les données associées à cet échantillon dans le cadre d'un projet de recherches biomédicales.

des ressources biologiques à des fins de recherches. Pour l'OCDE, les CRB sont des « centres de conservation de cellules vivantes, du génome de divers organismes, et d'informations sur l'hérédité et les fonctions des systèmes biologiques. Les CRB doivent satisfaire aux critères élevés de qualité et d'expertise exigés par la communauté internationale des chercheurs, et par les industriels concernant la diffusion d'informations et de matériels biologiques » [1].

Les biobanques assurent la gestion complète des échantillons et des données associées, en encadrant les pratiques de collecte et de conservation avec des procédures standardisées. Pour valoriser leurs collections et ainsi multiplier les utilisations présentes et futures des ressources biologiques, les biobanques sont organisées en réseaux nationaux et internationaux. En France, le réseau *Biobanques* est coordonné par l'Inserm, en partenariat avec l'Institut national du cancer, l'Institut Pasteur et l'Établissement français du sang [2]. Ces réseaux ont pour objectif de mutualiser les collections d'échantillons. Ils mettent aussi en relation les biobanques avec des partenaires industriels pour accélérer la recherche translationnelle.

Depuis une vingtaine d'années, le nombre croissant de biobanques a nécessité d'adopter une classification universelle qui améliore leur visibilité. La plus acceptée est issue du réseau européen BBMRI (*biobanking and biomolecular resources research infrastructure*). Elle distingue les biobanques populationnelles (pour étudier des cohortes de volontaires afin de comprendre les facteurs influençant l'apparition de maladies complexes), et les biobanques thématisées par maladie (collectant des échantillons et les informations associées de patients atteints d'une maladie spécifique) [3].

Le rôle premier des biobanques dans la recherche biomédicale

Les biobanques sont aujourd'hui reconnues comme des catalyseurs de la recherche biomédicale. Le développement rapide de ces structures est la conséquence d'un besoin croissant d'échantillons biologiques de qualité. À l'origine « entrepôts » de matériels biologiques, elles sont devenues des infrastructures de recherche à part entière. *UK Biobank* en est une parfaite illustration : ce projet national britannique contribue à la découverte de nouveaux traitements ciblant un large éventail de maladies liées au vieillissement. Depuis 2006, *UK Biobank* a collecté des échantillons auprès de plus de 500 000 participants, ainsi que de nombreuses données biologiques et cliniques. Le génotypage de l'ADN des participants a été réalisé, permettant ainsi d'accroître la valeur des cohortes [4].

À titre d'exemple d'outil de santé publique mené en France, la cohorte épidémiologique *CONSTANCES* rassemble les échantillons biologiques de 200 000 personnes âgées de 18 à 69 ans, issues de la population générale et inscrites au régime de la sécurité sociale, afin d'étudier les facteurs responsables de l'apparition de maladies. Cette cohorte est menée en partenariat avec l'IBBL (*integrated biobank of Luxembourg*) qui a fourni les kits de collecte et planifié les opérations logistiques de transport, de traitement et de conservation des échantillons. Début avril 2019, près de 250 000 tubes d'urine, plasma, sérum et couche leuco-plaquettaire provenant de 9 500 volontaires ont été conservés par la biobanque [5].

Les biobanques représentent également un enjeu capital pour le développement de la médecine personnalisée. Elles sont devenues des supports essentiels contribuant à améliorer le diagnostic : l'accès à des ressources biologiques en grande quantité permet de cibler des mécanismes biologiques impliqués dans l'apparition de maladies telles que le cancer. Cette nouvelle approche thérapeutique est fondée sur l'identification de biomarqueurs, permettant d'établir une prédiction de la réponse du patient à un traitement proposé. La découverte de nouveaux biomarqueurs candidats entraîne la mise en place d'études rétrospectives, permises par de grandes collections d'échantillons, accompagnées de données épidémiologiques, cliniques, histologiques, et génomiques précises [3].

Certains grands réseaux, comme BBMRI, plaident pour l'émergence de centres d'expertises médicale, technique,

analytique et éthico-légale [6]. Par le respect de procédures standardisées, ces centres experts proposent aux chercheurs des échantillons de qualité supérieure. L'impact de la phase pré-analytique sur la qualité des échantillons stockés dans les biobanques sera développé ci-après.

Les nouveaux défis des biobanques

La force des biobanques réside dans leurs collections à grande échelle. Ces échantillons constituent un matériel précieux sur lesquels pourront être appliquées les techniques futures, qui permettront de nouvelles découvertes. Encore faut-il que l'activité des biobanques perdure. Le premier défi de la biobanque est d'inventer son propre modèle économique et de se doter des outils de gestion efficaces pour que son activité soit pérenne. Son second défi est d'encourager le don d'échantillons auprès de l'individu et plus largement de la population. Nous développerons en premier lieu la priorité d'autonomie financière des biobanques, et ensuite, les défis sociétaux auxquels elles font face.

Dans un paysage scientifique international, les biobanques doivent assurer leur développement économique. Une biobanque doit trouver l'équilibre financier qui couvre ses coûts sans pour autant réaliser de bénéfice. Ce paradoxe apparent est par ailleurs abordé [10] (➜).

(➜) Voir la Nouvelle de H. Squalli *et al.*, page 282 de ce numéro

Cette nouvelle discipline – *Biobankonomics* - répond aux questions fondamentales de l'analyse économique [7]. Quels sont les coûts ? Quels sont les financements ? Quels sont les indicateurs de performance ? Le nombre d'échantillons conservés dans la biobanque est-il le meilleur indicateur de son activité ? Nous expliquerons les outils de gestion spécifique et proposerons des solutions pour optimiser la durabilité des biobanques [10].

Depuis une vingtaine d'années, la Communauté Européenne soutient le développement des biobanques. Le programme Horizon 2020 pour la recherche et l'innovation (2014-2020) a établi trois priorités pour un financement à hauteur de 80 milliards d'euros : l'excellence scientifique, la primauté industrielle, et les défis sociétaux. Le premier de ces défis concerne la santé, le changement démographique et le bien-être. Le financement de 7,472 milliards d'euros est fléché pour la recherche biomédicale et la santé humaine [8]. La participation des biobanques y est inscrite (Programme de travail 2018-2020) en termes de collaboration avec les registres, les référentiels et les infrastructures de recherche.

Dans le domaine des biobanques, la standardisation des procédures et des principes éthiques sont étudiés par la société internationale pour les référentiels biologiques et environnementaux (*International society for biological and environmental repositories*, ISBER). Le guide de bonnes pratiques de l'ISBER partage les stratégies reconnues par la communauté scientifique, et aide les utilisateurs dans les démarches d'accréditation selon des standards nationaux ou internationaux [9]. Ces procédures standardisées dédiées à la gestion d'informations des biobanques seront développées par ailleurs [11] (➜).

(➜) Voir la Nouvelle de C. Le Queau *et al.*, page 285 de ce numéro

Au-delà des enjeux technologiques, les enjeux sociétaux sont à considérer et prioritairement la protection de l'individu. Un point sur l'accès à l'information concernant l'individu, le recueil de son consentement, et la garantie de la confidentialité des données fera l'objet de l'article par Messaoudi *et al.* dans ce numéro [12] (➜).

(➜) Voir page 279 de ce numéro

Cette étape franchie, l'individu est assuré que ses données personnelles resteront strictement confidentielles. ◊

Introduction into the world of biobanks in human health

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. OCDE. *Les centres de ressources biologiques. Fondements du développement des sciences de la vie et des biotechnologies*. Paris : OCDE, 2001.
2. http://www.biobanques.eu/fr/nous-connaitre/infrastructure
3. Kinkorová J. Biobanks in the era of personalized medicine: objectives, challenges, and innovation. *EPMA J* 2016 ; 7 : 1-12.
4. https://www.ukbiobank.ac.uk/about-biobank-uk/
5. http://www.constances.fr/
6. Van Ommen G-J, Törnwall O, Bréchot C, *et al.* BBMRI-ERIC as a resource for pharmaceutical and life science industries: the development of biobank-based expert centres. *Eur J Hum Genet 2015 ; 23* : 893-900.
7. Vaught J, Rogers J, Carolin T, Compton C. Biobankonomics: Developing a sustainable business model approach for the formation of a human tissue biobank. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2011 ; 2011 : 24-31.
8. Kinkorová J, Topolčan O. Biobanks in horizon 2020: sustainability and attractive perspectives. *EPMA J* 2018 ; 23 : 345-53.
9. Campbell LD, Astrin JJ, DeSouza Y, *et al.* The revision of the ISBER best practices: summary of changes and the editorial team's development process. *Biopreserv Biobank* 2018 ; 16 : 3-6.
10. Sqalli H, El Awadi N, Rancati. *Biobankonomics* et pérennité financière des biobanques. *Med Sci (Paris)* 2020 ; 36 : 282-5.
11. Le Queau C, Phillips WA, Srinivasan A. Étude du système de gestion de l'information (biobank information management system) pour les annotations clinico-biologiques des biobanques. *Med Sci (Paris)* 2020 ; 36 : 285-8.
12. Messaoudi Z, Soltani N, Arrighi N. Bioéthique : l'existence des contraintes légales et réglementaires des biobanques. *Med Sci (Paris)* 2020 ; 36 : 279-82.

m/s médecine/sciences

Abonnez-vous à *médecine/sciences*

Bulletin d'abonnement page 294 dans ce numéro de *m/s*

Impact de la phase pré-analytique sur la qualité des échantillons collectés dans les biobanques

Marion Amalfitano, Qifeng Dong, Aissata Keita

MScBiobanks and Complex Data Management, Université Côte d'Azur, Centre hospitalier universitaire de Nice, Hôpital Pasteur, Biobanque BB-0033-00025, Nice, France.
marion.amalfitano@etu.univ-cotedazur.fr
qifeng.dong@etu.univ-cotedazur.fr
aissata.keita@etu.univ-cotedazur.fr
masterbiobank@univ-cotedazur.fr

> La recherche médicale nécessite un investissement financier important. Une étude réalisée par Freedman *et al.* a ainsi estimé cet investissement à 56 milliards de dollars aux États-Unis en 2015 [1]. Selon ces auteurs, près de 28 milliards ont été investis dans des études précliniques qui ont conduit à des résultats non reproductibles. Ce problème de reproductibilité peut avoir pour origine le protocole expérimental, mais également la qualité des échantillons, non représentative du contexte physiopathologique. Face à ces problèmes de reproductibilité, les biobanques peuvent être un atout majeur. L'enjeu est non seulement d'assurer la collection des échantillons en grande quantité, mais également d'en garantir la conservation par le développement de procédures standardisées permettant le maintien de l'intégrité de différents types d'échantillons.

