

► Des avancées majeures révèlent l'hétérogénéité intra-tumorale des cancers d'origine épithéliale, incluant des cellules initiatrices de tumeurs qui ressemblent aux cellules souches adultes. Les cellules souches normales et tumorales partagent en effet leur plasticité entre phénotypes épithéliaux et mésenchymateux, progressant par une série d'états intermédiaires, réversibles. Si un cœur de régulateurs (Snail, Zeb, ...) est bien connu pour déclencher la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), les facteurs OvoL/Shavenbaby sont récemment apparus comme des stabilisateurs épithéliaux. La balance entre facteurs pro-TEM et OvoL pourrait ainsi réguler la plasticité phénotypique et le potentiel métastatique des tumeurs. Nous abordons cette question chez la drosophile, un modèle pour disséquer *in vivo* la fonction de Shavenbaby. Nos travaux montrent que Shavenbaby est un régulateur clé de l'homéostasie des cellules souches adultes. Shavenbaby est indispensable à leur survie, agissant en interaction directe avec la voie Hippo pour protéger les cellules souches de la mort cellulaire programmée. ◀

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) intervient à différentes étapes du développement embryonnaire (gastrulation, crêtes neurales, somitogénèse, ...) et aussi chez l'adulte, par exemple pour la cicatrisation [1]. Cette transition phénotypique réduit l'adhérence entre cellules épithéliales et favorise la migration invasive (Figure 1A). La TEM est bien connue pour contribuer à l'agressivité des cancers d'origine épithéliale, ou carcinomes, notamment les cancers du sein, du poumon, de la prostate ou colorectaux, etc. [1, 2]. La TEM déclenche la dissociation des cellules de la tumeur primaire et facilite leur migration, l'intravasation, et leur dissémination vers des sites distants pour former des métastases. Une transition réciproque de l'état

Les facteurs OvoL Des régulateurs clés de la plasticité épithélium-mésenchyme et des cellules souches

Alexandra Mancheno-Ferris^{1,2}, Cédric Polesello^{1,2},
François Payre^{1,2}



¹Centre de Biologie du Développement, Université Paul Sabatier Toulouse III, Bâtiment 4R3, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.
²CNRS, UMR5547, Centre de Biologie du Développement, Toulouse, France.
francois.payre@univ-tlse3.fr

mésenchymateux vers des propriétés épithéliales, ou transition mésenchymo-épithéliale (TME), favorise ensuite la formation de macro-métastases (Figure 1B), largement responsables de la morbidité des cancers [1, 2].

Plasticité phénotypique entre épithélium et mésenchyme

Des travaux récents montrent que les transitions entre phénotypes épithéliaux et mésenchyme (TEM et TME) n'agissent pas comme de simples « interrupteurs » entre deux types cellulaires alternatifs [2, 3]. Au contraire, ces transitions progressent par une série d'états intermédiaires, où les cellules présentent des propriétés mixtes entre propriétés épithéliale (E) et mésenchymateuse (M), appelés états hybrides E/M (Figure 1A). Remarquablement, l'existence de ces états hybrides permet une réversibilité des transitions entre caractères épithéliaux et mésenchymateux. On parle ainsi de plasticité épithélio-mésenchymateuse, un paramètre sans doute fondamental pour la progression tumorale et l'échappement aux thérapies [2, 3]. Élucider comment ces états intermédiaires se forment et se remodelent en fonction du microenvironnement représente aujourd'hui un enjeu majeur en cancérologie.

Les facteurs OvoL dans la plasticité épithélio-mésenchymateuse et les cancers

Les nombreuses études réalisées depuis la découverte de la TEM ont permis l'identification des facteurs déclenchant le passage de l'état épithélial à l'état mésenchymateux [1]. Ces facteurs pro-TEM regroupent des facteurs de transcription (Snail, Slug, Zeb1, Zeb2, Twist, ...) et leurs micro-ARN régulateurs (*miR200*, ...). Ensemble, ces facteurs vont promouvoir l'état mésenchymateux et inhiber les

