

Sélection et décryptage

L'innovation en cancérologie à travers la presse scientifique et médicale

Rétrocontrôle de BRAF par MEK : un rôle pour les protéines d'échafaudage*

On connaît bien le cheminement de l'activation des kinases dans la voie prépondérante de la prolifération cellulaire qu'est la principale voie des MAP kinases : les MAP3 kinases (protéines RAF) activent les MAP2 kinases (protéines MEK) par phosphorylation, les MAP2 kinases activent les MAP kinases (protéines ERK) par phosphorylation, et les MAP kinases activent des facteurs de transcription par phosphorylation. Les trois familles de kinases agissant ainsi « en cascade » sont reliées physiquement par l'intermédiaire de protéines d'échafaudage, les protéines KSR (*kinase suppressor of RAS*), qui sont des kinases « dégénérées », des pseudo-kinases dépourvues d'activité catalytique. Nous allons voir que ces dernières jouent en outre un rôle important dans le contrôle de la voie des MAP kinases.

Les protéines RAF sont au nombre de trois, ARAF, BRAF et CRAF. Elles sont activées d'abord par dimérisation, induite par les protéines RAS ; cette dimérisation permet leur phosphorylation, réalisée par diverses kinases, en particulier celles de la grande famille des protéines kinases A (PKA). Les protéines KSR sont capables de s'hétérodimériser avec les protéines RAF, mais elles ne possèdent pas le domaine de liaison aux protéines RAS qui caractérise les protéines RAF et permet précisément leur activation par ces dernières ; dès lors, on pouvait se demander quel était le moteur de cette hétérodimérisation. Les auteurs de cet article montrent que c'est *via* la liaison préalable de la protéine KSR1 avec une protéine MEK que s'effectue la dimérisation de BRAF avec KSR1, qui met en jeu des contacts directs entre des domaines N-terminaux spécialisés des deux protéines.

Ainsi, par une sorte d'action en retour, c'est la protéine MEK, grâce à sa liaison à une protéine KSR, qui assure de façon allostérique (son activité kinase n'est pas requise) la stimulation de l'activité catalytique de la protéine BRAF. Le simple rôle de protéines d'échafaudage attribué aux protéines KSR doit être sérieusement revu...

C'est lors d'une étude à haut débit d'interactions des protéines RAF avec l'ensemble du kinome, par une technique de transfert d'énergie de résonance évalué par bioluminescence (BRET), que les auteurs ont découvert que la dimérisation de BRAF avec KSR1 était induite spécifiquement par MEK1 et MEK2. Ils se sont alors focalisés sur ce mécanisme de ces interactions en utilisant des mutants de BRAF, KSR1 et MEK1 au niveau des sites d'interaction :

- la mutation MEK1 F311S abroge sa liaison avec BRAF et KSR1 et elle empêche l'induction de la dimérisation de KSR1 avec BRAF ;
- la mutation KSR1 W831R abroge sa liaison avec MEK1 et elle empêche MEK1 d'induire la dimérisation

de KSR1 avec BRAF, et donc l'activation de BRAF et la phosphorylation de MEK1 ;

- la mutation BRAF I666R abroge sa liaison avec MEK1, mais elle n'empêche pas MEK1 d'induire la dimérisation de KSR1 avec BRAF, alors qu'elle ne permet pas la phosphorylation de MEK1 par BRAF.

Ainsi, la capacité de MEK1 à induire la dimérisation BRAF-KSR1 dépend de l'interaction entre MEK1 et KSR1 ; et l'activation de BRAF par KSR1 (et donc la phosphorylation de MEK1) dépend de leur hétérodimérisation.

Deux modèles peuvent rendre compte de ce mécanisme (*figure 1*) : dans le premier, KSR1 fonctionne comme une protéine d'échafaudage pour présenter MEK1 au site catalytique de BRAF, les domaines kinase de BRAF et de KSR1 étant simplement disposés côte-à-côte.

Le modèle proposé par les auteurs (*figure 1*) postule l'existence de deux molécules de MEK distinctes lors de l'interaction : la première, activatrice, liée à KSR1 et stimulant sa dimérisation avec BRAF, la seconde, substrat, capable d'être phosphorylée par BRAF.

Ce modèle a pu être validé grâce à des mutants particuliers de MEK1, spécifiquement le double mutant M219W-A220L, qui sont capables de reconnaître KSR1 porteur de la mutation W831R (ce qui n'est pas le cas de MEK1 sauvage), et par conséquent d'induire l'activation de MEK1 par BRAF : la restauration de la liaison MEK1-KSR1 est suffisante pour induire l'activation de MEK1 par BRAF. En outre, la co-expression de MEK1 sauvage et de MEK1 M219W-A220L dans une lignée portant la mutation KSR1 W831R conduit à la phosphorylation par BRAF de la forme MEK1 sauvage, montrant bien que deux molécules distinctes de MEK1 sont impliquées, la molécule activatrice et la molécule substrat. Les auteurs ont ensuite développé l'étude des sites d'interaction entre les trois partenaires, à l'aide de mutants conduisant à des protéines tronquées, et en utilisant diverses techniques physicochimiques. Mais cela reste au-delà des limites d'un exposé se voulant didactique et pas trop complexe...

Que retenir de cette brillante étude : que la vision habituelle selon laquelle les protéines KSR sont de simples échafaudages permettant la phosphorylation des protéines MEK en les présentant convenablement à BRAF doit être abandonnée. Et qu'il faut concevoir un modèle dans lequel les protéines KSR fonctionnent comme des activateurs allostériques de BRAF... Nous disposons d'inhibiteurs de la fonction kinase de BRAF, qui ont montré leur intérêt dans diverses pathologies comme le mélanome malin métastatique porteur de la mutation activatrice V600E ; il serait temps de rechercher des molécules interagissant avec les sites de liaison entre KSR1 et BRAF qui pourraient se révéler intéressantes en thérapeutique. Et sur le plan fondamental, comme il

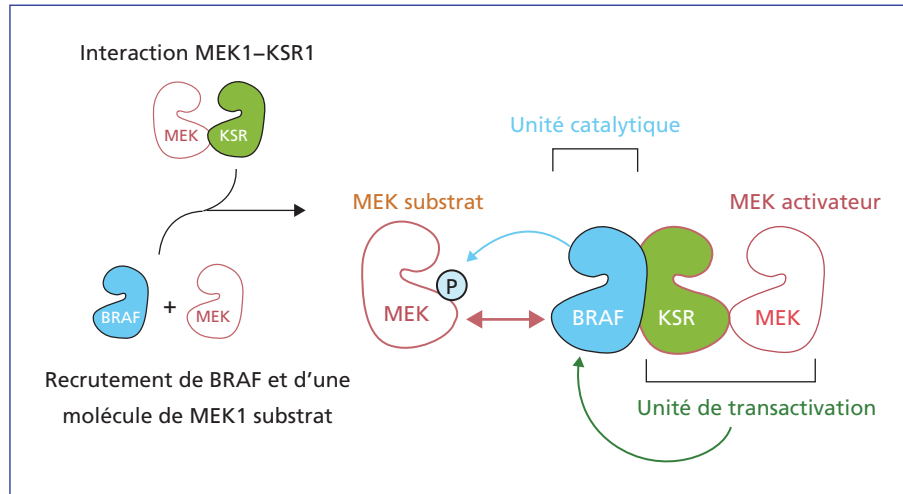


Figure 1. Nouveau modèle de fonctionnement du trio BRAF-KSR1-MEK1. Dans un premier temps, l'interaction entre MEK1 et KSR1 (unité de transactivation) permet la dimérisation BRAF-KSR, donc l'activation de BRAF et la phosphorylation d'une autre molécule de MEK par BRAF.

Figure 1. New operating model for the BRAF-KSR1-MEK1 trio. Initially, the interaction between MEK1 and KSR1 (transactivation unit) enables BRAF-KSR dimerization, and hence the activation of BRAF and phosphorylation of another MEK molecule by BRAF.

existe plus d'une vingtaine de MAP3 kinases et près d'une dizaine de MAP2 kinases, un immense travail, visant à identifier les mécanismes de régulation de toutes ces voies parallèles impliquées à divers titres dans la prolifération et la survie cellulaires, reste à faire.