Les étapes clés de la phase pré-analytique

La phase pré-analytique comprend toutes les étapes, du prélèvement au traitement de l'échantillon. Durant ces étapes, le risque de dégradation de la qualité des échantillons est majeur [2]. Il est donc indispensable de contrôler chacune d'entre elles, et ce, dès que l'échantillon n'est plus irrigué par la circulation sanguine. Il s'agit de la phase d'ischémie, divisée en deux parties. La première, l'ischémie chaude, concerne uniquement les prélèvements lors d'une intervention chirurgicale. Elle commence lorsque l'échantillon à prélever n'est plus irrigué par la circulation sanguine, jusqu'au moment où il est totalement retiré de l'organisme. Seul le chirurgien peut contrôler la durée de cette étape. Suit l'ischémie froide, qui concerne tout échantillon. Il s'agit alors du transport depuis le lieu du prélèvement jusqu'au laboratoire d'analyse. Selon la distance parcourue et le moyen de transport utilisé (tube pneumatique, transport routier ou aérien), la durée d'acheminement peut être optimisée. La Haute autorité de santé (HAS) recommande un transport « sans rupture de la chaîne du froid, dans un container refroidi et saturé en vapeur d'azote ou dans de la carboglace ». Le suivi de ces conditions tout au long du trajet permet d'assurer un maintien de la qualité durant cette étape *(Figure 1)*.

Dès la réception au laboratoire, l'échantillon est soit fixé au formol et inclus en bloc de paraffine s'il s'agit d'un prélèvement solide, soit congelé avec une solution cryoprotectrice [3] (les tissus solides peuvent également faire l'objet d'une cryoconservation). L'inclusion en paraffine se fait à température contrôlée selon le point de fusion du type de paraffine utilisée (polymère, non-polymère et microcristalline), c'est-à-dire entre 45 °C et 65 °C, dans le but d'éviter toute dégradation des tissus. Les paraffines recommandées ont un point de fusion entre 55 °C et 58 °C [4].

Le choix de la solution cryoprotectrice a également une influence sur la qualité des tissus, concernant notamment les acides nucléiques. Les cryoprotecteurs les plus utilisés sont le glycérol et le diméthylsulfoxyde. Dans le cas d'extraction d'acides nucléiques, le kit d'extraction peut également influencer la qualité du produit : c'est la raison pour laquelle il existe des kits qui favorisent la qualité d'extraction plutôt que le rendement [5].

Cependant, même si la collection se fait dans des conditions optimales, cela ne préfigure pas l'interprétabilité des résultats post-analyse, qui dépend de la nature même de l'échantillon.

L'analyse se fait uniquement sur une petite quantité de matière, qui doit être sélectionnée avec soin pour être représentative de l'état physiopathologique d'un patient ou représenter les caractéristiques d'un échantillon. Par exemple, dans le cas d'une biopsie liquide, si trop peu de cellules tumorales circulantes sont présentes dans le prélèvement sanguin, l'analyse pourrait donner de faux résultats négatifs. Il en serait de même avec un prélèvement de tissu solide comportant un grand pourcentage de cellules nécrosées et peu de cellules cancéreuses ou tumorales.

Le maintien de la qualité des échantillons durant la période de stockage

Après le traitement pré-analytique, la conservation de la qualité est toujours prioritaire. Dans le cas où la totalité de l'échantillon n'est pas utilisée, il peut servir à de futures analyses plusieurs années après la collection. C'est

https://doi.org/10.1051/medsci/2020041

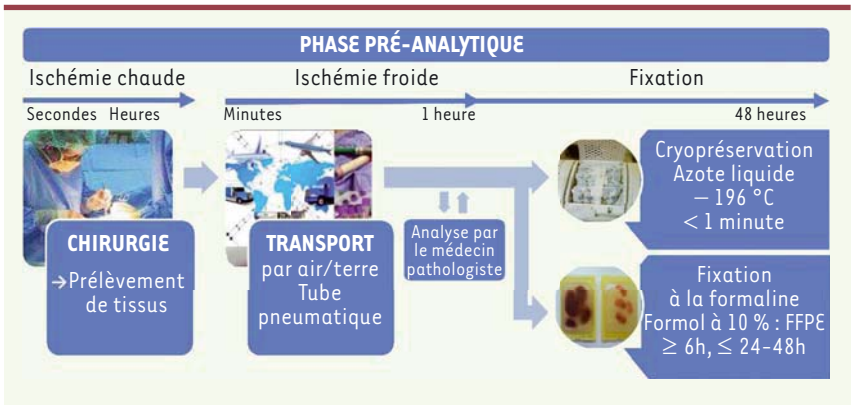


Figure 1. ***Descriptif des différentes étapes de la phase pré-analytique.*** Cette chaîne comprend le prélèvement lors de l'intervention chirurgicale, puis le transport de l'échantillon jusqu'à la biobanque où il est cryoconservé ou fixé au formol et inclus en paraffine.

la raison pour laquelle il est important de maintenir la qualité de l'échantillon pendant toute la durée de la conservation.

La fixation et l'inclusion de l'échantillon

Les tissus fixés au formol et inclus en bloc de paraffine se gardent à température ambiante de nombreuses années sans altérer l'intégrité des cellules. La qualité de l'analyse histologique sera donc préservée. À l'inverse, les acides ribonucléiques (ARN) sont instables à température ambiante car les ribonucléases responsables de leur dégradation ne sont inactives qu'à une température inférieure à -70 °C. Les échantillons servant à l'extraction et l'analyse de ces ARN sont donc conservés à très basse température dans des congélateurs spécialisés (à -80 °C) ou en présence d'azote liquide (-196 °C). Les congélateurs à -80 °C doivent être soumis à des contrôles de maintenance réguliers pour éviter le déstockage ou la perte des collections en cas de panne électrique. La HAS recommande également de placer ces congélateurs « dans des locaux fermant à clé, avec climatisation et systèmes d'alarme efficaces ». Les réservoirs d'azote liquide doivent être manipulés par des techniciens qualifiés en raison des risques de brûlure et d'asphyxie, dans une pièce équipée d'un détecteur du niveau d'oxygène.

Enfin, il est possible de conserver les acides nucléiques à température ambiante grâce à différentes techniques, comme l'utilisation de solutions stabilisantes qui empêchent la dégradation des acides nucléiques et permettent ainsi une meilleure conservation des tissus. RNAlater® et DNAstable® sont deux solutions stabilisantes permettant de conserver les acides nucléiques sur de longues durées, à température ambiante ou à température de congélation classique (-20 °C pour préserver l'ARN). RNAlater® permet d'inhiber l'action des RNases dans l'échantillon. DNAstable® déshydrate l'échantillon pour réduire l'activité biologique, physique, et chimique dégradant l'ADN. Des solutions alternatives existent sur le marché (CloneStable®, DNAguard®, RNAstable®). Il existe également des cartes de collection (Whatman®FTA® card, GenCollect™ DNA card) qui permettent de conserver les prélèvements liquides. Elles ont pour rôle de lyser les cellules, de dénaturer les protéines et de protéger l'ADN de la dégradation [6], en les fixant sur la matrice protectrice qui recouvre le papier. L'extraction se fait après le stockage, en découpant une partie du papier imbibé du liquide biologique, puis en procédant à l'extraction de l'ADN. La lyophilisation est également un procédé stabilisateur, qui consiste à déshydrater les échantillons par sublimation de l'eau, à très basses pression et température, pour éviter une dégradation par la chaleur.

Les trois méthodes de conservation précédentes sont cependant moins répandues dans les biobanques, en raison de leur coût et de leur développement récent, qui ne permet pas encore de disposer d'un recul suffisant pour évaluer leur efficacité. De plus, la conservation à très basse température et l'inclusion en blocs de paraffine sont encore considérées comme les méthodes de référence pour les analyses génétiques et les analyses histologiques, respectivement.

La traçabilité des échantillons

Garantir le maintien de l'intégrité de l'échantillon durant toute la période de conservation est l'une des missions principales des biobanques. Les biobanques doivent également gérer le suivi, la traçabilité et la mise à disposition des échantillons.

De nombreux laboratoires sont dotés d'un système de gestion informatisée appelé *Laboratory information management system* (LIMS), indispensable à la gestion de grands nombres d'échantillons. Le LIMS, système datant de la fin des années 1970, permet de suivre toutes les étapes à partir de la collecte des échantillons et de gérer les informations qui leur sont associées - cliniques, médicales, personnelles - en les stockant dans une base de données afin d'assurer une meilleure traçabilité des échantillons. Le LIMS gère la confidentialité des données et leur sécurité. Il assure la sauvegarde de documents et une distribution sécurisée des échantillons et des données associées entre des institutions de recherche collaborative, tout en respectant le cadre réglementaire et éthique [7].

En France, les biobanques peuvent acquérir une certification particulière (norme NF-S96-900), propre aux structures ayant une activité de centre de ressources biologiques (CRB). Cette norme fournit des exigences pour le système de gestion de la qualité des CRB

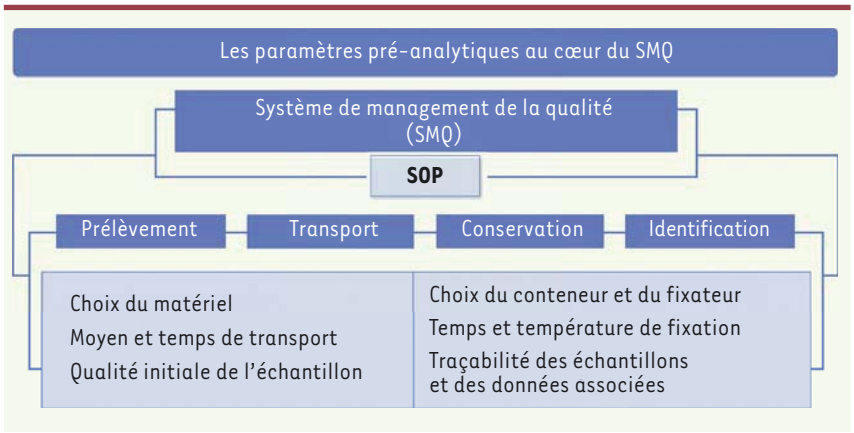


Figure 2. ***Les activités du système de management de la qualité (SMQ).*** L'harmonisation des protocoles est encadrée par les procédures opérationnelles standard (*standard operating procedures*, SOP) à toutes les étapes de la chaîne pré-analytique.

afin de faciliter l'acquisition, la validation, la conservation et la distribution des ressources biologiques en garantissant l'assurance qualité et la traçabilité des échantillons. Pour répondre aux critères de ces normes, ces structures peuvent s'appuyer sur un système de *management* de la qualité (SMQ), répondant aux exigences de la certification ISO 9001, et fondé notamment sur la mise en place de procédures standardisées et d'audits *(Figure 2)*.

Grâce à un haut niveau de standardisation et des procédures normalisées partagées entre les différents centres, le réseau européen de biobanques BBMRI-ERIC met en place ses propres routines de validation. Cela permet de créer des centres experts de biobanques, en phase avec les avancées de la recherche pharmaceutique ou médicale, et des techniques analytiques. ◊

Impact of the pre-analytical phase on the quality of samples collected in biobanks

RÉFÉRENCES

1. Freedman LP, Cockburn IM, Simcoe TS. The economics of reproducibility in preclinical research. *PLoS Biol* 2015 ; 13 : e1002165.
2. Gaye A, Peakman T, Tobin MD, Burton PR. Understanding the impact of pre-analytic variation in haematological and clinical chemistry analytes on the power of association studies. *Int J Epidemiol* 2014 ; 43 : 1633-44.
3. Gaffney E, Riegman P, Grizzle W, Watson P. Factors that drive the increasing use of FFPE tissue in basic and translational cancer research. *Biotech Histochem* 2018 ; 93 : 373-86.
4. Engel KB, Moore HM. Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med* 2011 ; 135 : 537-43.
5. Watanabe M, Hashida S, Yamamoto H, *et al*. Estimation of age-related DNA degradation from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue according to the extraction methods. *Exp Ther Med* 2017 ; 14 : 2683-8.
6. Rahikainen AL, Palo JU, de Leeuw W, *et al*. DNA quality and quantity from up to 16 year old post-mortem blood stored on FTA cards. *Forensic Sci Int* 2016 ; 261 : 148-53.
7. Bianchi V, Ceol A, Ogier AG, *et al*. Integrated systems for NGS data management and analysis: open issues and available solutions. *Front Genet* 2016 ; 7 : 75.

