

Conséquences physiopathologiques des polymorphismes silencieux prédisposant aux maladies inflammatoires chroniques et au cancer

Avant-Propos

De mon doctorat à aujourd'hui, j'ai eu pour objectifs d'appréhender les mécanismes épigénétiques (Histones, microARN) et leur régulation lors de pathologies humaines inflammatoires ou tumorales. Au cours de ma thèse (Pr. Hofman – INSERM EPI-0215 – *MENRT/Monitorat, Ligue contre le Cancer, 2000-2004*), j'ai montré que **différents pathogènes (*E. coli*, *H. pylori*) détournent les fonctions des cellules épithéliales** à leur profit (Brest *et al.*, 2004a, Brest *et al.*, 2003a, Brest *et al.*, 2003b, Brest *et al.*, 2006, Brest *et al.*, 2003c, Brest *et al.*, 2004b, P. Hofman *et al.*, 2000, Hofman *et al.*, 2004, V. Hofman *et al.*, 2000, Hofman *et al.*, 2001, Hofman *et al.*, 2007, Selva *et al.*, 2007).

Ensuite, j'ai choisi d'effectuer un stage post-doctoral au sein du laboratoire de recherche translationnelle du Pr. Svanborg au BioMedical Center, Lund, Suède (*American Cancer Society, Gunnar Nilsson Cancer fondation, FRM, 2004- 2007*). J'ai montré que les inhibiteurs des histones désacétylases (HDACi) potentialisent l'effet d'un nouvel agent anticancéreux dénommé HAMLET, en déclenchant la mort massive des cellules tumorales par apoptose et autophagie (Aits *et al.*, 2009, Brest *et al.*, 2007, Hallgren *et al.*, 2008). Ces résultats m'ont permis de proposer de nouvelles applications thérapeutiques contre le cancer (brevet international 2006, Inventeur principal, déposé par NatImmune, DK).

De retour en France, j'ai rejoint en 2007 l'unité ERI21/CRB–Tumorotheque de Nice dirigée par le Pr. Hofman où j'ai mis en évidence que **l'effet antitumoral des HDACi est dépendant d'une signature de miARN létaux** exprimés **spécifiquement** dans les cellules cancéreuses (*Bourse INCa Fev 2008-Mai 2010, 2 Articles en révision, Brevet européen 2009*).

Mon projet de Recherche de chercheur statutaire intitulé « Conséquences physiopathologiques des polymorphismes silencieux prédisposant aux maladies inflammatoires chroniques et au cancer » s'inscrit dans la continuité de ma thèse et de mes stages postdoctoraux. Il a pour but d'approfondir l'étiopathogénie multifactorielle complexe de ces maladies (*P. Brest et al, Current Molecular Medicine, 2010*). Classiquement, l'importance de ces mutations synonymes qui sont fréquentes et à risques pour de nombreuses pathologies est minorée car elles n'affectent pas la séquence protéique.

Au cours de ces dernières années des efforts considérables ont été réalisés dans le but de comprendre l'implication de la génétique dans le développement de pathologies humaines fréquentes tels que les cancers, le diabète, l'obésité etc. Des études récentes ont mis en évidence un certain nombre de polymorphismes synonymes (SNPs) prédisposant pour ces pathologies multifactorielles. Dernièrement, nous avons été les premiers à démontrer un nouveau mécanisme de régulation impliquant à la fois un polymorphisme synonyme mais

aussi les riborégulateurs que sont les microARNs. Le but de ce projet sera de généraliser ce concept à d'autres polymorphismes synonymes à risque, tel que celui de TERT dans le cancer du poumon, afin de découvrir de nouveaux biomarqueurs originaux associés à ces pathologies.

Mes premiers travaux démontrent que **ce polymorphisme, en perturbant la séquence nucléotidique et ainsi la fixation d'un miARN, est responsable d'une perte de régulation d'IRGM**. Ceci entraîne des réponses autophagiques et inflammatoires inadaptées, suite à une infection par des pathogènes ou lors de stress inflammatoires dans l'intestin (*P. Brest et al, Nature Genetics, 2011 ; P. Brest et al, Autophagy, 2011*). **Ces résultats nous amènent à réviser de façon très significative notre vision des conséquences des mutations synonymes dans les mécanismes physiopathologiques.**

A la suite de ces résultats, mon projet de recherche s'oriente maintenant sur l'analyse des conséquences moléculaires et cellulaires des polymorphismes synonymes du gène de TERT (telomerase reverse transcriptase) prédisposant pour de nombreux cancers (prostate, poumon, mélanome,...)

I. ACTIVITE ANTERIEURE

Réponses inflammatoires des cellules épithéliales intestinales induites par des pathogènes (Thèse d'Université, directeur Pr. Hofman, 1999 – 2004)

Les MICI sont des maladies d'étiopathogénie complexe. Elles sont toutefois toutes caractérisées par un *substratum* histopathologique commun : une forte inflammation caractérisée par la **migration transépithéliale des polynucléaires neutrophiles (PNN)**. A l'origine de cette inflammation, l'une des hypothèses couramment avancée implique un dérèglement de la flore intestinale par des **bactéries pathogènes ou opportunistes retrouvées chez les patients** (*E. coli* Adhérentes invasives et *Mycobacterium paratuberculosis avium*) (Behr *et al.*, 2008, Darfeuille-Michaud, 2002).