*Lavoie H, Lahmi M, Maisonneuve P, et al. MEK drives BRAF activation through allosteric control of KSR proteins. *Nature* 2018 ; 554 : 549-53. doi: 10.1038/nature25478

Jacques Robert

Pourquoi l'incidence des cancers augmente-t-elle avec l'âge ?*

Les épidémiologistes nous l'ont appris il y a bien longtemps : l'incidence des cancers augmente avec l'âge et les cancers sont des maladies du vieillissement... La question est de savoir pourquoi ! La première explication réside dans l'accumulation progressive de mutations potentiellement oncogéniques sous l'effet de l'épuisement progressif des systèmes de contrôle de l'intégrité de l'ADN. Elle est en accord avec le fait que les chromosomes « s'usent » lors de chaque division cellulaire en réduisant la taille de leurs télomères et en fragilisant diverses zones du génome. On peut aussi arguer du fait que le nombre de réplifications des cellules souches augmentant inéluctablement au cours de la vie, la probabilité que l'une d'elles soit atteinte d'une erreur ne peut que croître... Mais cette interprétation « vogels-teinienne » serait en accord avec une augmentation linéaire de l'incidence des cancers, pas avec cette augmentation exponentielle que l'on voit sur les courbes. Une autre explication, plus « environnementale », est que les contacts avec les agents cancérigènes de notre environnement (radiations, molécules cancérigènes, etc.) augmentent tout aussi inéluctablement au cours de la vie et entraînent, par conséquent, l'augmentation du risque mutationnel dans les tissus au contact du monde extérieur

(muqueuses respiratoires et digestives en particulier). Les auteurs de cet article proposent une autre explication : l'épuisement du contrôle immunologique des « points de départ » de cancers, petits clones de cellules cancéreuses encore soumis, normalement, à la surveillance immunitaire. Pourquoi pas ?

Les auteurs avancent pour preuve de la perte de nos capacités de défense immunes l'involution du thymus au cours de l'enfance, qui nous prive progressivement de notre production de cellules T, selon une courbe exponentielle, avec une demi-vie qu'ils estiment à 16 ans. Les lymphocytes T exercent sur les cellules porteuses de mutations immunogènes une surveillance immunitaire conduisant à leur destruction ; il en est de même vis-à-vis des agents pathogènes étrangers (virus, bactéries). En partant de l'hypothèse que l'apparition aléatoire de cellules mutantes, suivie de leur développement clonal, est de probabilité constante au cours de la vie, et que ces mini-clones suivent une « marche au hasard » (*stochastic random walk*), les auteurs décrivent un modèle dans lequel la diminution du seuil de déclenchement de la réponse immunitaire conduit à l'augmentation du risque de cancer (*figure 1*). Si les capacités d'élimination de ces

îlots de cellules cancéreuses diminuent de façon exponentielle comme diminue le nombre de cellules T, l'augmentation de l'émergence de cancers suivra également une loi exponentielle. À ce simple paramètre d'autres peuvent être ajoutés, pouvant prendre en compte, par exemple, une probabilité d'apparition des cellules immunogènes et un rythme de croissance des mini-clones cancéreux variables dans le temps ; mais en fin de compte, on aboutit toujours à une incidence d'émergence de cancers qui augmente de façon exponentielle avec le temps.

Le modèle proposé est séduisant ; il intègre, bien sûr, l'augmentation connue de l'incidence des cancers chez les sujets immuno-déficients (*immune-compromised*) ; il intègre aussi les différences liées au sexe. On sait, en effet, que l'incidence des cancers est plus faible, de façon très stable, chez les femmes que chez les hommes, le rapport étant d'environ 1,33. Or il semble possible de quantifier le taux de production de cellules T chez un individu selon une approche dont je ne peux toutefois vérifier la validité [1] ; cette technique a été proposée pour suivre la reconstitution des capacités immunes après greffe de moelle ou caractériser les déficits immunitaires. Il semble qu'une différence significative existe entre les sexes, le marqueur utilisé montrant une valeur supérieure chez les femmes que chez les hommes, avec un rapport de $1,46 \pm 0,31$, et sa décroissance avec l'âge utilisé étant plus rapide chez les hommes que chez les femmes...

Si les auteurs sont dans le vrai, et si le vieillissement immunitaire est plus important dans le déterminisme de l'oncogenèse que l'accumulation progressive de mutations (qu'elle soit d'origine endogène ou environnementale), cet article apporte une bonne nouvelle pour les thérapeutes et leurs patients : il est sans doute plus facile de renforcer la fonctionnalité d'un système immunitaire vieillissant que de limiter l'apparition de mutations aléatoires et la régénération du thymus a même été proposée... Encore faudra-t-il que l'hypothèse initiale des auteurs pour élaborer leur modèle soit bien validée, tout particulièrement par les immunologistes !

*Palmer S, Albergante L, Blackburn CC, Newman TJ. Thymic involution and rising disease incidence with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018 ; 115 : 1883-8. doi: 10.1073/pnas.1714478115

RÉFÉRENCES

1. Sottini A, Serana F, Bertoli D, et al. Simultaneous quantification of T-cell receptor excision circles (TRECs) and K-deleting recombination excision circles (KRECs) by real-time PCR. *J Vis Exp* 2014 ; 94 : 52184. doi: 10.3791/52184
 2. Bredenkamp N, Ulyanchenko S, O'Neill KE, Manley NR, Vaidya HJ, Blackburn CC. An organized and functional thymus generated from FOXN1-reprogrammed fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2014 ; 16 : 902-8. doi: 10.1038/ncb3023

Jacques Robert

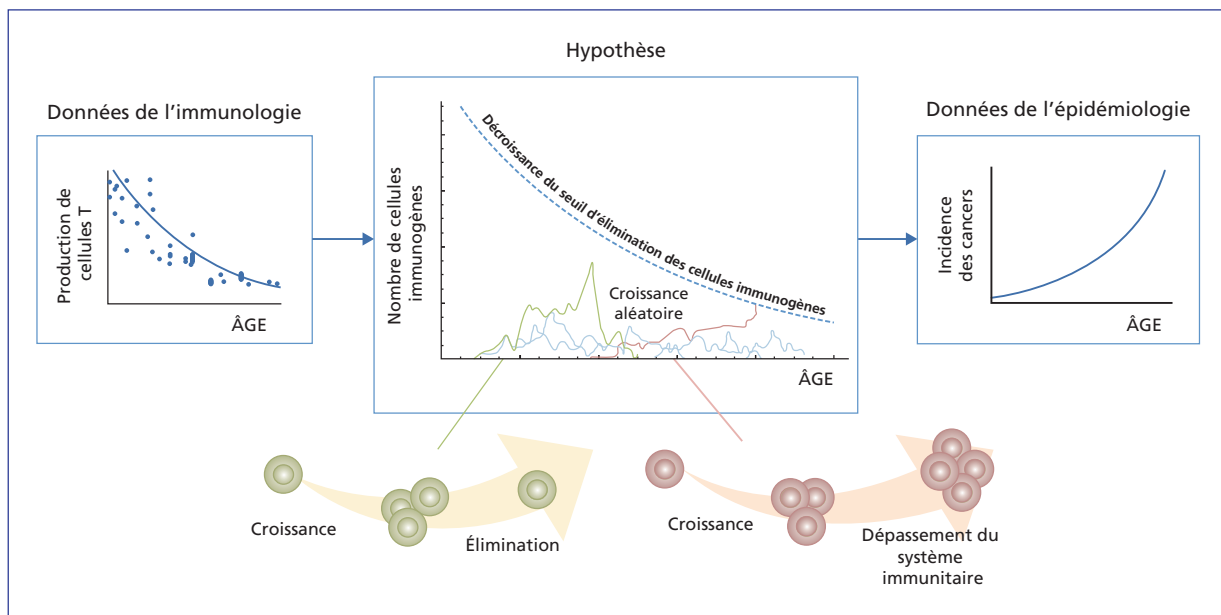


Figure 1. Le déclin de la production de cellules T conduit à l'augmentation de l'incidence des cancers. Le modèle repose sur le fait que la probabilité d'apparition de cellules immunogènes est constante au cours du temps et que la capacité de les éliminer diminue avec l'âge de façon exponentielle.