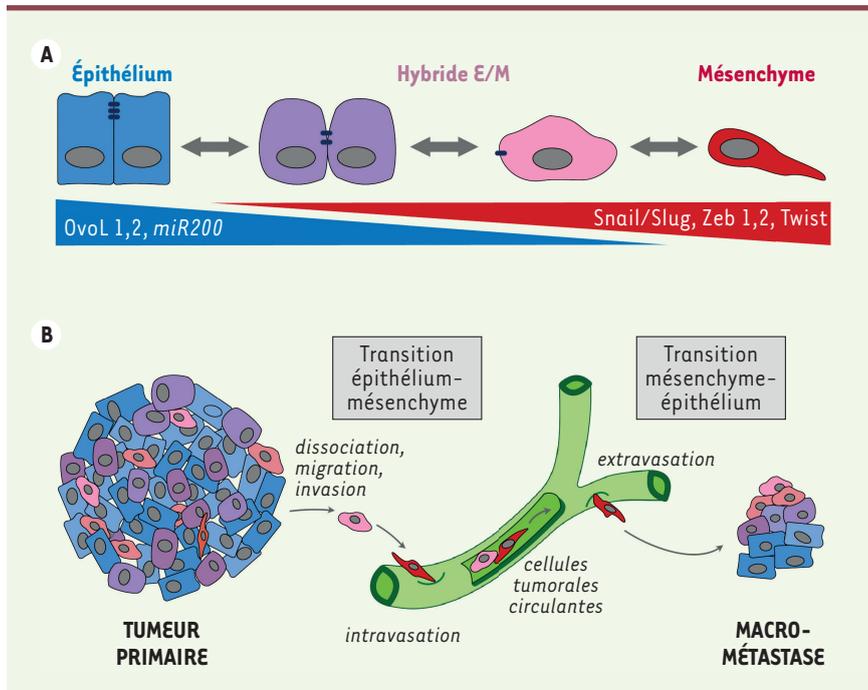


Figure 1. Plasticité épithélium-mésenchyme et progression tumorale. **A.** Les transitions de l'état épithélial à l'état mésenchymateux (de gauche à droite), ou l'inverse (de droite à gauche), passent par une série d'états intermédiaires réversibles caractérisés par des phénotypes hybrides épithélio-mésenchymateux (E/M). Ces transitions résultent des différentes activités de facteurs de transcription : Snail/Slug, Zeb1,2 et Twist qui déclenchent la TEM, et les facteurs OvoLs qui stabilisent l'état épithélial. **B.** La transition épithélio-mésenchymateuse favorise la dissociation, migration, l'invasion, l'intravasation et l'extravasation des cellules tumorales. Quand elles atteignent des organes distants, ces cellules cancéreuses engagent une transition mésenchymo-épithéliale, qui accroît leur potentiel prolifératif, pour former des tumeurs secondaires.

propriétés épithéliales, par exemple en réprimant l'expression de la E-cadhérine, un composant essentiel des jonctions cellulaires [1, 2]. Plus récemment, des facteurs qui, au contraire, stabilisent l'état épithélial, viennent d'être identifiés ; en particulier, la famille des facteurs de transcription Ovo-Like (OvoL1/3) [1, 2] est conservée chez tous les animaux et ses membres vont contrebalancer l'activité des facteurs pro-TEM [4]. Les niveaux relatifs entre facteurs pro-TEM d'une part, et facteurs OvoLs d'autre part, pourraient ainsi réguler et/ou stabiliser les états hybrides E/M (Figure 1A). Le profilage systématique des tumeurs relie en effet l'expression des facteurs OvoL au potentiel métastatique des carcinomes [4]. D'une manière générale, la réduction de l'expression des facteurs OvoL dans les tumeurs primaires est de très mauvais pronostic. La réexpression artificielle d'une isoforme spécifique du facteur OvoL2 permet d'inhiber la formation de métastases dans des souris greffées avec des cellules de tumeurs mammaires dérivées de patients [5]. Cependant, des travaux de profilage de cellules uniques montrent que les tumeurs secondaires ré-expriment les gènes épithéliaux, ainsi que l'influence à la fois du microenvironnement et de l'infiltration des macrophages sur les transitions entre épithélium et mésenchyme [6]. Il est donc important de comprendre la fonction et le mode d'action des facteurs OvoL *in vivo*. Chez les vertébrés, l'existence de trois gènes paralogues (OvoL1-3) aux fonctions souvent redondantes, codant chacun différentes isoformes, complexifie malheureusement leur étude fonctionnelle.

La drosophile pour étudier la fonction des facteurs OvoL

Bien connue pour son apport à la compréhension des mécanismes de l'hérédité et du développement, la drosophile (*Drosophila melanogaster*)

devient désormais un modèle fécond pour l'étude des altérations génétiques conduisant aux tumeurs [7]. Le génome de la drosophile code un seul gène OvoL, *ovo/shavenbaby* (*svb*), le membre fondateur de la famille. Ce gène code trois isoformes protéiques : OvoA et B, qui sont essentielles au développement de la lignée germinale, et la forme somatique Shavenbaby (Svb), qui gouverne la différenciation épithéliale des cellules épidermiques [8, 9].