NOUVELLE

Bioéthique

L'existence des contraintes légales et réglementaires des biobanques

Zeineb Messaoudi, Nisrine Soltani, Nicole Arrighi

MSc *Biobanks and complex data management*,
Université Côte d'Azur, Centre hospitalier universitaire de Nice,
Hôpital Pasteur, Biobanque BB-0033-00025, Nice, France.
zeineb.messaoudi@etu.univ-cotedazur.fr
nisrine.soltani@etu.univ-cotedazur.fr
nicole.arrighi@unice.fr
masterbiobank@univ-cotedazur.fr

> En 2000, l'Islande fut le premier pays européen à réglementer les pratiques des biobanques par l'*Icelandic Act on Biobanks* n° 110/2000, suivie de l'Estonie, de la Suède et de la Finlande en 2012. Contrairement aux pays d'Europe du Nord, les biobanques françaises ne font pas l'objet d'une loi particulière. Cependant, leurs activités sont strictement réglementées. Dans ce contexte, quelles sont les contraintes légales et réglementaires des biobanques ? Pour répondre à cette question, nous définirons d'abord le cadre juridique des biobanques en France, puis nous expliquerons comment ce cadre légal garantit la protection des individus et des données personnelles.

Le cadre juridique des biobanques

À ce jour, la réglementation française repose sur deux lois présentant les procédures générales de gestion des collections d'échantillons biologiques humains à visée scientifique : la loi n° 2004-806 du 9 août 2004 relative à la politique de santé publique [1] et la loi n° 2004-800 du 6 août 2004 relative

Figure 1. ***Les démarches administratives indispensables à la conservation de la collection d'échantillons biologiques humains dans une biobanque.*** Le consentement est signé par le patient avant le prélèvement de l'échantillon biologique. Cet échantillon peut être inclus dans une collection d'une biobanque. Au préalable, le responsable de la biobanque aura demandé l'avis favorable du comité de protection des personnes (CPP) et déclaré la conservation de la collection auprès du ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation et de l'Agence nationale de sécurité du médicament (ANSM) et des produits de santé ainsi que de l'agence régionale de l'hospitalisation (ARH). La création de nouvelles données issues de la recherche est soumise pour autorisation auprès de la commission nationale de l'informatique et des libertés (CNIL). Dans le cas de cellules souches embryonnaires, l'autorisation de conservation de la collection est demandée auprès de l'agence de biomédecine.

à la bioéthique [2]. Réformée avec la loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011, le législateur a procédé à une modification ponctuelle de la loi de 2011 par la loi n° 2013-715 du 6 août 2013 « autorisant sous certaines conditions la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires » [3].

Ce dispositif législatif figure dans le code civil pour les principes généraux : dignité de la personne, inviolabilité du corps humain, extra-patrimonialité du corps et de ses produits et éléments (code civil, art. 16 à 16-14). Plus largement, les biobanques sont soumises aux textes du code de la santé publique (CSP) encadrant les activités scientifiques et la recherche biomédicale subordonnée au respect des principes généraux relatifs au don et à l'utilisation des éléments et des produits du corps humain (CSP art. L 1211-1 à L 1211-9).

Les activités réglementées, les régimes de déclaration et d'autorisation

Par définition, une collection d'échantillons biologiques humains « résulte de la réunion, à des fins scientifiques, de prélèvements biologiques effectués sur un groupe de personnes identifiées et sélectionnées en fonction des caractéristiques cliniques ou biologiques d'un ou plusieurs membres du groupe, ainsi que des dérivés de ces prélèvements » (CSP art. L. 1243-3). Avant de commencer la collection, son responsable scientifique ou celui de la biobanque engage plusieurs démarches administratives :

- la demande d'avis favorable d'un comité de protection des personnes (CPP). L'information des participants, le recueil du consentement, et le protocole de recherche, la pertinence éthique et scientifique du projet sont alors évaluées.
- la déclaration de demande de conservation de collection auprès de l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) et auprès du ministère chargé de la recherche (art. 36-I de la loi du 6 août 2004) *(Figure 1)*.

Le cas particulier des embryons et des cellules souches embryonnaires

La loi n° 2013-715 du 6 août 2013 a modifié le régime des recherches sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires [4]. Seuls sont autorisés à mener ces recherches les établissements et organismes titulaires de l'autorisation de conservation des cellules souches embryonnaires à des fins de recherche ainsi que les établissements et organismes publics et privés poursuivant une activité de recherche et ayant conclu une convention avec les établissements et organismes précédents (CSP art. R 2151-3, II).

La conservation des embryons et des cellules souches embryonnaires à des

fins de recherche exige une autorisation délivrée par l'agence de la biomédecine (CSP art. R 2151-20).

Tout organisme conservant des embryons ou des cellules souches embryonnaires à fin de recherche doit pouvoir justifier du recueil des consentements donnés par les géniteurs des embryons. Lorsque les cellules souches embryonnaires ont été importées, l'organisme doit être en mesure de justifier qu'elles ont été obtenues dans le respect des prescriptions du code civil, avec le consentement préalable du couple géniteur de l'embryon conçu dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation, et que cet embryon ne fait plus l'objet d'un projet parental, ceci sans qu'aucun paiement, quelle qu'en soit la forme, n'ait été alloué au couple (CSP art. R 2151 - 18).

La chaîne des opérations et la chaîne des responsabilités

Le responsable d'une collection doit s'assurer du respect du cadre juridique. Il est le responsable administratif. Cependant, la personne initiatrice de la collection peut également être identifiée comme responsable scientifique de la collection et peut superviser la chaîne des opérations.

Les exigences quant au nombre d'échantillons et la pertinence des projets de recherches sont déterminées par le conseil scientifique de la biobanque. Il est composé de médecins et de chercheurs, et décide de la nature et du type de prélèvements autorisés dans la biobanque.

La biobanque peut céder ses échantillons par un accord de transfert de matériel (*material transfer agreement*, MTA) respectant les articles L. 1243-3, L.1243-4 et R. 1243-49 du CSP. Ce document contient les références et le but du demandeur (identité du demandeur, structure de l'institution, contexte de la demande, utilisation des matériels biologiques, charges et indemnités, respect de la confidentialité). La biobanque en demandera l'autorisation auprès du ministère chargé de la recherche.

La protection des participants et des données

Selon le CSP (art L.1211-2), « le prélèvement d'éléments du corps humain et la collecte de ses produits ne peuvent être pratiqués sans le consentement préalable du donneur. Ce consentement est révocable à tout moment ». Le consentement du patient et la protection des données sont les piliers de la recherche biomédicale.

L'indispensable consentement du patient

L'autorisation d'utilisation d'un échantillon humain nécessite le consentement libre et éclairé de l'individu (*informed consent*). Le patient exprime par écrit sa volonté de participer au projet de recherche après avoir été informé de façon claire sur le but des chercheurs. À tout moment, il peut se retirer de l'étude. Ce consentement, transmis au CPP, est obligatoire dès qu'il s'agit de l'utilisation des échantillons biologiques et des données personnelles ou de recherches génétiques.

Parfois, l'échantillon peut être utile à plusieurs investigateurs. Alors, le patient est consulté à nouveau et informé du nouveau domaine d'application. En France, l'utilisation secondaire des échantillons est fondée sur le principe de non-opposition. Dans le cadre du consentement éclairé large (*broad informed consent*), le patient est d'accord pour que - il ne s'oppose pas à ce que - les données associées à son échantillon soient utilisées dans un projet futur. En revanche, s'il est impossible de recontacter les patients, le responsable scientifique peut demander une requalification globale d'une collection auprès du CPP, en expliquant les objectifs des nouvelles recherches et surtout la nécessité d'inclure les échantillons des patients injoignables. Le CPP peut alors accepter la requalification, sauf dans le cas des études génétiques, pour lesquelles le consentement individuel est obligatoire, ainsi que pour l'utilisation des cellules germinales.

Finalement, les principes de non-opposition et de requalification montrent les limites de traçabilité du consentement individuel. Le retour d'informations au patient est une étape longue mais indispensable pour les biobanques qui veulent accroitre la taille de leur collection. Grâce à internet, les échanges avec le patient pourraient être accélérés par le consentement électronique dynamique (*electronic informed consent*) [5] (➜).

(➜) Voir le Forum de H.C. Stoeklé *et al.*, *m/s* n° 2, février 2017, page 188

La *food and drug administration* (FDA) américaine propose des recommandations dans ce sens, destinées aux responsables scientifiques, dans ses orientations de 2016 [6]. Ce consentement électronique apporte une information au patient, enrichie en vidéos et en échanges interactifs. En temps réel, il offre une traçabilité de l'échantillon : le clinicien s'assure que le patient a bien reçu les informations relatives au projet, et les industriels suivent l'utilisation des échantillons et des données.

La protection des données associées à l'échantillon et des données personnelles

Lorsqu'un individu consent à participer à un projet scientifique, il accorde sa confiance au médecin qui assure le prélèvement et garantit la confidentialité des résultats. L'échantillon biologique est ensuite inséré dans une collection d'une biobanque. La gestion de ces échantillons nécessite l'anonymisation des données. Quel est alors le degré d'anonymat recommandé ?

La procédure de pseudonymisation est standardisée dans une biobanque. Les informations d'identité de la personne (nom, prénoms, numéro de sécurité sociale) sont codées par une clé ou un code de cryptage, le même pour un même individu. Ce codage facilite le suivi longitudinal et le retour d'information au patient. Après le traitement des échantillons, le promoteur du projet va créer de nouvelles données, qui doivent être protégées. Depuis 2018, le nouveau

règlement général sur la protection des données personnelles (RGPD) de l'union européenne remplace la directive 95/46/CE sur la protection des données personnelles et leur libre circulation [7]. Ce règlement affecte les deux pôles de la biobanque, les actions relatives aux échantillons (prélèvement, conservation, utilisation en recherche) et les activités relatives aux données personnelles associées (collecte, conservation, utilisation) [8].

S'agissant souvent de données personnelles, le traitement des données doit respecter notamment la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à « l'informatique, aux fichiers et aux libertés », version consolidée le 23 juillet 2019. La commission nationale de l'informatique et des libertés (CNIL) doit être saisie avant tout traitement de données afin de s'assurer du respect de la sécurité et de la confidentialité, ainsi que de la bonne utilisation des données personnelles, surtout s'il s'agit de données génétiques.