Figure 1. The decrease in production of T cells leads to an increase in the incidence of cancers. The model is based on the fact that the probability of the appearance of immunogenic cells is constant over time and that the ability to eliminate them exponentially reduces with age.

Principes moléculaires sous-tendant l'évolution des cancers du pancréas*

Les cancers du pancréas sont particulièrement meurtriers et leur fréquence augmente de façon inquiétante. Hormis la connaissance des mutations pilotes (*KRAS*, *TP53*, *CDKN2A* et bien d'autres), nous ne savons pas grand-chose sur la biologie de ces cancers. Absence de lien évident entre les mutations et le phénotype, richesse stromale qui rend très difficile l'interprétation des transcriptomes, pauvreté des collections de lignées cellulaires, difficultés d'obtention des biopsies séquentielles ou simplement apparées entre primitif et métastase, tout concourt à rendre particulièrement difficile la compréhension moléculaire de la formation et de la progression de ces cancers. Les auteurs de cet article, pour progresser dans ce domaine, ont caractérisé une grande quantité de lignées cellulaires murines de cancers du pancréas obtenues par expression conditionnelle de la mutation *Kras* G12D dans le pancréas, et ont analysé leurs données à la lumière de comparaisons inter-espèces et d'études fonctionnelles.

Le paysage mutationnel des cancers du pancréas est analogue chez la souris et l'homme, mais leur charge mutationnelle est nettement plus élevée dans les adénocarcinomes pancréatiques humains (n = 51) que dans leurs équivalents murins (n = 38) : environ 3,3 fois plus de *single nucleotide variations* (SNV) sont rencontrées dans les tumeurs humaines. De même, les *copy number variations* (CNV) et les translocations sont plus fréquentes dans les tumeurs humaines, mais il faut noter une très grande variabilité individuelle de ces paramètres, chez la souris comme chez l'homme (figure 1). Un certain

nombre de tumeurs présentent des réarrangements multiples et complexes, sans doute dus au phénomène de chromothripsis, qui apparaît comme un moteur de l'évolution péjorative des cancers du pancréas. Cela est particulièrement intéressant pour les tumeurs murines, dont l'initiation est synchrone et identique (*Kras* G12D), et qui subissent des réarrangements majeurs au niveau du chromosome 4, conduisant systématiquement à la perte du gène *Cdkn2a* (p16).

Les auteurs se sont intéressés à l'évolution du gène *Kras* G12D lors du développement des cancers murins. Ils observent quatre niveaux de surreprésentation liés à quatre mécanismes distincts (figure 2) : simple hétérozygotie ; amplification focale ; duplication du bras du chromosome altéré ; perte d'hétérozygotie. Les deux tiers des cancers présentent ainsi un déséquilibre dans le « *gene dosage* » du mutant, ce qui témoigne d'une pression de sélection importante en faveur de l'allèle mutant ; s'y ajoute la perte de l'expression (ARNm) du gène sauvage chez les simples hétérozygotes, témoignant d'une contribution épigénétique à la prépondérance de la protéine mutée par rapport à la protéine sauvage. Ce déséquilibre allélique se retrouve dans les cancers pancréatiques humains, et même dans des néoplasies pancréatiques intra-épithéliales de bas grade, ce qui montre son importance dans l'évolution précoce des adénocarcinomes pancréatiques. Sur le plan fonctionnel, ce déséquilibre favorise également la dissémination métastatique de ces cancers, chez la

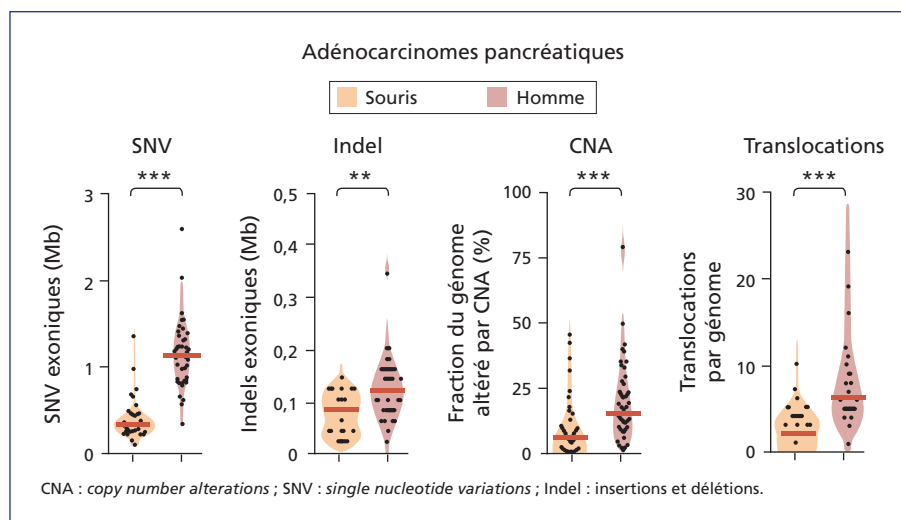


Figure 1. Altérations moléculaires des cancers pancréatiques humains et murins, ces derniers étant induits par expression conditionnelle de *Kras* G12D dans le pancréas.

Figure 1. Molecular alterations in human and mouse pancreatic cancers. The mouse pancreatic cancers are caused by the conditional expression of *Kras* G12D in the pancreas.

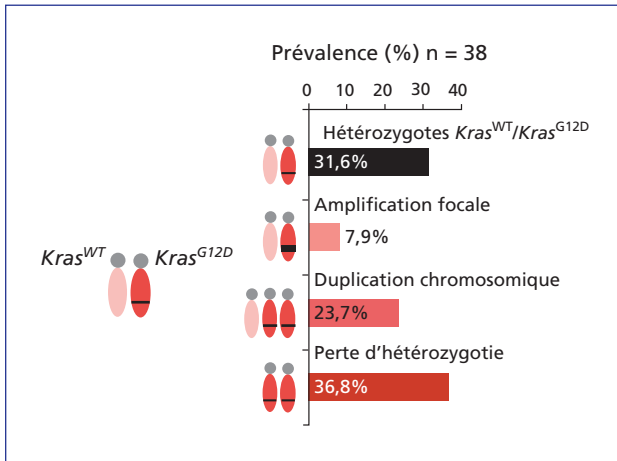


Figure 2. Prévalence des différents mécanismes de surreprésentation de l'allèle $Kras$ mutant ($Kras^{G12D}$) par rapport à l'allèle sauvage ($Kras^{WT}$).

Figure 2. Prevalence of different mechanisms of over-representation of the mutant $Kras$ allele ($Kras^{G12D}$) in comparison to the wild-type allele ($Kras^{WT}$).

souris (figure 3) comme chez l'homme, mais il n'est pas associé à l'acquisition d'amplifications de proto-oncogènes comme *Myc*, *Yap1* et *Nfkb2* qui semble nécessaire, en revanche, pour la progression précoce des tumeurs n'ayant pas de déséquilibre allélique de *Kras* muté (figure 4, page suivante).