L'expression de *svb* est régulée par une large région cis-régulatrice qui intègre de nombreuses voies de signalisation et facteurs de transcription [8]. Svb est traduit sous la forme d'un long répresseur de transcription (SvbREP). La protéine Svb est ensuite partiellement dégradée par le protéasome (Figure 2), conduisant à la libération d'une forme courte qui agit comme activateur de transcription (SvbACT) [10, 11]. Cette maturation post-traductionnelle est induite par les peptides Polished-rice (Pri), fondateurs d'une nouvelle famille de micro-peptides régulateurs traduits à partir d'ARN apparemment non-codants [12]. Dans l'épiderme embryonnaire, SvbACT va induire l'expression d'une batterie de gènes cibles, codant des régulateurs du cytosquelette, des jonctions cellulaires, de la matrice extracellulaire, etc. [13], expliquant son rôle dans le remodelage épithélial.

Shavenbaby contrôle l'homéostasie des cellules souches adultes

Chez l'adulte, nous venons de découvrir l'expression spécifique de Svb dans les cellules souches digestives,

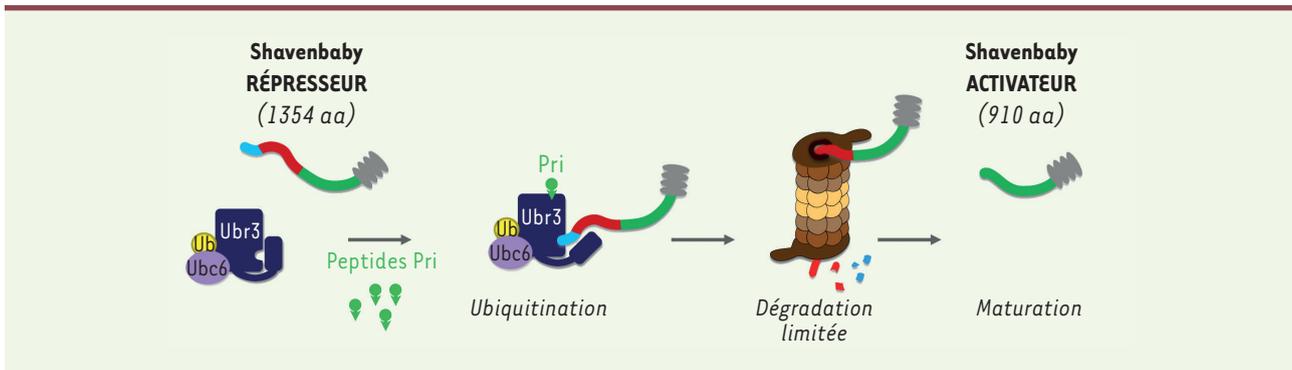


Figure 2. Processus de maturation post-traductionnelle de Shavenbaby. La liaison des micro-peptides Pri à l'ubiquitine ligase Ubr3 permet la fixation du complexe Ubc6/Ubr3 (enzyme de conjugaison E2 et ubiquitine ligase E3) sur la région N-terminale de SvbREP (cyan), conduisant à son ubiquitination, ainsi que la dégradation de la région répresseur (rouge) par le protéasome. Cette maturation produit une protéine tronquée, SvbACT, qui est un activateur de transcription. La région activatrice de la protéine Svb est représentée en vert, le domaine de liaison à l'ADN, en gris.

regroupant cellules souches intestinales et rénales. Les cellules souches digestives de la drosophile ont permis d'identifier de nouveaux facteurs et mécanismes (influence de la nutrition, des infections bactériennes,...), dont l'importance a été par la suite démontrée chez l'homme [7].