Les biobanques virtuelles (*e-biobanking*) échangent déjà des données cliniques ou des clichés d'imagerie médicale. Le partage de ces données massives (*big data*) nous projette dans une dynamique d'échanges en temps réel (*biobank cloud*) dans le monde entier. Le troisième pilier de la recherche médicale - après les échantillons biologiques et les données associées - est l'encadrement réglementaire et légal qui veille au respect des droits des personnes, en les informant sur ces droits et en leur permettant de les exercer. ◊

Legal and ethical considerations for the use of biobanks

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Loi n° 2004-806 du 9 août 2004 relative à la politique de santé publique. NOR : SANX0300055L, JORF n° 185 du 11 août 2004, p. 14277.
2. Loi n° 2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique. NOR : SANX0100053L, JORF n° 182 du 7 août 2004, p. 14040.
3. Binet JR. Recherches sur l'embryon : fin d'un symbole éthique et abandon d'une illusion thérapeutique ; à propos de la loi n° 2013-715 du 6 août 2013. JCP G 2013 ; 905.
4. Arrighi N. Les cellules souches : des innovations thérapeutiques sous contrôle. ISTE 2018 : 121-7.
5. Stoeklé HC, Deleuze JF, Vogt G, Hervé C. Vers un consentement éclairé dynamique. Med Sci (Paris) 2017 ; 33 : 188-92.
6. Use of electronic informed consent in clinical investigations - Questions and answers. Guidance for institutional review boards, investigators, and sponsors. December 2016. http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm436811.pdf [Google Scholar]
7. Règlement (UE) 2016/679 du Parlement européen et du Conseil du 27 avril 2016 relatif à la protection des personnes physiques à l'égard du traitement des données à caractère personnel et à la libre circulation de ces données, et abrogeant la directive 95/46/CE (règlement général sur la protection des données). JOUE L119 du 4 mai 2016.
8. Chassang G, Cambon Thomsen A, Rial-Sebbag E, Dagher G. Éthique et réglementation des biobanques de recherche. Aspects opérationnels et perspectives. Paris : Biobanques, 2016.

NOUVELLE

Biobankonomics et pérennité financière des biobanques

Hadi Sqalli, Nora El Awadi, Caroline Rancati

MSc Biobanks and Complex Data Management, Université Côte d'Azur, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Hôpital Pasteur, Biobanque BB-0033-00025, Nice, France.
hadi_sqalli@hotmail.fr
nora.el-awadi@etu.univ-cotedazur.fr
caroline.rancati@etu.univ-cotedazur.fr
masterbiobank@univ-cotedazur.fr

> Le domaine des biobanques est un secteur en pleine expansion. Dès 2009, la couverture du magazine *Time* a cité les biobanques parmi les dix concepts qui allaient révolutionner le monde [1]. En effet, elles jouent un rôle clé en santé humaine. Si elles étaient cantonnées à la collecte d'échantillons pendant les années 1990, les biobanques sont devenues essentielles à la recherche médicale, notamment avec la percée de la médecine de précision. En fournissant divers types d'échantillons biologiques (tissu, sang, urine, cellules, acides nucléiques, etc.) ainsi que les données médicales associées, les biobanques permettent aux chercheurs de développer des analyses transcriptomiques, protéomiques ou métabolomiques à grande échelle, rendant possible l'identification de nouveaux biomarqueurs pronostiques ou diagnostiques et de nouvelles cibles thérapeutiques. L'identification de ces biomarqueurs a permis également le développement de « tests compagnons » pour l'utilisation des thérapies ciblées. Selon une définition de la haute autorité de santé, un test compagnon est un test diagnostique permettant de sélectionner, en fonction de leur statut pour un biomarqueur prédictif, les patients chez lesquels le traitement est susceptible d'apporter un bénéfice.

Les biobanques actuelles ont pour mission principale la gestion des échantillons. En parallèle, ces dernières doivent réaliser un développement économique, ce qui a généré une discipline nouvelle, nommée « biobankonomics », dont la fonction consiste à analyser le marché des biobanques. La taille du mar-

m/s n° 3, vol. 36, mars 2020
https://doi.org/10.1051/medsci/2020043

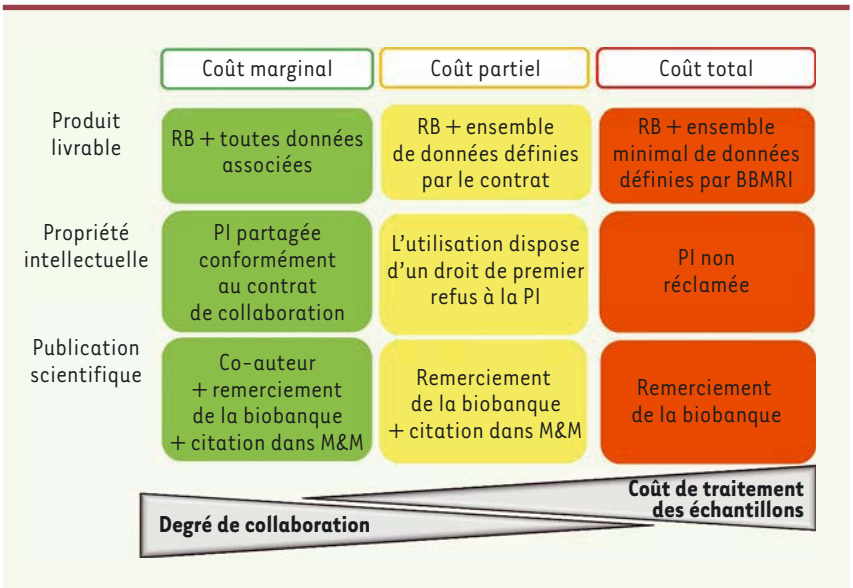


Figure 1. ***Les modèles de recouvrement des coûts en biobanques (selon Clément et al.*** [4]***).*** Dans le modèle de coût marginal, la biobanque possède un droit sur le brevet d'invention et bénéficie d'une reconnaissance scientifique ; dans ce cas, la collaboration est alors maximale (en vert). A l'opposé, dans le modèle de coût total, la biobanque ne bénéficie d'aucune reconnaissance scientifique en cas de découverte majeure (en rouge). En position intermédiaire, on trouve le modèle de coût partiel (en jaune). BBMRI : *biobanking and biomolecular resources research infrastructure* ; M&M : matériels et méthodes ; RB : ressources biologiques ; PI : propriété intellectuelle.

ché global des biobanques était estimée à 52,31 milliards de dollars américains (USD) (soit environ 47 milliards d'euros) en 2017, et devrait afficher une augmentation de 4,5 % d'ici à 2025 [2]. Dans ce contexte mondial, les biobanques, comme toutes les entreprises, doivent maîtriser leur stratégie économique car il y va de leur durabilité. Elles doivent analyser en priorité leur situation financière pour pouvoir ensuite actionner les leviers de la pérennité. Pour illustrer la « biobankonomics », nous allons présenter les différents coûts liés au fonctionnement d'une biobanque, puis ses revenus et ses financements de soutien, avant d'envisager la manière d'optimiser la visibilité scientifique.

Les coûts

Une biobanque est complexe, et son fonctionnement entraîne des frais considérables. La seule façon de contrôler les dépenses est de pouvoir quantifier les frais engagés pour la collection, le transport et la conservation des échantillons, l'extraction de produits dérivés de ces échantillons, et l'actualisation des données cliniques associées. Matériellement, l'infrastructure doit posséder un plateau technique et l'équipement nécessaire à la réception, la préparation et la conservation des échantillons biologiques dans les conditions optimales. Cela nécessite de disposer d'un parc de congélateurs à - 80 °C, et de conteneurs d'azote liquide qui maintiendront les échantillons à - 196 °C, de façon à garantir la qualité des acides nucléiques. Techniquement, il faut que les procédures de conservation et d'extraction puissent être réalisées en respectant des procédures normalisées. Cette technicité nécessite une équipe qualifiée, qui maîtrise les phases pré-analytiques et analytiques du traitement des échantillons. Les coûts de traitement incluent aussi la qualité des données associées à l'échantillon, c'est-à-dire issues du dossier médical actualisé avec le suivi thérapeutique et les dernières analyses de l'individu, mais doivent inclure également les nombreuses démarches-qualité nécessaires afin d'obtenir des certifications et des accréditations, démarche clé pour le développement des biobanques. Une comptabilité analytique permettrait de totaliser en temps réel l'ensemble des charges pour chaque produit livrable.

Considérant les coûts de recouvrement dans un partenariat public-privé, Clément *et al.* proposent d'adopter trois modèles qui diffèrent selon le degré de collaboration entre les partenaires *(Figure 1)*. Dans le modèle de coût marginal, la biobanque possède un droit sur le brevet d'invention et bénéficie d'une reconnaissance scientifique, permettant ainsi un degré de collaboration maximum pour un coût de traitement des échantillons minimum. En revanche, dans le modèle de coût total, la biobanque ne bénéficie d'aucune reconnaissance scientifique en cas de découverte majeure, et ne possède aucun brevet d'invention, alors que le coût de traitement des échantillons est maximum. Le modèle intermédiaire, ou coût partiel, allie une reconnaissance scientifique de la banque d'échantillons biologiques et un coût partiel du traitement des spécimens.

Des spécialistes en biobanques, notamment B. Clément et son équipe, ont mis en place un système d'estimation du coût du traitement des échantillons, ce qui a permis de modéliser le recouvrement des coûts d'une biobanque [3]. L'étude de Clément *et al.* prend en compte deux indicateurs : le groupe d'experts a identifié 46 tâches différentes (plus ou moins complexes) liées aux activités de biobanking, et a ensuite attribué à chaque tâche 1) un indicateur d'expertise (A : élevé ; B : moyen ; C : faible) et 2) un indicateur de complexité, qui reflète le temps ou la

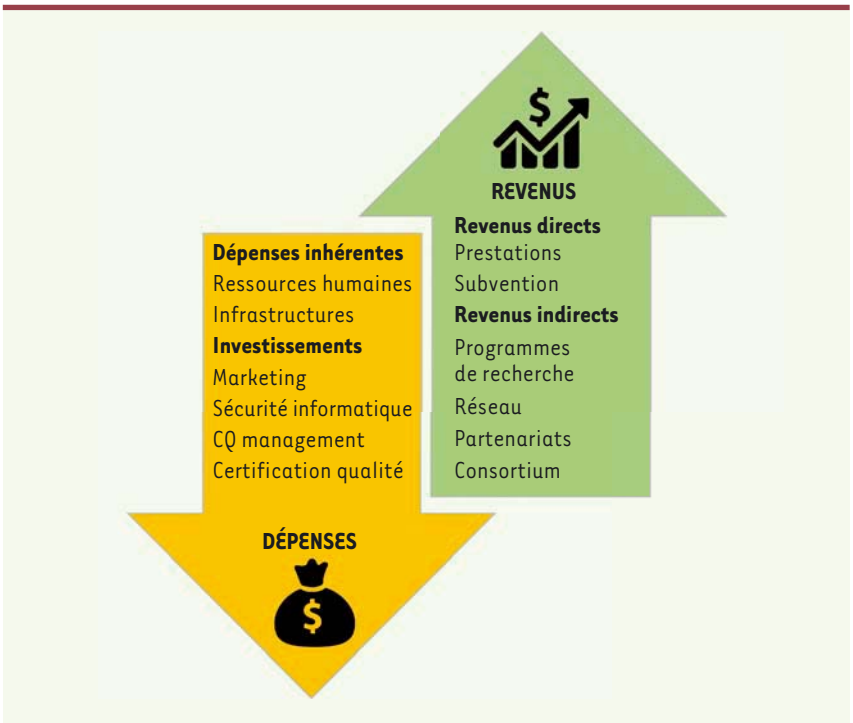


Figure 2. ***Les différentes sources de dépenses et de revenus des biobanques.*** Les dépenses comprennent les frais de personnel et d'équipement ainsi que les divers investissements en marketing, sécurité informatique, gestion du contrôle qualité (CQ) et certification de la qualité. Les recettes sont directes ou indirectes, c'est-à-dire provenant d'un projet collaboratif.

complexité du traitement de l'échantillon selon 3 niveaux (1 : < 1 heure/faible complexité ; 2 : 1 à 2 heures/complexité moyenne ; 3 : > 2 heures/complexité élevée). Les deux indicateurs sont ensuite multipliés afin de calculer le coût estimé pour le traitement de chaque échantillon.