Nous avons vu que la perte de *Cdkn2a* était un événement fréquent dans les cancers pancréatiques murins étudiés ; les auteurs ont minutieusement étudié la séquence des événements conduisant à la perte de ce gène et au déséquilibre allélique du gène *Kras* : dans tous les cas interprétables, la délétion homozygote de *Cdkn2a* précède le gain en *Kras* G12D. C'est la délétion homozygote de *Cdkn2a* qui est donc responsable du déséquilibre allélique en faveur de *Kras* muté G12D, surtout par perte d'hétérozygotie. En revanche, les amplifications de *Myc*, *Yap1* et *Nfkb2* se rencontrent dans les délétions hétérozygotes de *Cdkn2a*, sans doute par un mécanisme d'haplo-insuffisance. Lorsque les auteurs génèrent des souris exprimant *Kras* G12D dans le pancréas et présentant une délétion homozygote de *Cdkn2a*, toutes les tumeurs obtenues présentent bien le déséquilibre allélique : ce phénomène est donc une constante dans l'évolution des cancers du pancréas une fois que *Cdkn2a* est perdu. De même, en générant des souris avec, au niveau du pancréas, la mutation de *Kras* G12D et une délétion de *Tp53*, les tumeurs présentent également le déséquilibre allélique de *Kras* G12D mais, dans ce cas, essentiellement par gain chromosomique (trisomie). En revanche, toujours en utilisant la même approche, la délétion de *Tgfb2* conduit à une fréquence bien moindre du déséquilibre allélique

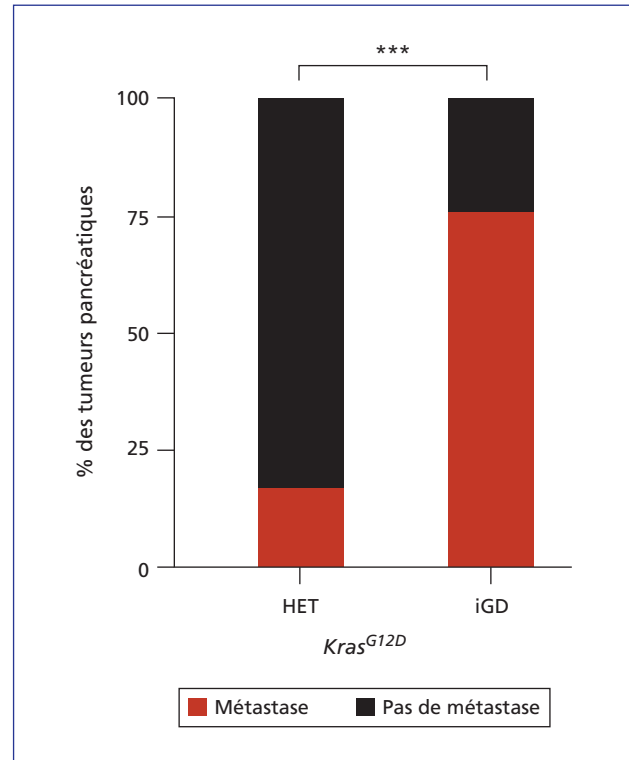


Figure 3. Proportion de tumeurs pancréatiques métastatiques selon que l'allèle muté $Kras^{G12D}$ est présent à l'état hétérozygote (HET) ou surreprésenté en raison d'un déséquilibre (iGD).

Figure 3. Proportion of metastatic pancreatic tumours according to whether the mutated $Kras^{G12D}$ allele is present in the heterozygotic state (HET) or over-represented due to an imbalance (iGD).

de *Kras* G12D, et seules des délétions hétérozygotes de *Cdkn2a* sont rencontrées secondairement dans ces tumeurs (figure 5, page suivante).

Cet article propose ainsi un cadre général du cheminement de l'évolution moléculaire des adénocarcinomes pancréatiques (figure 6, page suivante). Il décrit de façon minutieuse les trajectoires évolutives, identifie les altérations génétiques pilotes et montre combien la variation du « dosage » de l'allèle *Kras* muté, qui est modulée par au moins trois voies distinctes impliquant des gènes suppresseurs de tumeurs, est importante pour l'évolution précoce de ces cancers comme pour leur développement métastatique ultérieur.

*Mueller S, Engleitner T, Maresch R, et al. Evolutionary routes and KRAS dosage define pancreatic cancer phenotypes. *Nature* 2018 ; 554 : 62-8. doi: 10.1038/nature25459

Jacques Robert

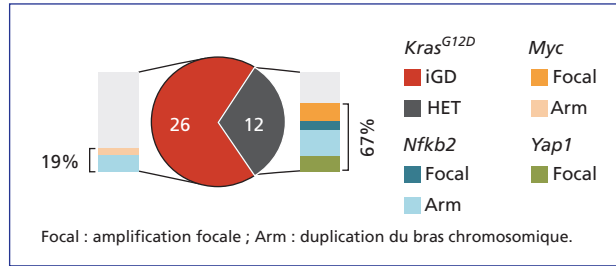


Figure 4. L'acquisition d'amplifications de divers oncogènes est plus fréquente lorsque $Kras^{G12D}$ est simplement présent à l'état hétérozygote (HET) sans déséquilibre allélique (iGD).

Figure 4. The acquisition of amplification of various oncogenes is greater when $Kras^{G12D}$ is simply present in the heterozygotic state (HET) without an allelic imbalance (iGD).

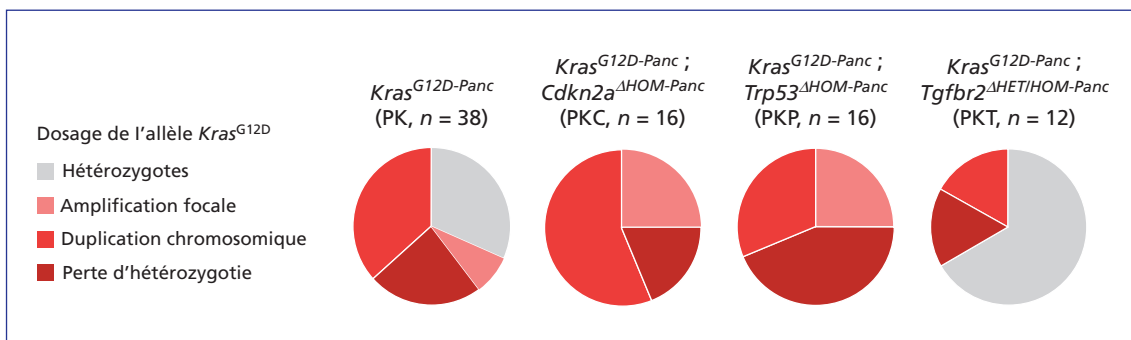


Figure 5. Proportions des divers types de déséquilibre allélique de $Kras^{G12D}$ dans les tumeurs pancréatiques obtenues par expression conditionnelle de $Kras^{G12D}$ dans le pancréas (PK), associé à une délétion de $Cdkn2a$ (PKC), de $Tp53$ (PKP) ou de $Tgfbr2$ (PKT). iGD : déséquilibre allélique avec surreprésentation de $Kras^{G12D}$.

Figure 5. Proportions of the different types of allelic imbalances of $Kras^{G12D}$ in pancreatic tumours obtained through the conditional expression of $Kras^{G12D}$ in the pancreas (PK), associated with a detection of $Cdkn2a$ (PKC), $Tp53$ (PKP) or $Tgfbr2$ (PKT). iGD: allelic imbalance with over-representation of $Kras^{G12D}$.

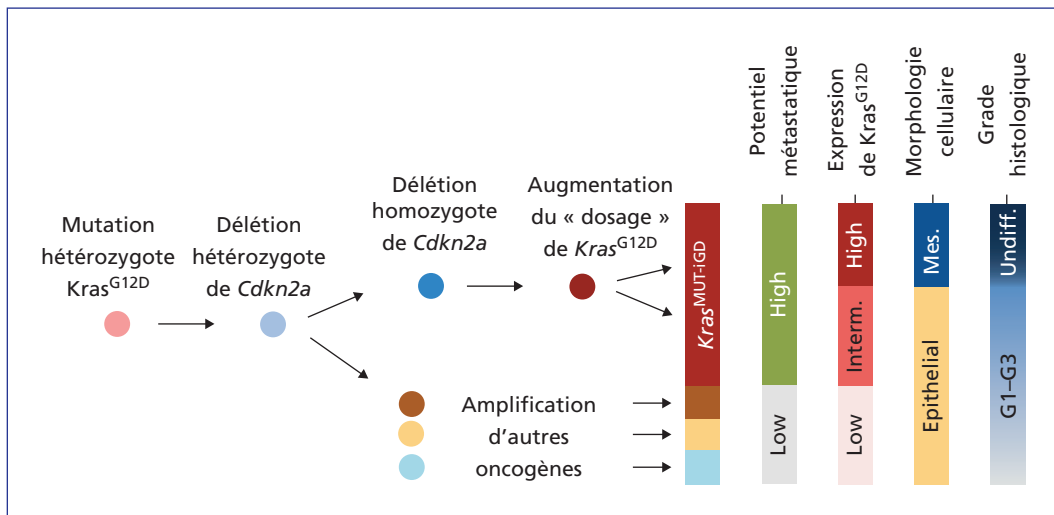


Figure 6. Progression des tumeurs pancréatiques par acquisition successive des principales altérations moléculaires oncogéniques décrites par les auteurs.