Au cours de ma thèse, j'ai montré

- 1. Que les cellules épithéliales lors d'infections bactériennes jouent un rôle capital dans l'activation d'une réponse inflammatoire « explosive » (cytokines, recrutement de neutrophiles) et dans la régénération tissulaire (Cesaro et al., 2009, Selva et al., 2007);***
- 2. Comment certains pathogènes pervertissent les fonctions cellulaires de l'hôte à leur propre profit (Brest et al., 2004a, Brest et al., 2003a, Brest et al., 2003b, Brest et al., 2006, Brest et al., 2003c, Brest et al., 2004b, P. Hofman et al., 2000, Hofman et al., 2004, V. Hofman et al., 2000, Hofman et al., 2001, Hofman et al., 2007).***

Ceci pourrait donc participer à un auto-entretien d'un environnement propice aux infections, avec maintien d'une réponse inflammatoire et de lésions épithéliales exacerbées retrouvées chez les patients atteints de MICI.

Nouvelle stratégie anti-tumorale combinant les Inhibiteurs des HDAC et HAMLET (Stage postdoctoral, Suède, directeur Pr. Svanborg, 2004 – 2007)

Pour ce stage postdoctoral, j'ai choisi de rejoindre le laboratoire du Pr. Svanborg, équipe pilote dans le développement de nouvelles stratégies contre le cancer, qui travaille en relation étroite avec des compagnies pharmaceutiques. Ce laboratoire a développé HAMLET (Human Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells), un agent anticancéreux puissant (essais cliniques de phase 1)(Fischer *et al.*, 2004, Gustafsson *et al.*, 2004, Mossberg *et al.*, 2007).

J'ai développé une thématique propre visant à améliorer l'effet antitumoral d'HAMLET en le combinant avec des inhibiteurs d'histones désacétylases (HDACi). L'intérêt anti-tumoral des HDACi s'illustre par leur capacité à augmenter l'acétylation des histones et ainsi activer/réprimer des gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation, la sénescence et l'apoptose cellulaires. Leur effet drastique aussi bien *in vitro* que dans des modèles animaux a rapidement conduit à tester leur effet clinique sur différents types de tumeurs solides et hématologiques (phase III). Ainsi, mon objectif pour augmenter l'efficacité tout en réduisant la toxicité de ces chimiothérapies, a été de développer de nouvelles stratégies alliant les avantages d'administration topique (HAMLET) et systémique (HDACi) de ces deux molécules.

Mes travaux ont permis de montrer que l'effet génotoxique d'HAMLET sur les cellules cancéreuses était potentialisé par l'ouverture de la chromatine et la réexpression de facteurs anticancéreux induits par les HDACi.

Cette combinaison s'est même avérée synergique puisque le prétraitement par les HDACi permet de diminuer la quantité d'HAMLET nécessaire pour déclencher la mort apoptotique ou autophagique des cellules cancéreuses (Aits *et al.*, 2009, Brest *et al.*, 2007, Hallgren *et al.*, 2008). J'ai finalement montré *in vitro* l'efficacité anti-tumorale de cette combinaison HDACi/HAMLET sur différents modèles types de cancers fréquents (lymphomes, carcinomes pulmonaires, carcinomes rénaux,...).

Ces résultats offrent de nouvelles perspectives thérapeutiques basées sur un brevet international (WO/2007/031853, Inventeur principal, déposé par NatImmune, DK) et prochainement testées lors d'études précliniques.

Rôles des miARN dans l'effet anticancéreux des HDACi (stage postdoctoral, directeur Pr. Hofman)

A ce jour, le mécanisme anti-tumoral des HDACi est encore mal connu et complexe. J'ai formulé l'hypothèse que ces agents, en induisant une acétylation des histones, pourraient provoquer la ré-expression de miARN anti-tumoraux. Les miARN sont, en effet, des petits ARN non codants qui régulent la traduction des ARNm et dont l'expression a été principalement considérée comme des biomarqueurs diagnostiques du grade tumoral. Cependant, les fonctions suppresseur de tumeur des miARN (hormis la famille let-7) restent indéterminées au niveau moléculaire dans le cadre de chimiothérapies. Pour répondre à ces questions, j'ai rejoint le laboratoire INSERM ERI21 associé à une Tumorothèque CRB (Financement INCA).

Au niveau fondamental, j'ai démontré que le traitement des HDACi induit la surexpression des miR-129-5p et miR-133b ; et que l'expression de ces miARN est non seulement nécessaire (transfection antigomiR), mais aussi suffisante pour induire la mort des cellules tumorales (transfection miR) par l'expression de gènes pro-apoptiques.