Les financements et revenus

L'estimation du coût du traitement des échantillons et l'étude des modèles de recouvrement des coûts permettent de mettre en évidence la difficulté des biobanques à maintenir un équilibre financier *(Figure 2)*.

Les subventions collectées auprès d'institutions privées (multinationales pharmaceutiques et institutions de recherche notamment) ou publiques (subventions gouvernementales) contribuent à l'équilibre financier. Les résultats du questionnaire de l'étude de Clément *et al.* sur les biobanques en France et aux Pays-Bas ont révélé trois sources de financement principales : financement public (32 %), financement par des institutions de recherche (27 %), et financement par des subventions de recherche (25 %). Le recouvrement des coûts pour les échantillons biologiques ne représente que 1 % du budget [4].

Les biobanques peuvent fournir des prestations de services telles que la caractérisation ou le traitement d'échantillons biologiques. En effet, les biobanques recouvrent seulement une partie de leurs dépenses en facturant aux chercheurs l'accès aux échantillons biologiques. Il est donc primordial qu'elles bénéficient d'un soutien externe à court terme et à long terme afin d'assurer leur viabilité économique. Par conséquent, les biobanques doivent développer et diversifier leurs sources de revenus par différents moyens [5-6].

Comment optimiser la durabilité et la visibilité des biobanques ainsi que leurs revenus ?

Les programmes de recherche en collaboration avec des organismes de recherche privés ou publics représentent un facteur important de durabilité pour les biobanques, mais ils peuvent engendrer des dépenses supplémentaires. De plus, l'appartenance des biobanques à des réseaux ou des consortiums peut leur permettre d'enrichir leurs réseaux et de développer des partenariats, de type public/public, public/privé ou privé/privé, avec d'autres biobanques, mais aussi avec d'autres institutions telles que des entreprises biopharmaceutiques ou biomédicales.

Les partenariats permettent le recouvrement indirect des coûts lorsque la biobanque fournit des prestations de service (traitement d'échantillons de la biobanque en échange du droit d'accès à d'autres échantillons à coût marginal), ou encore au travers d'une citation de la biobanque dans les articles publiés (dans le cadre de projets ayant utilisé les échantillons fournis par elle), ce qui lui permet de se faire connaître et d'accroître sa notoriété.

Les stratégies de marketing et de communication permettent également d'accroître la visibilité des biobanques par la création d'un site internet et d'un catalogue virtuel. Par l'intermédiaire de ces outils, les biobanques expliquent aux donneurs effectifs ou potentiels la nécessité d'avoir accès à des échantillons biologiques dans la recherche médicale, et présentent l'éventail de leurs missions et des services proposés aux chercheurs. Enfin, les programmes de certification de qualité permettent d'acquérir la confiance des clients afin de les fidéliser, et de veiller à la réputation de la biobanque. La mise en œuvre d'un système de gestion de la qualité est donc primordiale.

En conclusion, il est très difficile pour une banque d'échantillons biologiques d'atteindre un point d'équilibre. Étant à but non lucratif, une biobanque doit

trouver un équilibre financier lui permettant de couvrir ses coûts sans réaliser de bénéfice sur le transfert d'échantillons biologiques. Cette complexité est due au fait que les bioéchantillons ne sont pas des produits commerciaux, ce qui rend le chiffrage d'un coût plus difficile. De même, les indicateurs de performance classiques ne peuvent pas être utilisés. Il est donc nécessaire de définir des indicateurs spécifiques, tels que le rapport stockage/déstockage des échantillons, véritable marqueur de l'activité de la biobanque, ou encore la notoriété de la biobanque dans le paysage scientifique, qui peut être évaluée en analysant sa contribution aux publications scientifiques. La « biobankonomics » permet donc une étude globale des coûts, et facilite la gestion d'une biobanque par la modélisation d'outils de gestion. ◊

***Biobankonomics*: the sustainability indicators of biobanks**

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. 10 ideas changing the world right now. *Time* (annual special issue) 2009, March 16.
2. Biobanks market size, share and trends analysis report by product (LIMS), by service (cold chain), by biospecimen type, by biobank type (virtual), by application, and segment forecasts, Sept. 2018.
3. Vaught J. Biobankonomics: Developing a sustainable business model approach for the formation of a human tissue biobank. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2011 ; 2011 : 24-31.
4. Clément B, Yuille M, Zaltoukal K, *et al*. Public biobanks: calculation and recovery of costs. *Sci Transl Med* 2014 ; 6 : 261fs45
5. Watson PH, Nussbeck SY, Carter C, *et al*. A framework for biobank sustainability. *Biopreserv Biobank* 2014 ; 12 : 60-8.
6. Doucet M, Yuille M, Georghiou L, Dagher G. Biobank sustainability: current status and future prospects. *J Biorepository Sci Appl Med* 2017 ; 5 : 1-7.
7. Ciaburri M, Napolitano M, Bravo E. Business planning in biobanking: how to Implement a tool for sustainability. *Biopreserv Biobank* 2017 ; 15 : 46-56.
8. Odeh H, Miranda L, Rao A, *et al*. The biobank economic modeling tool (BEMT): online financial planning to facilitate biobank sustainability. *Biopreserv Biobank* 2015 ; 13 : 421-9.

NOUVELLE

Étude du système de gestion de l'information (*biobank information management system*) pour les annotations clinico-biologiques des biobanques

Caroline Le Queau, Wendy Ann Phillips, Apoorva Srinivasan

MSc biobanks and complex data management,
Université Côte d'Azur, Centre hospitalier universitaire de Nice,
Hôpital Pasteur, Biobanque BB-0033-00025, Nice, France.
caroline.le-queau@etu.univ-cotedazur.fr
wendy-ann.phillips@etu.univ-cotedazur.fr
apoorva.srinivasan@etu.univ-cotedazur.fr
masterbiobank@univ-cotedazur.fr

Une partie des étudiants de ce master n'écrivant pas en français, mais étant très intéressés par cette volonté de *médecine/sciences* de « donner la parole à nos jeunes pousses », se sont proposés pour effectuer le même travail que leurs homologues francophones de ce même master.
Exceptionnellement, *m/s* leur a donné l'occasion d'effectuer cet exercice en anglais, tout en leur souhaitant un bon apprentissage de notre langue auprès de leurs enseignants et de leurs collègues étudiants.

› The biobank information management system (BIMS) is an essential tool that gathers the data of a laboratory information management system (LIMS), commonly used in laboratories to track samples and all other informatics systems involving information related to patients and samples (e.g., electronic medical report, freezer temperature monitoring systems, etc.). Biologists and clinicians are increasing their efforts to unravel the biological pathways that underlie human diseases. The use of omics analyses (e.g., genomics, transcriptomics, proteomics) has generated extremely large data sets. The analysis and integration of these data, as well as the constitution of database platforms, represent an ongoing challenge. This article aims to introduce the construction of BIMS in relation to a biobank workflow, the multiple solutions that currently exist on the market, as well as its importance in public and private research.

Constructing a BIMS

A laboratory information management system (LIMS) is a software allowing the whole management of samples workflow,

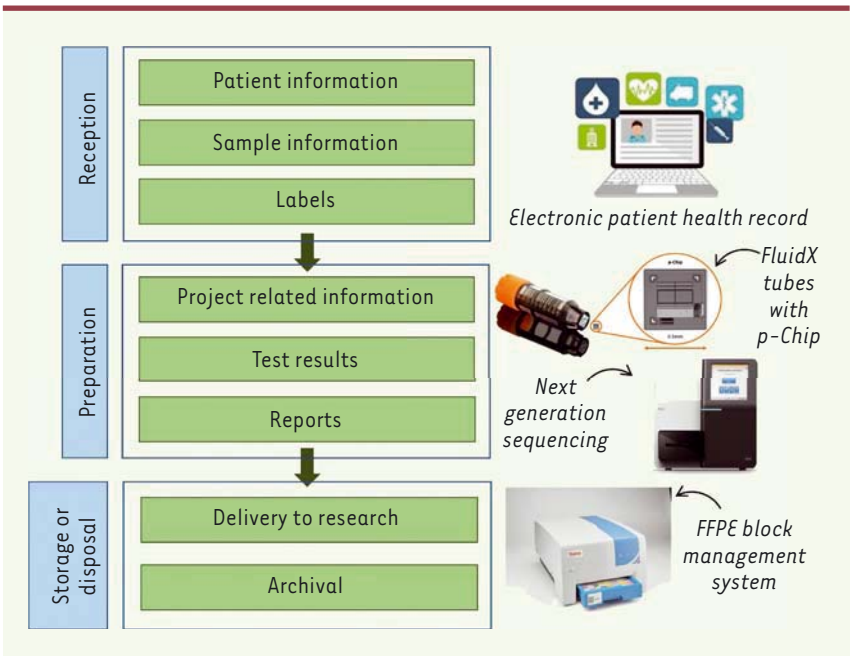


Figure 1. ***Representation of a typical biobanking data workflow with examples of associated technologies.*** In blue are the main steps related to sample flow, and in green the actions related to data. On the right are examples of devices that provide data about the sample. The biobank is keeping in its record information related to the samples for traceability, for example data delivered to research will remain in the biobank archives.

including their reception, preparation, storage and delivery (or the delivery of results of external tests performed on these samples) *(Figure 1)*. This type of software facilitates the standardization of tests and procedures, and provides accurate controls of processes [1].

By contrast to a LIMS, a BIMS integrates different pieces of information concerning both sample characteristics and clinical data related to the patients (including informed consent), as shown on *Figure 2*. Hospital information systems (HIS) and clinical database (CDB), which are sources of clinical data concerning the patients, are governed by strict regulations especially regarding anonymity [2]. These databases are either accessible from hospital-owned servers within the biobank or connected to the BIMS through specific informatics languages [3] in accordance with European general data protection regulation 2016/679 [4] and as recommended by the Health Level 7 international standards for transfer of data between software applications.

BIMS can also incorporate information from monitoring systems (MS), such as the freezer temperature or liquid nitrogen level in tanks. The quality management system (QMS) is often saved on separated software. However, preparation procedures or documents related to corrective actions in case of non-conformity can be available through the BIMS. Finally, it can integrate interoperability with test instruments, such as sequencing machines, in order to suppress the step of manually adding data to the software.