Figure 6. Progression of pancreatic tumours through the successive acquisition of the main oncogenic molecular alterations described by the authors.

L'hétérogénéité tumorale à la lumière du séquençage unicellulaire de l'ADN*

Le séquençage ultime de l'ADN, c'est celui de la cellule unique... Il permet, en particulier, de débusquer le niveau d'hétérogénéité intratumorale des cancers et de comprendre les modalités évolutives de l'invasion locale et de la dissémination métastatique. Dans ce travail du *MD Anderson Cancer Center*, les auteurs ont comparé les variations du nombre de copies ainsi que les variations nucléotidiques exomiques présentes, chez une même patiente, dans des sous-populations de carcinomes *in situ* et de carcinomes invasifs de la glande mammaire.

Les carcinomes canauxiers *in situ* sont la forme précoce la plus commune des cancers du sein, souvent détectés par la seule mammographie. Seulement 10 à 30 % deviendront invasifs et la grande question est de savoir si l'on peut prédire ce caractère invasif afin de mettre en place un traitement précoce. Plusieurs modèles évolutifs ont été proposés. Un premier modèle repose sur l'indépendance des différentes lignées tumorales *in situ* présentes dans une glande mammaire, pouvant conduire chacune à un carcinome invasif original ; dans ce cas, les différents lignages cellulaires tumoraux évoluent de façon parallèle et les altérations moléculaires des carcinomes *in situ* et des carcinomes invasifs seront distinctes. Un deuxième modèle postule que, bien que de multiples clones soient présents à l'origine dans les carcinomes *in situ*, l'un d'eux seulement échappe au contrôle, franchit la membrane basale et devient invasif ; dans ce cas, on doit retrouver dans le carcinome invasif les altérations moléculaires présentes dans le carcinome *in situ*, auxquelles s'ajoutent celles acquises

progressivement lors de l'invasion. Enfin, un troisième modèle est celui de l'origine unicellulaire du cancer, cellule cancéreuse originelle qui évolue ensuite vers le carcinome *in situ*, puis vers le carcinome invasif.

Plusieurs équipes ont déjà tenté d'étudier l'évolution des carcinomes mammaires à l'aide du séquençage de l'ADN, mais se sont heurtées à de multiples difficultés, en particulier lors des étapes d'isolement des régions tumorales provenant des diverses zones de la même glande mammaire, et de microdissection permettant de séparer les cellules tumorales du stroma. Les auteurs ont ici développé une technique topographique du séquençage de cellule unique (*Topographical Single Cell Sequencing* ou TSCS) qui leur a permis d'apporter des réponses aux questions posées. Ils ont sélectionné une cohorte de dix patientes dont la tumeur, congelée, présentait de façon synchrone des régions définies histologiquement de carcinome *in situ* et de carcinome invasif dans les mêmes sections. Une moyenne de 130 cellules par tumeur a pu être étudiée pour identifier les variations du nombre de copies, et des pools de quelques milliers de cellules de chaque zone tumorale ont subi un séquençage d'exome de grande profondeur ; le même séquençage du tissu normal a permis d'identifier et de filtrer les variants germinaux.

Quelques exemples de résultats précis peuvent être donnés. Chez une patiente (P8), 85 cellules *in situ* et 150 cellules invasives ont été étudiées. Trois clones ont été isolés de diverses régions, avec des altérations oncogéniques communes (gènes *ALK*, *MYC*, *FOXA1* et *RUNX1*) et des altérations propres à chaque clone (*figure 1A*). Ces mêmes

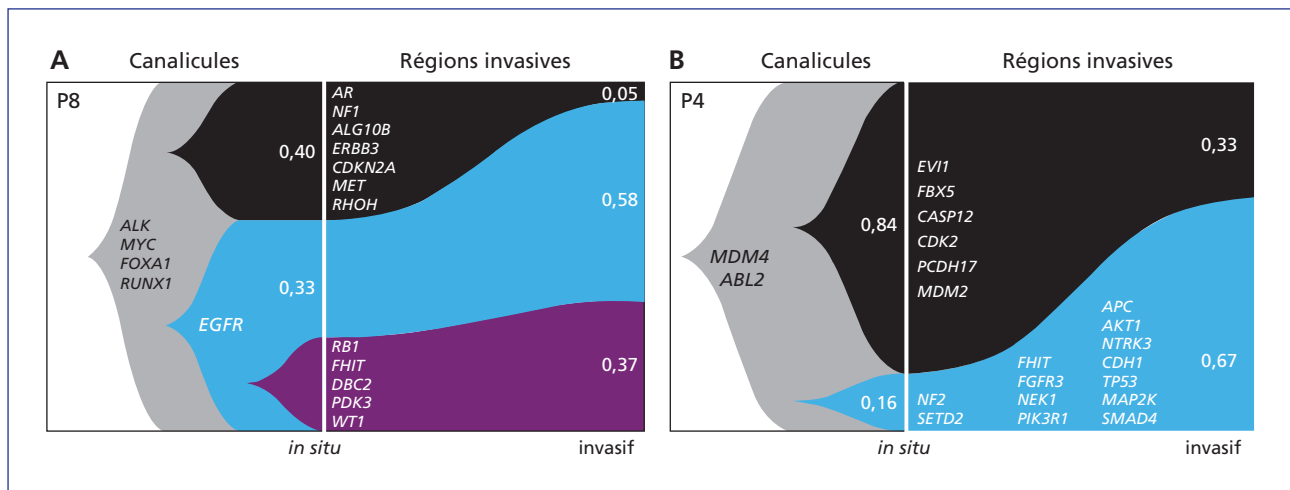


Figure 1. Évolution clonale des sous-populations de la tumeur de la patiente P8 (A) et de la patiente P4 (B).

Les altérations communes sont indiquées en gris et les altérations propres à chaque sous-population sont indiquées en couleur. Les altérations génomiques observées dans les cellules *in situ* et les cellules invasives sont identiques, seules les proportions des différentes sous-populations sont différentes.

Figure 1. Clonal evolution of the sub-populations of tumours in Patient P8 (A) and P4 (B). The shared alterations are marked in grey and the alterations specific to each sub-population are marked in colour. The genomic alterations observed in the cells *in situ* and invasive cells are identical; only the proportions of the various sub-populations are different.

clones sont présents dans les cellules *in situ* et dans les cellules invasives, avec une proportion différente, mais sans altérations supplémentaires lors du passage à l'invasivité. Chez une autre patiente (P4), 46 cellules *in situ* et 58 cellules invasives ont été étudiées. La même divergence, cette fois en deux clones distincts, maintenus de l'état *in situ* à l'état invasif, a été observée, les altérations communes concernant dans ce cas les gènes *MDM4* et *ABL2* (figure 1B). Là encore, les proportions des deux clones varient entre l'état *in situ* et l'état invasif, montrant que certaines altérations sont plus invasives que d'autres. Les pertes de *SMAD4* ou de *CDH1*, gènes impliqués dans la migration, en témoignent (clone B de la patiente P4).

