

Apport de l'analyse protéomique dans la mise en évidence de 14-3-3 sigma comme suppresseur de tumeur

En complément de l'analyse génomique, les méthodes de l'analyse protéomique élaborées ces dernières années (le terme protéomique a été proposé en 1995) permettent maintenant d'étudier l'ensemble des protéines exprimées par le génome d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe donné (*voir* revue dans [1]). L'approche protéomique peut se décomposer en trois grandes phases (*m/s* 2001, n° 5, p. 609). Dans une première étape, l'électrophorèse bidimensionnelle permet de séparer avec une haute résolution l'ensemble des protéines obtenues à partir d'extraits tissulaires ou cellulaires. L'identification des protéines séparées et la mise en évidence de leurs modifications post-traductionnelles peuvent ensuite être réalisées grâce à la spectrométrie de masse, applicable à des quantités infimes de protéines séparées. Enfin, l'utilisation de la bio-informatique permet une étude quantitative du niveau des protéines et la constitution de banques de données. Dans la pratique, malgré les difficultés de sa réalisation, l'analyse protéomique est maintenant un outil puissant pour étudier les changements quantitatifs (niveau d'expression) et qualitatifs (modifications post-traductionnelles) des protéines en situation pathologique.

Nous avons ainsi utilisé l'analyse protéomique pour l'étude des modifications moléculaires associées au cancer du sein [2]. Dans ce travail, nous avons réalisé une analyse du protéome des cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses en culture ainsi que de biopsies de tumeurs mammaires. Les profils protéomiques de ces échantillons ont été obtenus par électrophorèse bidimensionnelle, et l'analyse différentielle a

ensuite permis de mettre en évidence que la principale modification dans les profils protéomiques de cellules cancéreuses du sein concerne la molécule chaperon 14-3-3 sigma. En effet, le niveau d'expression de cette protéine était 10 fois moins importante dans les cellules de cancer du sein que dans les cellules mammaires normales, et son niveau apparaît très faible dans les biopsies de cancer du sein. De façon complémentaire, en utilisant les méthodes de la génomique, Ferguson *et al.* [3] ont démontré une hyperméthylation du gène codant pour 14-3-3 sigma dans les cellules de cancer du sein. L'hyperméthylation du gène de 14-3-3 sigma entraîne une extinction de sa transcription dans les cellules de cancer du sein, qui, selon ces auteurs, constituerait à ce jour l'altération moléculaire la plus importante décrite dans le cancer du sein. De façon intéressante, l'analyse protéomique indique que la protéine 14-3-3 sigma est en fait présente dans les cellules cancéreuses de sein, bien que son transcrit ne soit plus détectable, ce qui démontre bien le haut niveau de sensibilité atteint par l'analyse protéomique. En définitive, l'ensemble de ces données illustre la complémentarité des approches de la génomique et de la protéomique pour la mise en évidence de modifications moléculaires caractéristiques d'une pathologie.

Les 14-3-3 constituent une famille de protéines chaperon de structure très conservée, qui sont présentes dans toutes les cellules eucaryotes [4]. La forme sigma des 14-3-3, initialement identifiée sous le nom de HME1 (*human mammary epithelial element*) dans les cellules épithéliales mammaires [5] et sous le nom de strati-

fine dans les kératinocytes [6], serait spécifique des cellules constituant les épithéliums. Depuis, 14-3-3 sigma a également été trouvée dans les cellules de cancer de la vessie [7], du foie [8] et son rôle dans les processus de contrôle de la croissance cellulaire a été précisé. L'implication de cette protéine dans le processus tumoral était suggérée à l'époque par le fait que son ARNm était présent en quantité moindre dans les cellules transformées (de la peau et du sein) que dans les cellules non transformées [5, 6]. Ainsi, 14-3-3 sigma est contrôlée par le gène suppresseur p53 et sa surexpression dans la cellule se traduit par un blocage du cycle cellulaire au niveau de la transition G2/M et donc par un arrêt de la prolifération cellulaire [9]. De plus, les cellules déficientes en 14-3-3 sigma ne peuvent maintenir l'arrêt du cycle et meurent lors de leur entrée en mitose [10]. Enfin, Laronga *et al.* [11] ont récemment montré que 14-3-3 sigma s'associe aux kinases dépendantes de cyclines (cdks) et inhibe leur activité promotrice de la croissance cellulaire. La surexpression expérimentale de 14-3-3 sigma dans les cellules cancéreuses se traduit par une inhibition de la prolifération et de la capacité des cellules à se multiplier sans ancrage, ce qui démontre que cette protéine a une capacité de réversion du phénotype tumoral.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux indique que l'analyse protéomique est une approche pertinente pour la recherche et l'identification de nouveaux marqueurs en cancérologie, au même titre que les approches de la génomique. La démonstration que 14-3-3 sigma règle négativement la prolifération cellu-

laire et que son niveau est diminué dans les cancers du sein, indique que cette protéine peut être considérée comme un nouveau suppresseur de tumeur, ce qui justifie l'évaluation de son intérêt clinique.