As BIMS store sensitive and confidential data, they are usually localised in local area networks (LAN), a computer network that interconnects computers within a restricted area (e.g., hospital or enterprise). Nevertheless, researchers can search sample availability, from a virtual catalogue on the internet (wide area network), according to predefined criteria. This catalogue can also gather information from different sites of a multisite biobank, for example in the case of UK Biobank.

The use of BIMS can be varied ; thus, they are usually sold with a certain number of licenses, i.e. access accounts. As the information can come from different entities (hospital, external or internal laboratories, biobank) it is crucial that the biobank controls the access to its BIMS. Limited access can be created so that a specific member of staff can only enter a specific information. For example, hospital staff can add barcodes and time of sampling, the clinician can add patients' data, and biobanking staff can manage the sample workflow. All requests regarding the access and use of the BIMS should be discussed prior to the development of biobanks.

Biological or clinical information collected and stored on a BIMS are varied, and the data format heterogeneous. They are linked together through data models that need to be thoroughly studied in order to avoid mistakes in analysis. Data registered from various sources and gathered manually increase the time of entry and the risk of error, whereas BIMS allows automatic integration, thus reducing potential mistakes.

Therefore, it leads to complexity in terms of software design and storage space. An efficient BIMS needs to be flexible enough to support from the smallest to the largest collection of samples, and to manage different stakeholders' accesses. Finally, the BIMS design has to take into account the permanent update of the stored data and the necessity for users to easily have access to these data.

The wide BIMS market

The growing market surrounding data management does not leave biobanking behind, as shown by the multiplication of BIMS solutions available. Companies[1] such as *LabVantage Solu-*

[1] La revue *médecine/sciences* (journal de l'Inserm) ne cite pas de noms de compagnies sauf cas très particulier où l'omission du nom nuit à la compréhension du texte. *médecine/sciences*, the journal of Inserm, does not refer to the name of private business companies, except when deleting the company name prevents the reader from a clear understanding of the manuscript.

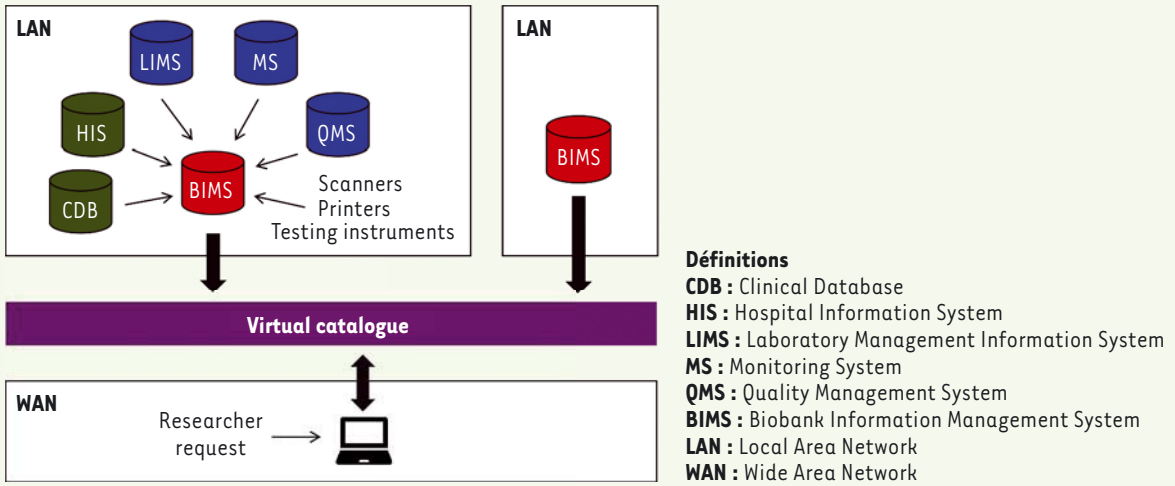


Figure 2. Representation of a BIMS. Various databases are integrated in the BIMS, to preserve the confidentiality of informations. The software is hosted in the LAN, a network that links computers within a restricted area. Information from the BIMS can be extracted and displayed in a virtual catalogue, available to researchers. This system allows multisite biobanks as the catalogue can be linked to more than one BIMS.

tions Inc., *Genohm*, *Brooks Life Sciences*, *Technidata*, *Modul-bio*, and *Thermo Fisher Scientific* all developed their own BIMS solution in adequacy with different customers' needs [5]. Variability exists in terms of possible interoperability, personalisation of modules, maintenance efficiency, etc. The cost includes software initial installation, maintenance and upgrade. It also depends on the number of sites, licenses and modules needed. Open source of made in-house software also exists and represents a cheaper alternative. However, this kind of approach requires an informatics competent staff that can modify the software source code.

The quality of a biobank service is assessed by both the number of valuable samples and the full chain of custody of these samples. Data quality is the core business of a biobank as samples have limited value in research without accurate and reliable data. Although a BIMS is not mandatory to obtain accreditation according to the biobank French norm NFS 96-900, it is a long-term investment that will facilitate the certification, the management of growing sample amount and the homogeneity of data.

This BIMS solution used to record laboratory and sample data in an electronic system thus helps to improve the robustness of quality systems and sustainability of biobanking structures.

How does a BIMS improve research?

BIMS is a highly recommended and valuable management system used by biobanks to improve and maintain the quality of research results.

Prior to clinical trials, clinical annotations such as phenotypic, genotypic, and environmental information gathered through BIMS can allow the determination of patient groups, e.g., analysis of patient's DNA sequences to determine different groups of patients in order to determine the right concentration of drug to treat each group [6]. Integration of the maximum of data related to the patient and the sample could help clinicians and researchers to discover new therapeutic targets, develop innovative strategies and drugs.

The data may originate from various research studies, small and large, where data formats and data collection methods vary significantly [6]. Managing data through BIMS provides a unique access, thus enhancing public availability of clinical and biological annotations (e.g., *UK biobank*).

Currently, hospitals produce a large amount of data incoming from daily care that is not exploited at the maximum capacity [7]. BIMS or data centres are a solution to gather data and use them for *in silico* studies, i.e., computer-based studies.

Big private pharmaceutical companies are interested in building their own biobank to support their medical research such as drug development or *in vitro* diagnostic tests [8].

Smaller companies can collaborate with public biobanks to have access to rare samples. Moreover, building a private collection is costly and not valuable if it only serves one purpose. Instead of building its own collection of formalin fixed paraffin embedded blocks, (FFPE blocks) from cancer patients, a pharmaceutical company can make a contract with a biobank to obtain slides and data from those patients. Thereby both stakeholders can share their expertise. During the different drug development stages, a lot of samples are required, processed and stored. A partnership with a biobank allows using their expertise in sample collection and already existing

storing facilities. Nevertheless, pharmaceutical companies aim to work with top quality biobanks, thus valorising quality, full data set, traceability, etc., all of which can be provided through BIMS.

Conclusion

BIMS softwares are complex to build and require knowledge and expertise in the fields of informatics and biobanking. Currently the main challenge is the lack of interoperability between existing LIMS and software used in healthcare. The future of medicine lies in the use of clinical annotations for *in silico* studies, i.e., studies performed using computer simulation. Creating a catalogue of massive data integrating online analysis will allow an easier access to shared data for all researchers. ◊

Practical use of biobank information management system (BIMS) for clinical-biological annotations in biobanks

LIENS D'INTÉRÊT

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

REFERENCES

1. Malm J, Fehniger TE, Danmyr P, *et al.* Developments in biobanking workflow standardization providing sample integrity and stability. *J Proteomics* 2013 ; 95 : 38-45.
2. Loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 modifiée relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés. Article 32.
3. Späth MB, Grimson J. Applying the archetype approach to the database of a biobank information management system. *Int J Med Inform* 2011 ; 80 : 205-26.
4. Regulation (EU) 2016/679 of the European Parliament and of the Council of 27 April 2016 on the protection of natural persons with regard to the processing of personal data and on the free movement of such data, and repealing Directive 95/46/EC (General Data Protection Regulation).
5. Orchard-Webb D. 10 Top Laboratory Information Management Systems (LIMS) for biobanking. *Biobanking.com* 2018.
6. Olund G, Lindqvist P, Litton JE. BIMS: An information management system for biobanking in the 21st century. *IBM Systems Journal* 2007 ; 46 : 171-82.
7. Cournau C. L'hôpital soigne ses données médicales. *Sciences et Avenir* 2018 ; 861 : 70-3.
8. Begley CG, Ellis LM. Drug development: Raise standards for preclinical cancer research. *Nature* 2012 ; 483 : 531-3.

Abonnez-vous à médecine/sciences

Bulletin d'abonnement page 294 dans ce numéro de *m/s*

Retrouvez toutes les Actualités de la Myologie sur les sites de :

la **Société Française de Myologie**
www.sfmyologie.org

la filière de santé neuromusculaire **FILNEMUS**
www.filnemus.fr

médecine/sciences 2020 ; 36 : 289-91

Chroniques génomiques

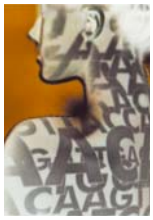
Scores polygéniques : vers l'embryon à la carte ?

Bertrand Jordan

Une annonce surprenante

En octobre 2019, lors du 75e congrès de la Société américaine de médecine reproductive, une *start-up* appelée *Genomic Prediction* et basée dans le New Jersey a annoncé la commercialisation d'un test génétique baptisé *Life View* et destiné à permettre le choix du « meilleur » embryon dans le cadre d'une fécondation *in vitro* et d'un diagnostic préimplantatoire *(Figure 1)*. L'entreprise affirme pouvoir évaluer le risque (génétique) pour onze affections allant du diabète de type 1 à l'hypertension en passant par le cancer du sein ou de la prostate, selon le sexe. Ce serait alors aux parents de choisir, parmi la demi-douzaine d'embryons viables obtenus après une fécondation *in vitro,* celui qu'ils souhaitent implanter. Notons *(Figure 1)* que le test est aussi censé évaluer l'intelligence et la taille à l'âge adulte – mais ne rapporte qu'une estimation du risque (génétique) de déficience mentale ou de nanisme. Comme indiqué dans un récent article de la *MIT Technology Review* [1], la direction de la firme espère que même des couples fertiles auront recours à la fécondation *in vitro* afin de pouvoir sélectionner le meilleur enfant. Ce « choix de l'enfant parfait » qui figure depuis des lustres parmi les principaux problèmes potentiels de la génétique médicale et de la « procréatique » semble donc aujourd'hui se concrétiser. Sur le plan pratique, le test est pratiqué à partir de quelques cellules prélevées sur l'embryon, et repose sur un profil génétique large effectué *via* un *microarray* (puce à ADN) suivi du calcul de scores polygéniques [2] (➜) pour chacune des affections à évaluer. Le coût annoncé est de 1 000 dollars plus 400 dollars par embryon testé. Il s'agit donc d'une extension du diagnostic préimplantatoire (DPI), déjà pratiqué en France pour éviter la naissance d'enfants atteints d'une maladie « d'une particulière gravité » selon les termes de la loi[1]. Les affirmations de *Genomic Prediction* sont-elles fondées ? En d'autres termes, les scores polygéniques que pratique cette firme sont-ils réellement prédictifs ? Les données récentes vont plutôt dans ce sens, nous allons les résumer.