Globalement, deux grands types d'évolution tumorale ont été observés dans les dix tumeurs étudiées, avec un total de 425 cellules de carcinome *in situ* et 503 cellules de carcinome invasif dont le séquençage a été réalisé, le nombre total de mutations exoniques observées dans chaque tumeur variant entre 2 et plus de 60, avec une moyenne de $23 \pm 3,3$. Quatre tumeurs sur les dix étudiées se sont révélées monoclonales, alors que les six autres étaient polyclonales (avec deux à cinq clones distincts), mais leur diversité clonale n'était pas modifiée durant le passage à la forme invasive (figure 2). Ces résultats ne sont pas en accord avec le second modèle exposé ci-avant, pour lequel on aurait dû voir une diminution de la diversité clonale lors du passage de l'*in situ* à l'invasif. Ils ne sont pas non plus en accord avec l'indépendance des lignages cellulaires, puisque le même « point de départ » mutationnel est retrouvé de façon systématique chez chacune des patientes : c'est le modèle de la cellule cancéreuse originelle unique qui est le seul à permettre d'interpréter les résultats observés. Il est intéressant de noter que, si les clones présents dans l'*in situ* sont bien retrouvés dans l'invasif, leur proportion est modifiée au cours de cette

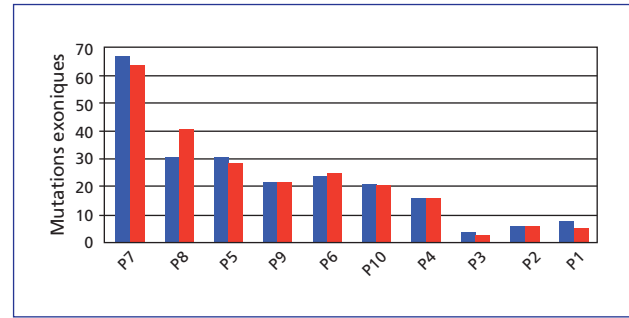


Figure 2. Nombre de mutations exoniques présentes dans les cellules tumorales *in situ* (colonnes bleues) et invasives (colonnes rouges) des patientes P1 à P10. On voit l'excellente corrélation entre les nombres de mutations des cellules *in situ* et invasives de chaque tumeur.

Figure 2. Number of exonic mutations present in tumour cells *in situ* (blue columns) and invasive cells (red columns) of Patients P1 to P10. Note the excellent correlation between the number of mutations in *in situ* and invasive cells for each tumour.

évolution, montrant bien que certains génotypes sont plus « invasifs » que d'autres.

Trois enseignements majeurs peuvent être tirés de cette étude :

- l'évolution génomique précoce des cancers du sein se produit dans les canalicules, avant que les cellules tumorales ne franchissent la membrane basale : les cellules cancéreuses acquièrent donc très précocement leurs caractères d'invasivité ;
- tous les sous-clones d'une tumeur dérivent d'une cellule transformée primordiale, originelle, qui donnera naissance au cancer ;

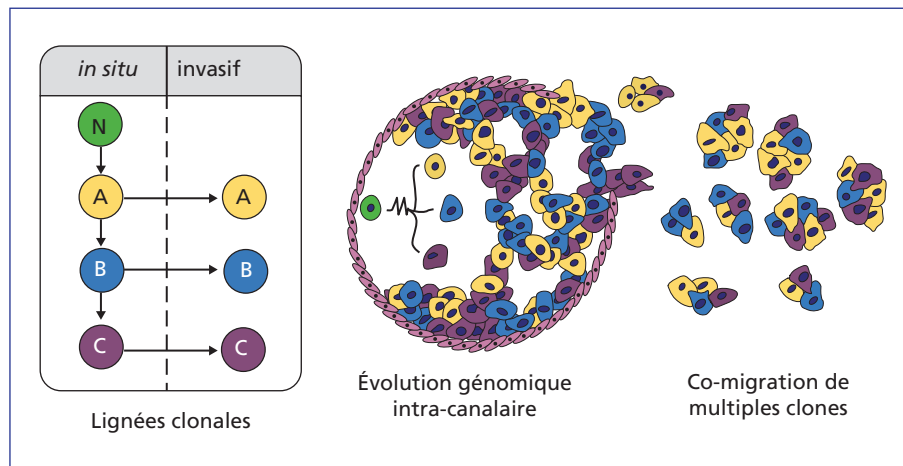


Figure 3. Invasion multiclonale dans le cancer du sein précoce. Différents clones évoluent en situation intracanaulaire *in situ*, à partir d'une cellule originelle, puis se disséminent dans la glande mammaire en franchissant la membrane basale.

Figure 3. Multiclonal invasion in early breast cancer. In *in situ* ductal carcinoma, different clones evolve from an original cell and then spread in the mammary gland by crossing the basal membrane.

- un ou plusieurs sous-clones présents dans les canalicules sont capables de franchir la membrane basale, réalisant ainsi une invasion multiclonale de la glande mammaire (*figure 3*). Il n'y a pas de « goulot évolutif » postulé par le modèle n°2, ni d'indépendance clonale postulée par le modèle n°1, contrairement à ce que des travaux antérieurs avaient suggéré. Reste à savoir si chaque sous-clone *in situ* possède des capacités invasives, ou si la membrane basale étant endommagée par un seul sous-clone, les autres en profitent, ou encore s'il existe une coopération entre les génotypes de plusieurs sous-clones *in situ* pour

franchir la membrane basale. Reste à savoir aussi quelle est la contribution de l'épigénome tumoral et stromal à l'ensemble des propriétés invasives : le séquençage de l'ARN sur cellules isolées et l'établissement de profils épigénomiques pourront permettre d'avancer encore plus loin dans la compréhension de l'oncogenèse mammaire précoce.

*Casasent AK, Schalck A, Gao R, et al. Multiclonal invasion in breast tumors identified by topographic single cell sequencing. *Cell* 2018 ; 172 : 205-17. doi: 10.1016/j.cell.2017.12.007

Jacques Robert

Tout savoir sur le transport des médicaments anticancéreux vers la cellule tumorale*

Véhiculer les médicaments anticancéreux jusqu'au site de leur action, la cellule tumorale, est un vieux rêve déjà poursuivi par Paul Ehrlich en 1900 et qui ne s'est jamais réalisé. Des milliers d'articles, concernant des centaines de véhicules potentiels de médicaments, ont été publiés avec un optimisme déconcertant, et pourtant le nombre de formulations ayant abouti à une mise sur le marché dans le domaine du cancer est ridiculement faible. Liposomes, nanoparticules, polymères, conjugués les plus divers et les plus audacieux ont été proposés avec une constance enthousiaste pour aboutir le plus souvent à un échec. En 2018, nous disposons de trois formulations liposomales d'anthracyclines, que l'on peut prescrire dans les leucémies et certains cancers du sein, et d'un conjugué du paclitaxel avec l'albumine, autorisé pour le traitement des cancers du pancréas. Les seules véritables réussites sont et continueront d'être les conjugués de certaines toxines (trop dangereuses pour être administrées sous forme libre) avec des anticorps dirigés contre des récepteurs membranaires spécifiques.

Peut-être est-il nécessaire, pour comprendre les raisons de cet échec global, de comprendre la façon dont les médicaments anticancéreux sont transportés du courant sanguin où ils sont injectés. Ian Tannock a longuement travaillé cette question et a publié une remarquable revue voici plus de dix ans [1] ; Dewhirst & Secomb renouvellent l'exercice dans le dernier numéro de 2017 de *Nature Reviews Cancer*. Ils dressent tout d'abord la liste des facteurs cruciaux pour que les médicaments atteignent leur cible, en distinguant les petites molécules (poids moléculaire inférieur à 1000 Da), les grosses molécules (essentiellement les anticorps et autres protéines), et les systèmes nanoparticulaires. On se rend compte aussitôt que ces derniers ont plus d'obstacles à franchir que les petites molécules : perméabilité des microvaisseaux, taille des pores vasculaires, pression interstitielle, densité de la matrice extracellulaire, tous ces facteurs interviennent pour ralentir le transport des nanoparticules et pas celui des

petites molécules. Les systèmes particuliers partent avec un lourd handicap, et l'on serait surpris qu'ils atteignent plus difficilement leurs cibles que les formes libres ?