1. Joubert-Caron R, Caron M. Protéome et analyse protéomique: de nouveaux concepts pour de nouveaux champs d'applications biomédicales. *Med Sci* 1999; 15: 701-5.
2. Vercoutter-Edouart AS, Lemoine J, et al. Proteomic analysis reveals that 14-3-3 sigma is down-regulated in human breast cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61:76-80.
3. Ferguson AT, Evron E, Umbricht CB, et al. High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 6049-54.
4. Aitken A. 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways. *Trends Cell Biology* 1996; 6: 341-7.
5. Prasad GL, Valverius EM, McDuffie E, Cooper HL. Complementary DNA cloning of a novel epi-

- thelial cell marker protein, HME1, that may be down-regulated in neoplastic mammary cells. *Cell Growth Differ* 1992; 3: 507-13.
6. Leffers H, Madsen P, Rasmussen HH, et al. Molecular cloning and expression of the transformation sensitive epithelial marker stratifin. *J Mol Biol* 1993; 231: 982-98.
 7. Ostergaard M, Rasmussen HH, Nielsen HV, et al. Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: identification of markers that define their degree of differentiation. *Cancer Res* 1997; 57: 4111-7.
 8. Iwata N, Yamamoto H, Sasaki S, et al. Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 sigma gene in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2000; 19: 5298-302.
 9. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, et al. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1997; 1: 3-11.
 10. Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3 sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 1999; 401: 616-20.
 11. Laronga C, Yang HY, Neal C, Lee MH. Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *J Biol Chem* 2000; 275: 23106-12.

Hubert Hondermarck
Anne-Sophie Vercoutter-Edouart

UPRES-EA 1033, Université des sciences et technologies de Lille, 59655 Villeneuve-d'Ascq, France.

Jérôme Lemoine

UMR-8576 de l'Université des sciences et technologies de Lille, 59655 Villeneuve-d'Ascq, France.

Jean-Philippe Peyrat

Laboratoire d'oncologie moléculaire humaine, Centre de lutte contre le cancer Oscar-Lambret de Lille, 59020 Lille Cedex, France.

■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■ **Quand le protéasome est débordé par les tâches.** Un défaut de l'activité du protéasome est depuis quelque temps fortement soupçonné de jouer un rôle majeur dans la mort neuronale induite par l'expression de gènes mutés, codant pour des protéines mal conformées du fait de l'extension d'une chaîne de polyglutamines (voir [1] et *m/s* 2001, n°1, p.125). Ron Kopito et ses collaborateurs (Stanford University, CA, États-Unis) apportent un argument important à l'appui de cette hypothèse en démontrant la capacité de telles protéines à bloquer l'activité du protéasome de façon durable [2]. Ces auteurs ont tout d'abord créé un marqueur vital de l'activité du protéasome en introduisant dans les cellules une construction associant un signal déclenchant l'ubiquitinylation, et donc la dégradation par le protéasome, et la protéine fluorescente

GFP (GFP^u). La GFP^u est normalement dégradée en moins de 30 minutes dans les cellules, mais le blocage du protéasome (par la lactacystine) permet son maintien d'une façon dépendante de la dose, ce qui fait de la fluorescence GFP un marqueur inversement proportionnel à l'activité du protéasome. Armés de ce fluorochrome conditionnel, les auteurs ont transfecté les cellules avec des constructions codant pour des protéines anormales, le mutant $\Delta F508$ de *CFTR* (*cystic fibrosis membrane conductance regulator*), ou une *huntingtine* mutée contenant 103 répétitions CAG. Dans les deux cas, l'expression des gènes mutés a conduit à des accumulations de protéines agrégées, et à la diminution nette de l'activité du protéasome, illustrée par le maintien d'une forte fluorescence GFP. Les auteurs privilégient, sans pouvoir la démontrer toutefois,

l'hypothèse d'une séquestration du protéasome, incapable de dégrader les protéines mutées mais, en même temps, incapable d'arrêter de le tenter pour s'occuper de ses autres substrats et les laissant donc s'accumuler. Quel que soit le mécanisme précis, ces résultats confortent clairement l'idée que, plutôt que de ne rechercher qu'une intervention directe des protéines mutées dans les voies de mort cellulaires [3], il faut aussi s'intéresser de façon plus générale au dysfonctionnement qu'elles peuvent induire indirectement. Cela, toutefois, ne facilitera sans doute pas la recherche de voies thérapeutiques.

[1. Fernandez-Funez P, et al. *Nature* 2000; 408: 101-6.]

[2. Bence NF, et al. *Science* 2001; 292: 1552-5.]

[3. Brouillet E, et al. *Med Sci* 2000; 16: 57-63.]