Nos travaux montrent que Svb est essentiel à la maintenance des cellules souches adultes [14]. Nous nous sommes d'abord focalisés sur les cellules souches rénales qui sont quiescentes, ce qui permet une analyse quantitative de l'ensemble du compartiment souche (Figure 3A). Les cellules souches digestives sont caractérisées par un phénotype hybride E/M et expriment le cœur des facteurs pro-TEM, *i.e.*, Escargot, Zfh1 (les équivalents respectifs de Snail, Zeb chez la drosophile) dont l'expression est régulée négativement par le micro-ARN *miR8* (l'équivalent de *miR200*) [15]. La surexpression de *miR8* suffit à provoquer la disparition des cellules souches qui se différencient massivement en cellules épithéliales [15], montrant l'importance des régulateurs pro-TEM pour le maintien des cellules souches. Si l'inactivation de Svb aboutit aussi à la disparition des cellules souches (Figure 3B), elle n'induit cependant pas leur différenciation précoce mais déclenche leur élimination par apoptose. On voit ainsi que les facteurs pro-TEM et le facteur épithélial Svb n'agissent pas par simple antagonisme, mais au contraire collaborent pour assurer l'homéostasie des cellules souches. Comme au cours du développement, le contrôle post-traductionnel de Svb, effectué par les peptides Pri, est déterminant pour les cellules souches adultes. Ainsi, le blocage de la maturation de Svb conduit à la disparition des cellules souches rénales, qui meurent par apoptose.

Shavenbaby interagit avec la voie Hippo

Nos travaux démontrent que, dans les cellules couches adultes, Svb interagit fonctionnellement avec la voie de signalisation Hippo, un régulateur clé de la survie cellulaire. Le médiateur nucléaire de la voie Hippo est la protéine Yorkie (YAP/TAZ, chez les mammifères), qui doit se lier à des facteurs de transcription pour réguler l'expression génique [16]. L'analyse bio-informatique des profils de fixation à la chroma-

tine (ChIP-seq) a permis de montrer que Svb et Yorkie partagent environ 30% de leurs sites de liaison génomique [14]. Remarquablement, l'ADN des gènes cibles de Svb responsables de la différenciation de l'épiderme [9, 13] n'est pas liés par Yorkie. Réciproquement, les séquences des gènes régulés par Yorkie pour contrôler la croissance cellulaire [16] ne sont pas fixées par Svb, suggérant que Svb/Yorkie interagissent spécifiquement pour la maintenance des cellules souches. En effet, nous montrons que les protéines Svb et Yorkie s'associent physiquement pour former un complexe nucléaire qui va directement notamment activer dans les cellules souches l'expression du gène *DIAP-1* (Figure 3C), codant l'inhibiteur majeur de l'apoptose.

Ces résultats établissent l'importance *in vivo* des facteurs OvoL/Svb pour le maintien du caractère « souche », et montrent comment chaque isoforme influe positivement ou négativement sur les cellules souches tumorales. La voie Hippo est impliquée dans différents cancers, et YAP/TAZ interagit aussi avec les facteurs pro-EMT [16] soulignant les relations intimes entre les différents régulateurs de la plasticité épithélio-mésenchymateuse. Nos travaux chez la drosophile aident ainsi à mieux comprendre les mécanismes de survie des cellules souches cancéreuses et de leur résistance aux traitements. Ils ouvrent aussi de nouvelles pistes pour le diagnostic et les thérapies anticancéreuses ciblées. Si, aux premiers stades des cancers épithéliaux, l'inhibition de la TEM peut prévenir l'invasion (par exemple en stimulant l'expression des facteurs OvoL), il faut au contraire inhiber la ré-acquisition des propriétés épithéliales des tumeurs secondaires. Nos résultats montrant le rôle clé des facteurs OvoL dans l'organisation épithéliale et la survie cellulaire renforcent l'intérêt de leur ciblage thérapeutique.