(➜) Voir la Chronique génomique de B. Jordan, *m/s* n° 12, décembre 2018, page 1116



UMR 7268 ADÉS, Aix-Marseille, Université /EFS/CNRS ;
CoReBio PACA, case 901,
Parc scientifique de Luminy,
13288 Marseille Cedex 09,
France.
brjordan@orange.fr

Scores polygéniques : valides, même en présence de mutations « monogéniques »

Rappelons d'abord ce qu'est un score polygénique (parfois appelé GPS, *genome-wide polygenic score*), déjà évoqué dans ces chroniques [2] : il est calculé en faisant la somme des « allèles de risque » détectés dans le profil génétique de la personne, chacun des termes étant affecté d'un coefficient qui reflète la force de son association avec la maladie et donc l'intensité du risque qui lui est associé. L'établissement de la formule du GPS pour une affection donnée repose sur l'analyse des profils génétiques au sein d'une grande population comportant individus affectés et témoins ; il comprend le choix des locus (des SNP, *single nucleotide polymorphism*) qui en feront partie et l'ajustement des coefficients qui leur seront affectés. En pratique, le calcul des GPS est fondé sur l'analyse de grandes banques de données comme la *UK Biobank* [3] qui répertorient les profils génétiques et les données phénotypiques de centaines de milliers de personnes. Une fois la formule du score polygénique établie, on peut l'appliquer au profil de SNP obtenu pour une personne donnée afin d'estimer son risque génétique pour l'affection en cause – pour autant qu'elle appartienne à une population similaire à celle qui a servi à établir la formule.

[1] Notons que le choix du sexe par DPI est interdit chez nous mais admis dans de nombreux pays notamment aux États-Unis.

https://doi.org/10.1051/medsci/2020028

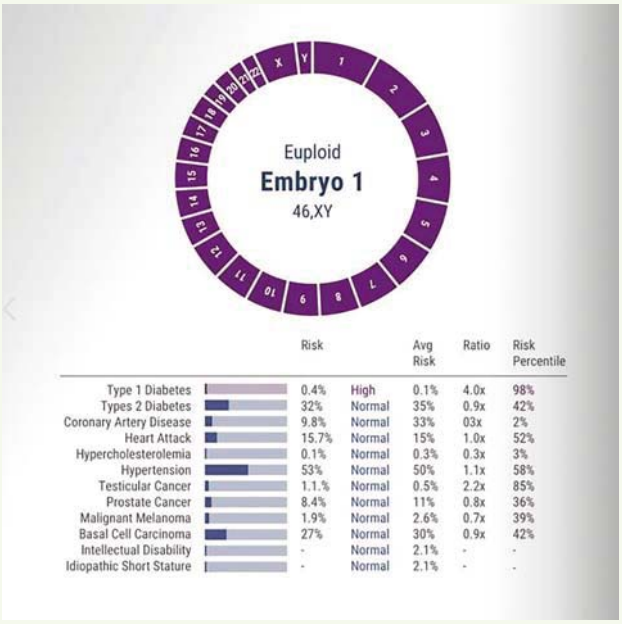


Figure 1. ***Exemple de résultats fournis par*** **Genomic Prediction.** Pour chaque affection, on trouve, de gauche à droite, le risque absolu estimé par l'entreprise (sous forme de graphique, de pourcentage et d'évaluation qualitative), suivi du risque moyen et du risque relatif et enfin de sa position sur la courbe de Gauss des risques. Par exemple l'embryon analysé ici présente un risque relatif évalué à 4 pour le diabète de type I, supérieur à celui de 98 % des personnes, risque qui reste faible dans l'absolu (0,4 %) en raison de la rareté de l'affection (risque moyen 0,1 %) (figure reproduite à partir du site Internet de l'entreprise https://genomicprediction.com/epgt/).

L'importance de ces scores polygéniques est qu'ils permettent une évaluation du risque pour des affections complexes dont la composante génétique implique de nombreux gènes – ce qui est le cas de la plupart des maladies fréquentes [4]. Dès 2018, il était démontré que ces scores pouvaient détecter un risque élevé (trois fois la moyenne) pour une fraction significative (quelques pour cent) de la population, et donc jouer un rôle aussi important du point de vue clinique que des mutations monogéniques très rares [2, 5]. Plus récemment, les mêmes auteurs ont étudié l'influence du « fond » polygénique sur l'effet de mutations monogéniques, et montré que cette influence est importante [6]. Pour le cancer du sein par exemple, une personne ne portant pas la mutation BRCA1 (*breast cancer 1*) ou 2 peut, en fonction du score polygénique, avoir un risque aussi élevé qu'une porteuse de mutation dont le score est faible *(Figure 2)*. Ces résultats soulignent l'importance clinique des GPS et donnent aussi un fondement concret à la notion jusqu'ici bien vague de « pénétrance ».

Notons l'importance pratique de la correction apportée par la prise en considération du score polygénique : l'intérêt de la mastectomie préventive, fréquemment pratiquée aux États-Unis pour les porteuses de mutations BRCA1 ou 2 [11] (➜) devient assez douteux pour celles dont le score polygénique est proche de zéro…

(➜) Voir la Synthèse de O. Cohen-Haguenauer, *m/s* n° 4, avril 2019, page 332

Quelques bémols…

La validité des évaluations de risque génétique *via* les scores polygéniques a fait l'objet de critiques [7] : certaines des premières études s'appuyaient sur un effectif insuffisant, leur traitement statistique manquait de rigueur, notamment en ne testant pas la formule obtenue sur un échantillon totalement indépendant de celui utilisé pour l'établir. Un article publié dans *Cell* [8] a paru démontrer des performances de prédiction très insuffisantes – mais il s'intéressait à deux caractères extrêmement polygéniques, la taille à l'âge adulte (plus de 1 000 gènes repérés !) et le quotient intellectuel (QI). De plus, la démonstration faisait un large appel aux simulations, toujours moins convaincantes que des données réelles. Une publication émanant de *Genomic Prediction* et de ses collaborateurs académiques [9] est, comme on pouvait s'y attendre, nettement plus positive, mais semble néanmoins solide. Elle s'intéresse à l'évaluation du risque de maladie pour 16 affections parmi lesquelles le diabète, le cancer du sein et de la prostate, et montre des valeurs prédictives assez convaincantes. Au total, on peut donc conclure [4] que les scores polygéniques présentent déjà, dans de nombreux cas, une validité prédictive notable et une réelle utilité clinique, et que l'étude de plus en plus fine (séquençage de l'exome, séquençage intégral) de populations de plus en plus nombreuses et diversifiées ne pourra qu'améliorer leur fiabilité et augmenter leur intérêt médical.

Un maniement délicat

On peut donc s'attendre à ce que les propositions de *Genomic Prediction* suscitent l'intérêt de nombreux couples, surtout dans les pays comme les États-Unis où une forme de diagnostic préimplantatoire plus large que celui pratiqué en France est déjà courante : pour un tiers des fécondations *in vitro*, la recherche d'aneuploïdies est pratiquée sur les embryons avant implantation, et la détermination du sexe est fréquente [1]. En ce qui concerne la validité de ces analyses, il faudra veiller à la cohérence des populations, alors qu'actuellement la grande majorité des banques de données concernent majoritairement des individus d'origine européenne : un GPS établi grâce à ces données ne sera pas nécessairement valide pour les embryons d'un couple asiatique ou africain. Ne pas oublier non plus qu'il s'agit d'évaluations de risque et non de prédictions (comme l'indique d'ailleurs l'entreprise sur son site), et que l'intervalle de confiance peut être assez large (cf. la *Figure 2*), alors que la précision des nombres (cf. la *Figure 1*) peut faire

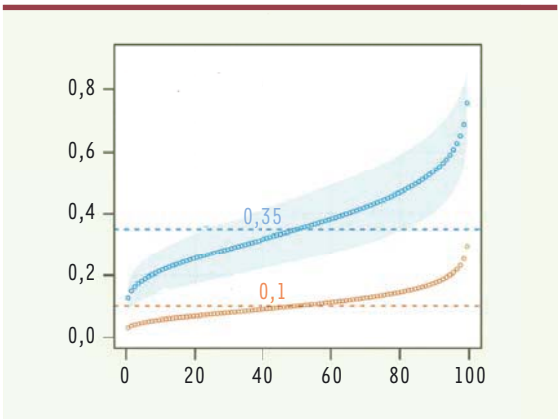


Figure 2. ***Abscisse : score polygénique ; ordonnée : probabilité de cancer du sein avant 75 ans.*** En bleu : porteuses de mutations BRCA1 ou 2, en bistre : non porteuses. La valeur moyenne du risque est indiquée par les lignes pointillées. L'intervalle de confiance (à 95 %) est indiqué par la zone de couleur, assez large pour les porteuses (faible effectif), très étroite pour les témoins. La valeur relativement faible du risque pour les porteuses s'explique par les biais d'enrôlement et par la coupure des données à 75 ans, de nombreux cancers survenant après cet âge (extrait partiel et modifié de la figure 2 de [6]).

illusion. Le coût de la procédure, enfin, n'est pas négligeable : à celui de la fécondation *in vitro*, il faudra ajouter quelques milliers de dollars.

Au-delà de ces considérations plutôt techniques, cette « recherche de l'enfant parfait » pose évidemment de nombreuses questions éthiques et sociétales. Comment réagiront les parents si l'enfant ne correspond pas à la prévision, ce qui est très possible puisque cette dernière est de nature statistique ? Est-il vraiment admissible de vouloir prédéfinir ainsi un futur enfant ? Ne se lance-t-on pas alors sur la pente glissante d'une prédéfinition de plus en plus précise, rendue possible par l'accumulation des informations et la construction de nouveaux scores polygéniques ? Et ce choix du « meilleur » embryon ne conduit-t-il pas logiquement à l'« amélioration » de ce dernier, comme l'a récemment tenté le Chinois Jiankui He [10] ? (➜)

(➜) Voir la Chronique génomique de B. Jordan, *m/s* n° 3, mars 2019, page 266

Ces questions, encore théoriques il y a quelques années, commencent maintenant à se poser de manière très concrète, et les réponses ne devraient certainement pas être confiées à la seule loi du marché. ◊

SUMMARY

Polygenic scores: towards designer babies?