On ne peut résumer une revue générale comme un article ; disons simplement que le lecteur trouvera dans cette revue toutes les définitions et toutes les descriptions des phénomènes physiques, chimiques et biologiques liées à la diffusion et à la convection des molécules et des particules. Les travaux déjà anciens du groupe de Jain [2-4] restent toujours d'actualité. Pour améliorer la distribution des médicaments anticancéreux aux tumeurs, les auteurs ne donnent que peu de pistes réalistes, essentiellement l'inhibition de l'angiogenèse, pour laquelle nous avons déjà de bons outils ; la rupture de la matrice extracellulaire par des hyaluronidases ou des collagénases ; la réduction de la pression interstitielle par normalisation vasculaire... obtenue à l'aide des anti-angiogéniques ou par hyperthermie. Le concept de normalisation du micro-environnement tumoral reste, semble-t-il, le seul qui puisse déboucher sur de réelles applications pratiques, de façon plus efficace que la manipulation de la formulation des molécules actives.

*Dewhirst MW, Secomb TW. Transport of drugs from blood vessels to tumor tissue. *Nat Rev Cancer* 2017 ; 17 : 738-50. doi : 10.1038/nrc.2017.93

RÉFÉRENCES

1. Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer* 2006 ; 6 : 583-92.
2. Jain RK. Delivery of novel therapeutic agents in tumors : physiological barriers and strategies. *J Natl Cancer Inst* 1989 ; 81 : 570-6.
3. Jain RK. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev* 2001 ; 46 : 149-68.
4. Jain RK. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. *J Clin Oncol* 2013 ; 31 : 2205-18. doi : 10.1200/JCO.2012.46.3653

Jacques Robert

Les combinaisons de médicaments anticancéreux sont-elles bénéfiques parce qu'elles permettent d'atteindre plus de patients ou plus de cellules malignes chez chaque patient ?*

Il est admis de longue date que les combinaisons de médicaments anticancéreux sont plus efficaces que les mono-chimiothérapies parce qu'elles permettent d'exploiter les phénomènes d'additivité ou de synergie entre médicaments. On associe le plus souvent des médicaments de mécanismes d'action différents, un agent alkylant et un antimétabolite par exemple, avec l'idée que chacun agira sur des cellules différentes (ou dans un état physiologique distinct), leur effet étant alors additif en raison de l'hétérogénéité intratumorale ; ou avec l'idée que l'un facilitera le travail de l'autre, leur effet étant alors synergique. De nombreux exemples peuvent être cités, pas toujours convaincants : sur le plan mécanistique, on pourrait s'attendre à une synergie entre méthotrexate et paclitaxel, le premier synchronisant les cellules tumorales pour augmenter leur sensibilité au second au moment de l'entrée en mitose ; mais cela n'a jamais été observé en clinique. En revanche, la combinaison entre un inhibiteur de BRAF et un inhibiteur de MEK apparaît synergique en première analyse.

L'hétérogénéité inter-tumorale, c'est-à-dire entre patients cancéreux, est également bien connue ; on sait, en particulier depuis les travaux fondateurs du groupe de Bert Vogelstein [1], que la diversité des tumeurs est extrême. Chaque tumeur individuelle présente une « histoire naturelle » qui lui est propre ; dans le panel de 11 cancers du sein et de 11 cancers colorectaux, aucune tumeur n'avait plus de six mutations d'un « gène de cancer » en commun avec une autre tumeur. On peut donc postuler que les tumeurs qui ne répondent pas à un des médicaments de la combinaison répondront à l'autre si les déterminants de la réponse sont distincts d'un patient à l'autre. Les deux médicaments de la combinaison n'interagissent pas entre eux mais agissent indépendamment ; l'hétérogénéité inter-tumorale présuppose l'indépendance des composants de la combinaison.

Il serait utile de pouvoir déterminer si une combinaison donnée de médicaments anticancéreux est plus efficace parce qu'elle permet une interaction entre ces médicaments (additivité, synergie) au niveau des tumeurs traitées, ou parce qu'elle permet d'atteindre des tumeurs de fonds génétique distinct au niveau d'une population de patients : cela permettrait d'optimiser les combinaisons existantes, d'interpréter les résultats de certains essais cliniques ou de susciter le *design* de combinaisons originales. Pour apporter des réponses à cette question, les auteurs ont utilisé trois approches :

- l'analyse d'essais cliniques de mono- et de polychimiothérapie ;
- l'analyse des données obtenues sur des tumeurs humaines fraîches transplantées chez la souris (*patient-derived xenografts*, PDX) ;
- la modélisation de la réponse tumorale dans des populations hétérogènes.

La *figure 1* présente les résultats de survie sans progression de patients atteints de mélanome malin traités soit par la combinaison ipilimumab (anti-CTLA4)-nivolumab (anti-PD1), soit par chacun des anticorps séparément [2], en superposition avec les résultats de la modélisation de la combinaison en supposant l'indépendance de chaque médicament, et en introduisant le fait que les réponses puissent être partiellement corrélées entre elles (cette corrélation signifie que les deux médicaments ont des mécanismes d'action apparentés et que les déterminants de leur activité sont partiellement communs). Il apparaît clairement que la modélisation selon l'indépendance d'action (ni additivité, ni synergie), avec un coefficient de corrélation ρ de 0,25, reproduit parfaitement le résultat de l'essai clinique. Dans l'essai clinique de la combinaison, on avait donc prescrit *de facto* à chaque patient le médicament auquel il aurait le mieux répondu si on avait pu l'identifier *a priori*... C'est donc la variabilité inter-patient qui est responsable du bénéfice en survie sans progression obtenu, et lorsque l'on pourra identifier avant traitement les patients répondeurs à chaque inhibiteur de *checkpoint*, il ne sera plus utile de les associer.

Je ne dévoilerai pas la totalité des résultats obtenus par les auteurs lors de l'analyse théorique des résultats de nombreux essais cliniques ou d'expérimentations sur PDX. Nombre de combinaisons réputées synergiques sont parfaitement compatibles avec l'hypothèse d'indépendance ; outre celle de l'ipilimumab avec le nivolumab dans le mélanome malin, que j'ai analysée, on peut citer celle de la chimiothérapie combinée à l'olaparib dans les cancers de l'ovaire, au trastuzumab dans les cancers du sein ou à l'erlotinib dans les cancers du pancréas, et même la combinaison anti-BRAF-anti-MEK dans les mélanomes malins¹ (*figure 2*). En revanche, la combinaison de la chimiothérapie au bévacizumab est clairement synergique dans les cancers du côlon et de l'ovaire, de même que la combinaison du 5-fluorouracile à l'oxaliplatine dans les cancers du pancréas...

Il nous faut sans doute repenser la polychimiothérapie et développer activement les recherches sur les déterminants moléculaires de l'activité des médicaments anticancéreux, cytotoxiques ou ciblés : une monothérapie pourrait avoir autant d'efficacité qu'une polythérapie, à condition de la prescrire au bon patient et à lui seul... La *figure 3* résume les conclusions de l'article.

*Palmer AC, Sorger PK. Combination cancer therapy can confer benefit via patient-to-patient variability without drug additivity or synergy. *Cell* 2017 ; 171 : 1678-91. doi : 10.1016/j.cell.2017.11.009

¹ Mais cette dernière n'est pas utilisée pour des raisons de synergie apparente, mais parce qu'elle permet d'éviter la stimulation paradoxale de la voie des MAP kinases lors de l'inhibition de la protéine BRAF mutée en V600E.

RÉFÉRENCES

1. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 2006 ; 314 : 268-74.

2. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015 ; 373 : 23-34. doi : 10.1056/NEJMoa1504030

Jacques Robert

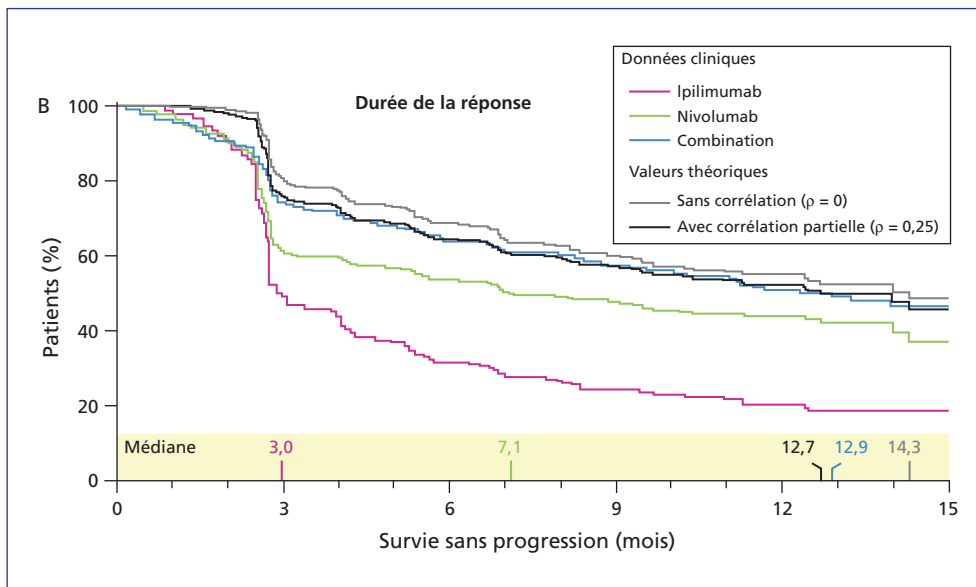


Figure 1. Courbes de survie sans progression lors de l’essai clinique de l’ipilimumab seul, du nivolumab seul et de leur combinaison dans le traitement des mélanomes malins [2]. En superposition les courbes théoriques obtenues pour une combinaison des deux molécules dont l’action serait indépendante l’une de l’autre, non corrélées entre elles ou partiellement corrélées entre elles ($r = 0,25$).

Figure 1. Survival without progression during clinical trials of ipilimumab alone, nivolumab alone, and their combination as treatment for malignant melanomas [2]. Superimposed theoretical curves are presented for a combination of the two molecules; for independent, non- correlated, or partially correlated action ($r=25$).

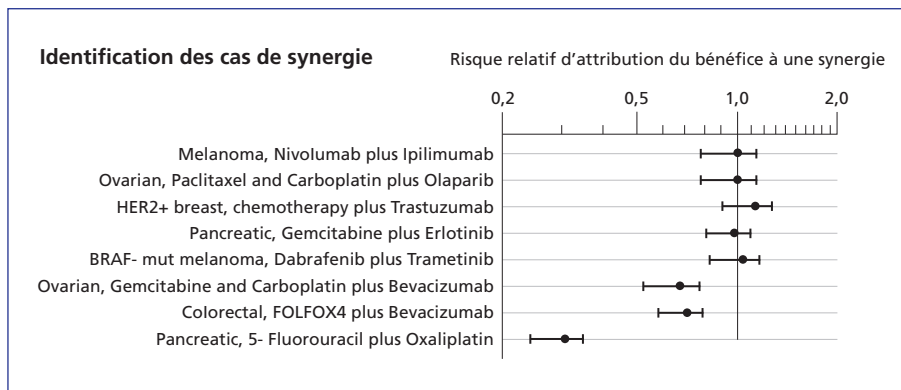


Figure 2. Bénéfice de la combinaison de deux médicaments dans une combinaison, présentés sous forme du risque relatif qu’il soit attribué à une synergie par rapport à une simple action indépendante. Seules les trois dernières combinaisons apparaissent synergiques.

Figure 2. The benefits of two drugs in combined drug treatments according to relative risk based on synergy from independent action. Only the last three combinations appear to be synergistic.

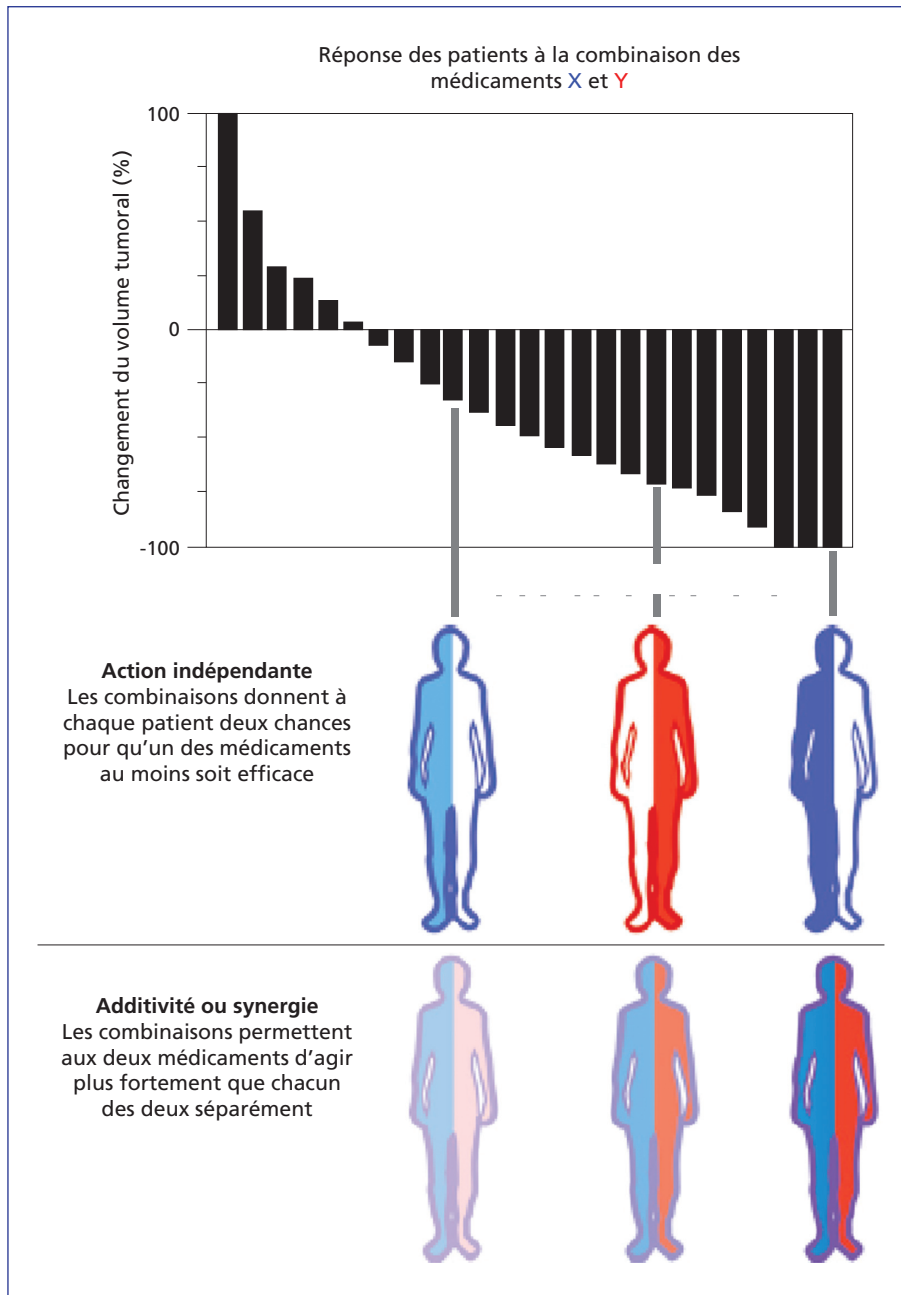


Figure 3. Représentation schématique des résultats de l'article. La supériorité d'une combinaison par rapport à une monothérapie peut résulter de deux mécanismes : les deux médicaments peuvent agir de façon additive ou synergique pour induire des réponses plus fortes chez les patients ; ou les deux médicaments, d'action indépendante, peuvent recruter davantage de patients répondeurs, les uns parce qu'ils sont sensibles au premier médicament, les autres parce qu'ils sont sensibles au second.

Figure 3. Schematic representation of the results of the article. The superiority of a combination relative to monotherapy may be due to two mechanisms: the two treatments may act in an additive or synergistic way to induce stronger responses in patients; or the two treatments, acting independently, may lead to more responsive patients being recruited, some because they are sensitive to the first treatment and others to the second.