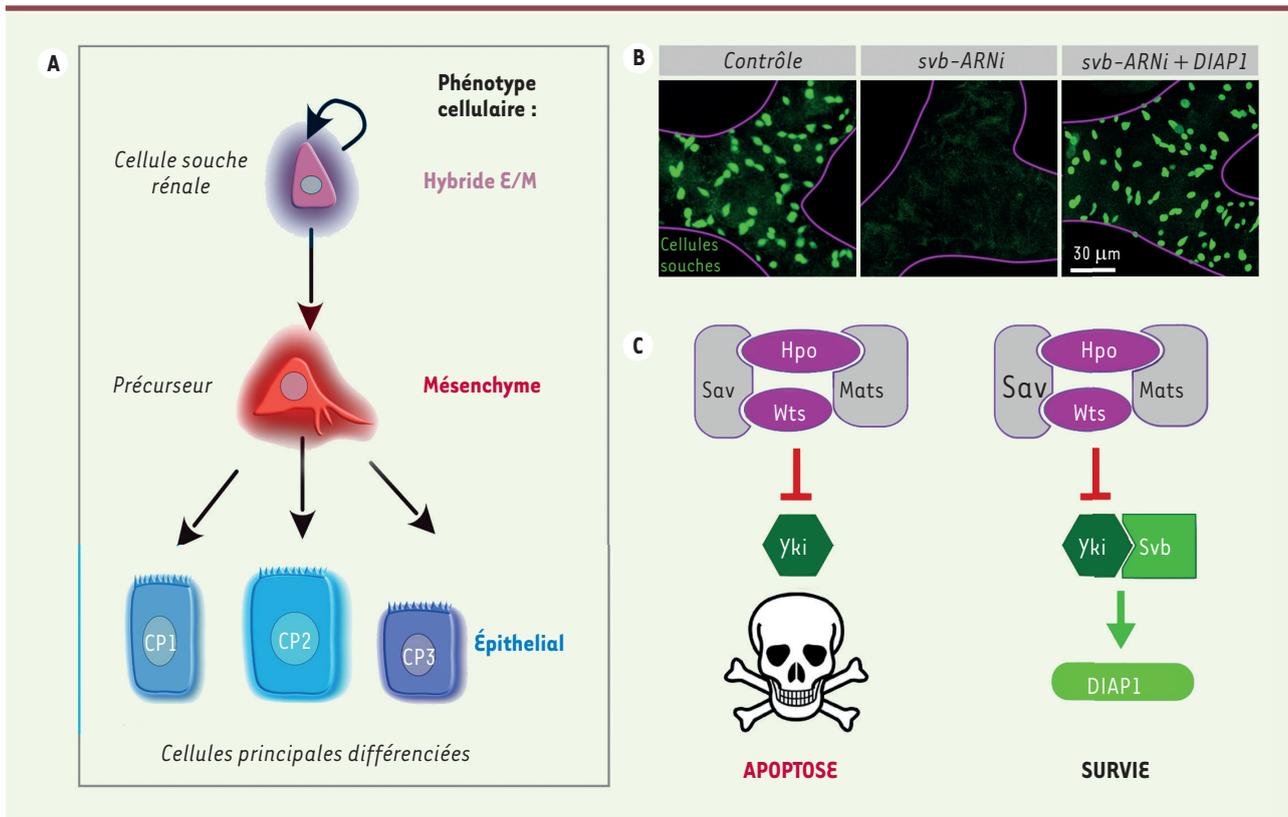


Figure 3. Svb protège les cellules souches rénales de l'apoptose. **A.** Les cellules souches adultes rénales présentent un phénotype hybride E/M. Elles assurent leur autorenouveau et la production d'un précurseur transitoire mésenchymateux, qui va migrer et se différencier en différentes cellules épithéliales principales (CP1,2,3). **B.** Images de microscopie montrant la disparition des cellules souches rénales (marquées par la GFP [green fluorescent protein], en vert) suite à l'inactivation de Shavenbaby par ARN interférent (ARNi). La restauration concomitante de l'expression de l'inhibiteur d'apoptose DIAP1 suffit à la survie des cellules souches. **C.** Mode d'action du complexe Svb/Yorkie (Yki) pour activer l'expression de DIAP1 et, ainsi, la maintenance des cellules souches. Hpo, Hippo ; Sav, Salvador ; Wts, Warts ; Mats, Mob as tumor suppressor.

Futures directions

Une caractéristique des facteurs OvoL est la production de multiples isoformes, présentant des activités différentes, voire antagonistes, y compris dans la progression tumorale [5]. Éclaircir la fonction des facteurs OvoL nécessitera donc de comprendre l'impact respectif de chaque isoforme sur la plasticité épithéliale, le contrôle des cellules souches, saines et cancéreuses. Grâce à l'accumulation des connaissances et l'utilisation d'outils génétiques bien maîtrisés chez cette espèce, la drosophile pourrait aider à percer les mécanismes respectifs des isoformes OvoL répresseur et activateur. Nous avons entrepris une combinaison d'approches de génomique fonctionnelle et de bioinformatique pour identifier le mode d'action moléculaire de chaque isoforme sur la régulation de l'expression du génome des cellules souches. Par ailleurs, nous analysons à l'échelle du génome entier les relations réciproques entre OvoL/Shavenbaby et les facteurs de remodelage de la chromatine, dont on découvre le rôle dans la plasticité épithélio-mésenchymateuse et les tumeurs [2]. Ces approches intégratives devraient fournir un nouvel éclairage sur les mécanismes

reliant plasticité épithélio-mésenchymateuse et la dynamique des cellules souches cancéreuses, et permettre d'identifier les meilleurs régulateurs à cibler, en fonction des différents stades de cancers, pour une médecine personnalisée. ♦