A new company is offering extensive genetic analysis of embryos during an *in vitro* fertilisation procedure, allowing the derivation of polygenic scores for several diseases and embryo choice based on these results. Polygenic scores, if properly implemented, can indeed have substantial predictive value, and the possibility of embryo choice based on these data has become real, raising a number of practical and ethical problems. ◊

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Regalado A. The world's first Gattaca baby tests are finally here. *MIT Tech review*, Nov 8, 2019. https://www.technologyreview.com/s/614690/polygenic-score-ivf-embryo-dna-tests-genomic-prediction-gattaca/
2. Jordan B. Balayage du génome et repérage des personnes à risque : des GWAS aux GPS. *Med Sci (Paris)* 2018 ; 34 : 1116-9
3. Bycroft C, Freeman C, Petkova D, *et al.* The UK biobank resource with deep phenotyping and genomic data. *Nature* 2018 ; 562 : 203-9.
4. Torkamani A, Wineinger NE, Topol EJ. The personal and clinical utility of polygenic risk scores. *Nat Rev Genet* 2018 ; 19 : 581-90.
5. Khera AV, Chaffin M, Aragam KG, *et al.* Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations. *Nat Genet* 2018 ; 50 : 1219-24.
6. Fahed AC, Wang M, Homburger JR, *et al.* Polygenic background modifies penetrance of monogenic variants conferring risk for coronary artery disease, breast cancer, or colorectal cancer. *medRxiv* preprint first posted online Nov. 29, 2019 ; doi: http://dx.doi.org/10.1101/19013086
7. Wray NR, Yang J, Hayes BJ, *et al.* Pitfalls of predicting complex traits from SNPs. *Nat Rev Genet* 2013 ; 14 : 507-15.
8. Karavani E, Zuk O, Zeevi D, *et al.* Screening human embryos for polygenic traits has limited utility. *Cell* 2019 ; 179 : 1424-35.
9. Lello L, Raben TG, Yong SY, *et al.* Genomic prediction of 16 complex disease risks including heart attack, diabetes, breast and prostate cancer. *Sci Rep* 2019 ; 9 : 15286.
10. Jordan B. Bébés CRISPR : anatomie d'une transgression. *Med Sci (Paris)* 2019 ; 35 : 266-70.
11. Cohen-Haguenauer O. Prédisposition héréditaire au cancer du sein (2). Risques et prise en charge. *Med Sci (Paris)* 2019 ; 35 : 332-45.

TIRÉS À PART

B. Jordan

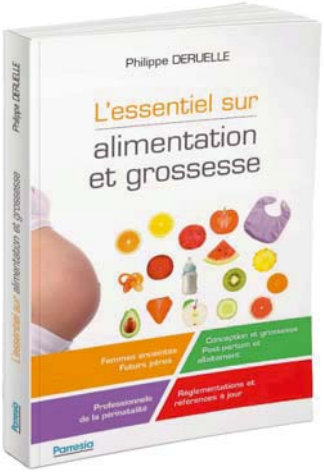
Tarifs d'abonnement m/s - 2020

Abonnez-vous à *médecine/sciences*

> Grâce à *m/s*, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement page 294 dans ce numéro de *m/s*

Nouveauté à paraître le 19 mars 2020



Éditeur : Parresia
Auteur : Philippe DERUELLE
Nombre de pages : 240 pages
Format : 14 x 21 cm
Reliure : Dos carré collé
Prix : 19,90 €
ISBN : 978-2-4904-8119-4
En librairie le 19/03/2020

L'essentiel sur alimentation et grossesse

Le bien-être et la santé de la femme enceinte passent indiscutablement par son alimentation. Et alors que la grossesse modifie complètement le rapport à l'alimentation, se nourrir devient tout un enjeu.

- Comment alterner les plaisirs et les plats ?
- Quel impact l'alimentation a sur la croissance et le développement du futur bébé ?
- Comment éviter de perdre ou prendre du poids ?
- Que faut-il absolument éviter ?
- Comment rester sereine ?

Bien s'alimenter est chose aisée lorsqu'on est bien informé. L'auteur propose des explications détaillées et délivre des conseils aux futurs parents, mais avant tout aux professionnels de santé qui les accompagnent.

Cliquez ici pour feuilleter quelques pages du livre

Des conseils pour une alimentation sereine
23 recettes originales et adaptées
Des fiches récapitulatives « Les 10 notions clés »
Une foire aux questions les plus fréquentes

Les auteurs

Philippe Deruelle est chef du pôle de gynécologie obstétrique au CHU de Strasbourg et secrétaire général du Collège national des gynécologues et obstétriciens français. Il orchestre de nombreuses conférences et groupes de travail autour des disciplines gynécologique et obstétricale. Il accompagne les femmes enceintes et les aide à adopter des bonnes pratiques, pendant cette période. Il a rédigé ce livre en collaboration avec des personnes expertes dans leur domaine : **Emmanuelle Couturier** diététicienne-nutritionniste et **Sophie Lelorain**, Maître de conférences en psychologie de la santé à l'Université de Lille. Les recettes de ce livre ont été spécialement élaborées par **Marion Lamy**, diététicienne-nutritionniste (pour Datameal), qui s'appuie sur les recommandations de Philippe Deruelle.

Attention ! Petit bijou

Préface du Professeur Israël Nisand
Président du Collège national des gynécologues et obstétriciens français
« Attention, voici un livre remarquable, un petit bijou. Il dit l'essentiel, en peu de mots et avec méthode. [...] Assurément, une lecture incontournable pour les femmes mais aussi pour les professionnels de la naissance qui disposeront d'une remarquable synthèse sur le sujet de l'alimentation pendant la grossesse. »

Parresia Contact : Claire JOSSERON - claire.josseron@parresia.fr - 01 49 85 60 48

m/s
médecine/sciences

/ Lieu privilégié d'écriture pour des chercheurs et cliniciens-chercheurs reconnus au plan international..., mais aussi pour les jeunes scientifiques et médecins en formation.

/ Éditoriaux, Synthèses, Nouvelles et Dossiers techniques : une information scientifique et médicale intelligible, précise et mise en perspective.

/ Des analyses et débats sur l'Histoire de la médecine et de la biologie, un regard critique sur les retombées diagnostiques et thérapeutiques des dernières avancées et leurs dimensions éthiques dans les Forums, Chroniques et Perspective/Horizons.

/ Un panorama clair et concis de l'actualité scientifique : des schémas et tableaux synthétiques et lisibles, des données chiffrées, une bibliographie utile, afin qu'aucun fait biologique et médical ne vous échappe.

*médecine/sciences est indexé dans **PubMed/Medline**, Current Contents, série Life Sciences, EMBASE/Excerpta Medica PASCAL CABS BIOSIS*

Avec *m/s*, vivez en direct les progrès et débats de la biologie et de la médecine

CHAQUE MOIS / AVEC LES ARTICLES DE RÉFÉRENCE DE *M/S*

CHAQUE JOUR / SUR WWW.MEDECINESCIENCES.ORG

Abonnez-vous sur

www.medecinesciences.org

m/s vous fait vivre en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

S'abonner, c'est profiter de nombreux avantages

La revue offre à ses lecteurs une grande diversité de textes sur les avancées de la recherche biologique et médicale, nationale et internationale. Elle se compose :

- d'une partie Magazine, reflet de l'actualité scientifique,
- de Synthèses, articles de fond dressant l'état des lieux sur une question scientifique, rédigées par des auteurs spécialistes du domaine,
- d'un Forum accueillant des textes variés d'histoire des sciences, de réflexion sur des questions de société, de sciences sociales et de santé publique, des faits et chiffres, ou des réactions à des articles publiés, tous rédigés avec une grande liberté d'expression,
- d'analyses critiques et de comptes rendus d'ouvrages.

Plus d'infos sur www.medecinesciences.org

OUI Je m'abonne à *m/s*

Nom - Prénom : .....

Institution : .....

Adresse : .....

CP ..... Localité : ..... Pays : .....

Tél. : ..... E-mail (obligatoire) : .....

PRIX TVA 2,1%	Institutions		Individuels		Étudiants*		Enseignants*	
	P + E	E	P + E	E	P + E	E	P + E	E
France	❍ 591 € HT 594,22 € TTC	Nous contacter	❍ 250 € TTC	❍ 148 € TTC	❍ 133 € TTC	❍ 88 € TTC	❍ 165 € TTC	❍ 117 € TTC
Reste de l'U.E.	❍ 722 € HT 725,93 € TTC		❍ 339 € TTC		❍ 187 € TTC		❍ 284 € TTC	
Reste du Monde	❍ 748 €		❍ 339 €	❍ 146 €	❍ 211 €	❍ 85 €	❍ 306 €	❍ 116 €

* joindre un justificatif

P + E : Papier et Électronique / E : Électronique seule

Paiement ❒ Envoyez-moi une facture proforma

❒ Chèque joint *(à l'ordre d'EDP Sciences)*

❒ Carte de crédit : ❒ Visa ❒ Eurocard ❒ American Express

N° de carte |__|__|__|__| |__|__|__|__| |__|__|__|__| |__|__|__|__| Date de validité |__|__| / |__|__| Code crypto |__|__|__|

Date : ..... /..... /.....

Signature :

une publication du groupe edp sciences

À retourner à : **EDP Sciences - Service abonnement**
17, avenue du Hoggar - P.A. de Courtaboeuf - 91944 Les Ulis Cedex A, France
Tél. : +33 (0)1 69 18 75 75 - Fax : +33 (0)1 69 86 07 65 -
subscribers@edpsciences.org

Appel à candidatures
PRIX RUBAN ROSE 2020

17e édition

ASSOCIATION “LE CANCER DU SEIN, PARLONS-EN !”

Vos **travaux de recherche**, vos **innovations**, vos **progrès**

portent sur le cancer du sein

L’association **Le Cancer du Sein, Parlons-en !**

soutient la lutte contre le cancer du sein

avec

un **Grand Prix Ruban Rose de la Recherche** de 170 000 euros

trois **Prix Ruban Rose Avenir** de 110 000 euros chacun

deux **Prix Ruban Rose Qualité de Vie** de 70 000 euros chacun

Candidatez en déposant votre dossier entre le 16 mars et le 10 mai 2020
Retrouvez tous les renseignements sur cancerdusein.org

JNI

21es Journées Nationales d'Infectiologie

Poitiers

et la région Nouvelle Aquitaine

Palais des Congrès du Futuroscope

du mercredi 10 juin 2020
au vendredi 12 juin 2020

Journée Nationale de Formation
des Paramédicaux en Infectiologie
jeudi 11 juin 2020

Présidente du Congrès
France CAZENAVE-ROBLOT

Présidente du Comité Régional d'Organisation
Blandine RAMMAERT

Comité Régional d'Organisation

Guillaume BÉRAUD
Christophe BURUCOA
Mélanie CATROUX
France CAZENAVE-ROBLOT
William COUET
Antoine ELSENDOORN
Magali GARCIA
Gwenaël LE MOAL
Nicolas LEVÊQUE
Sandrine MARCHAND
Marc PACCALIN
Thierry PASDELOUP
Maxime PICHON
Xavier POUGET-ABADIE
Blandine RAMMAERT
Agnés RICHÉ
Marie-Hélène RODIER
Simon SUNDER

Présidente du Conseil Scientifique National
France CAZENAVE-ROBLOT

Vice-présidente du Conseil Scientifique National
Odile LAUNAY

Conseil Scientifique National

Fabrice BRUNEEL
Gaud CATHO
Vincent CATTOIR
France CAZENAVE-ROBLOT
Didier CHE
Tristan FERRY
Bruno HOEN
Odile LAUNAY
Olivier LESENS
Gilles PIALOUX
Christian RABAUD
Christophe RAPP
Albert SOTTO
Pierre TATTEVIN

www.infectiologie.com

Soumission des résumés en ligne :
du lundi 18 novembre 2019
au dimanche 16 février 2020

Ouverture des inscriptions en ligne :
lundi 6 janvier 2020

15e Journée des Référents en Antibiothérapie
infectiologie.com
mercredi 10 juin 2020
POITIERS Hôtel PLAZA

Renseignements JNI et JRA
Alinéa Plus - 8 rue Froidevaux - 75014 Paris
contact-jni@alineaplus.fr
referents@alineaplus.fr

C0173 - Alinéa Plus - 21/02/2020