Au final, il s'agit de la première mise en évidence du rôle essentiel des miARN dans le mécanisme anticancéreux des HDACi (article soumis).

Au niveau translationnel, en m'associant avec des pathologistes au sein du CRB (Lassalle *et al.*, 2009), j'ai montré que les miR-129-5p et miR-133b sont indétectables au sein de différents types de tumeur, sont ré-induits en réponse aux HDACi dans des cultures primaires cancéreuses et sont à l'origine de leur mort apoptotique. De façon remarquable les cultures primaires non tumorales sont insensibles aux effets des HDACi (réexpression des miARN et en conséquence aux processus létaux associés).

Sur la base de ces résultats, j'ai donc proposé ces deux miARN comme biomarqueurs d'efficacité thérapeutique des HDACi (brevet européen). Ces conclusions vont être étendues à d'autres types de cancers épithéliaux (pulmonaires, colorectaux...) et d'autres chimiothérapies.

Régulation de l'expression d'IRGM par les miR-196. Conséquences de la mutation silencieuse C313T (Projet chercheur statutaire)

Les **Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales**, qui regroupent la **Maladie de Crohn (MC)** et la rectocolite ulcéreuse (RCH) (respectivement 60% et 40% des cas en France), représentent un problème important de santé publique. En effet, ces maladies n'ont pas de traitement étiologique et le coût de la prise en charge thérapeutique des patients atteints de MICI est élevé. **Faits marquants, ces maladies inflammatoires ont une morbidité et une mortalité importantes avec une incidence globale six fois plus élevée d'apparition d'adénocarcinomes coliques, cancers de plus mauvais pronostic que ceux développés dans la population générale, car précoces et souvent multifocaux (Podolsky, 2002).**

L'autophagie est un processus d'autodigestion finement contrôlé, dont la vitesse et l'amplitude sont déterminées entre autre par le niveau d'expression des protéines composant sa machinerie. Ainsi, l'existence d'un polymorphisme silencieux d'IRGM (C313T) « à risque » pour les MICI m'a orienté vers une dérégulation possible de son expression protéique (McCarroll *et al.*, 2008). Très récemment, il a été montré que l'expression génique est non seulement sous le contrôle du promoteur mais aussi d'une nouvelle classe de petits ARN non codants, les microARN (miARN). J'ai donc recherché par bioinformatique la fixation possible d'un miARN au niveau de ce polymorphisme (en phase codante). Pour cela, j'ai développé l'application SnipMir avec K. Lebrigand (Bioinformaticien, IPMC-CNRS).

J'ai pu ainsi mettre en évidence par bioinformatique l'appariement possible des miARN-196 avec les ARNm d'IRGM sauvage. De façon intéressante, la mutation silencieuse décrite chez les patients est située au niveau de la région " Seed " qui est la zone la plus importante pour l'interaction miR196-ARNm. La mutation d'IRGM dans cette région inhiberait de ce fait l'interaction entre IRGM et miARN-196. Sur la base de ces résultats, j'ai formulé

l'hypothèse physiopathologique que l'expression d'IRGM chez un sujet sain serait réprimée par les miR-196. Au contraire, chez le sujet porteur du polymorphisme, il n'y a pas de régulation/fixation par les miR-196, ce qui lèverait la répression et entraînerait une expression protéique élevée d'IRGM.

IRGM humain est impliqué dans l'élimination par autophagie des pathogènes virulents (xénophagie (*M. tuberculosis*)). Les conséquences du polymorphisme d'IRGM C313T L105 sur le processus autophagique restaient à déterminer. Pour cela, j'ai établi une collaboration avec le Dr Darfeuille-Michaud, JE 2526 Uda qui a isolé chez les patients atteints de la MC des *E. coli* adhérentes invasives (AIEC) et qui travaille sur le détournement du processus autophagique par ces pathogènes (Boudeau et al., 1999, Lapaquette et al., 2009). Ainsi, j'ai mis en évidence que l'absence de régulation négative de la forme mutée d'IRGM T313 par les miARN-196 conduit à des réponses xénophagiques inadaptées (croissance bactérienne augmentée) qui pourrait être à l'origine d'une inflammation chronique symptômes retrouvés dans les MICI, et qui pourraient à terme conduire à des événements néoplasiques..

Jusqu'à présent, l'importance des mutations synonymes, fréquentes et à risques pour de nombreuses pathologies, a été sous-estimée car sans conséquence sur la séquence protéique. Nos résultats nous amènent à réviser de façon très significative notre vision des conséquences de ces mutations synonymes dans les mécanismes physiopathologiques: nous avons été les premiers à mettre en évidence non seulement qu'un miARN pouvait se lier en phase codante, et surtout qu'un polymorphisme, en perturbant la séquence nucléotidique et ainsi la fixation d'un miARN, est responsable de d'expression protéique inadaptée et donc possiblement pathologiques (Nat Genet 2011, Autophagy 2011, European patent 2009).