SUMMARY

OvoL factors: a family of key regulators of epithelium mesenchyme plasticity and stem cells

Most prevalent cancers are of epithelial origin and their morbidity often results from secondary tumors. Cancer aggressiveness relates to intratumoral heterogeneity, including rare tumor initiating cells that share many features with adult stem cells. Both normal and cancer stem cells are characterized by their plasticity between epithelial and mesenchymal phenotypes, progressing through a series of reversible intermediates. While a core of regulators (Snail, Zeb1-2,...) is renowned to promote epithelial to mesenchyme transition (EMT),

OvoL/Shavenbaby factors now emerge as a family of key epithelial stabilizers. Therefore, pro-EMT and OvoL/Shavenbaby transcription factors could provide a molecular rheostat to control stemness and epithelial-mesenchyme plasticity. We address this question in flies, in which the unique OvoL/Shavenbaby factor offers a powerful *in vivo* paradigm for functional analyses. Our results show that Shavenbaby is critical for adult stem cell homeostasis, and directly interacts with the Hippo pathway to protect stem cells from death. \diamond

REMERCIEMENTS

Ces travaux sont soutenus par la Ligue contre le cancer (Allocation Doctorale), la Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20170336739) et l'Agence Nationale de la Recherche (ChronoNet).

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. Emt: 2016. *Cell* 2016 ; 166 : 21-45.
2. Gupta PB, Pastushenko I, Skibinski A, et al. Phenotypic plasticity: driver of cancer initiation, progression, and therapy resistance. *Cell Stem Cell* 2019 ; 24 : 65-78.
3. Lu W, Kang Y. Epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression and metastasis. *Dev Cell* 2019 ; 49 : 361-74.
4. Jia D, Jolly MK, Boareto M, et al. OVOL guides the epithelial-hybrid-mesenchymal transition. *Oncotarget* 2015 ; 6 : 15436-48.
5. Watanabe K, Villarreal-Ponce A, Sun P, et al. Mammary morphogenesis and regeneration require the inhibition of EMT at terminal end buds by Ovo2 transcriptional repressor. *Dev Cell* 2014 ; 29 : 59-74.
6. Pastushenko I, Brisebarre A, Sifrim A, et al. Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature* 2018 ; 556 : 463-8.
7. Singh SR, Aggarwal P, Hou SX. Cancer stem cells and stem cell tumors in *Drosophila*. *Adv Exp Med Biol* 2019 ; 1167 : 175-90.
8. Payre F, Vincent A, Carreno S. ovo/svb integrates Wingless and DER pathways to control epidermis differentiation. *Nature* 1999 ; 400 : 271-5.
9. Chanut-Delalande H, Hashimoto Y, Pelissier-Monier A, et al. Pri peptides are mediators of ecdysone for the temporal control of development. *Nat Cell Biol* 2014 ; 16 : 1035-44.
10. Kondo T, Plaza S, Zanet J, et al. Small peptides switch the transcriptional activity of Shavenbaby during *Drosophila* embryogenesis. *Science* 2010 ; 329 : 336-9.
11. Zanet J, Benrabah E, Li T, et al. Pri sORF peptides induce selective proteasome-mediated protein processing. *Science* 2015 ; 349 : 1356-8.
12. Plaza S, Menschaert G, Payre F. In search of lost small peptides. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2017 ; 33 : 391-416.
13. Menoret D, Santolini M, Fernandes I, et al. Genome-wide analyses of Shavenbaby target genes reveals distinct features of enhancer organization. *Genome Biol* 2013 ; 14 : R86.
14. Bohere J, Mancheno-Ferris A, Al Hayek S, et al. Shavenbaby and Yorkie mediate Hippo signaling to protect adult stem cells from apoptosis. *Nat Commun* 2018 ; 9 : 5123.
15. Antonello ZA, Reiff T, Ballesta-Illan E, Dominguez M. Robust intestinal homeostasis relies on cellular plasticity in enteroblasts mediated by miR-8-Escargot switch. *EMBO J* 2015 ; 34 : 2025-41.
16. Manning SA, Kroeger B, Harvey KF. The regulation of Yorkie, YAP and TAZ: new insights into the Hippo pathway. *Development* 2020 ; 147: dev179069.

TIRÉS À PART

A. Mancheno-Ferris



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