

Une dérégulation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine impliquée dans l'hépatocarcinogénèse

Bien que l'étiologie des cancers du foie soit assez bien connue (infections virales par les virus de l'hépatite (B ou C), cirrhoses alcooliques ou intoxications par des carcinogènes [1]), les mécanismes moléculaires qui conduisent à la transformation tumorale sont encore mal identifiés. Nous avons récemment montré qu'une dérégulation de la voie de signalisation relayée par la β -caténine serait un des mécanismes fréquemment utilisés lors de la transformation tumorale de la cellule hépatique, ce qui constitue une avancée majeure dans la compréhension de la physiopathologie de cette maladie [2].

Voie de signalisation relayée par la β -caténine

La voie de transmission du signal Wnt (homologue de Wingless chez la drosophile) relayée par la β -caténine est essentielle au cours du développement embryonnaire mais aussi dans le contrôle de la prolifération cellulaire chez l'adulte ; elle est particulièrement bien conservée dans tout le règne animal (pour revue voir [3]). Or on a montré récemment qu'elle est dérégulée dans plusieurs types de cancérogénèse. En effet, des mutations activatrices de cette voie ont été caractérisées dans 90 % des cancers du côlon [3-5] et dans 25 % des mélanomes [6].

La β -caténine est une molécule multifonctionnelle capable à la fois de contrôler l'adhérence cellulaire et de participer à la transmission du signal relayé par les facteurs de la famille Wingless-Wnt [3, 7, 8]. Dans la cellule, elle est associée aux complexes d'adhérence impliquant les cadhé-

rines, mais elle est aussi présente, sous forme libre, dans le cytoplasme et le noyau, où elle joue un rôle-clé dans la signalisation relayée par les facteurs de la famille Wnt. En effet, le modèle actuel proposé pour la β -caténine comme molécule de signalisation est le suivant : le pool de β -caténine libre est finement contrôlé, les facteurs Wnt favorisent son accumulation, et le gène suppresseur de tumeur APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) participe à sa dégradation [8]. Lorsque la β -caténine libre s'accumule, elle est capable, en association avec les facteurs de transcription de la famille TCF (*T-cell factor*)/LEF (*lymphoid enhancer factor*), de contrôler l'expression de gènes cibles impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose. Le contrôle du taux de β -caténine libre est post-traductionnel, impliquant la phosphorylation de son domaine amino-terminal par la kinase GSK3 [9] : quand la protéine est phosphorylée, elle est prise en charge par le système ubiquitine/protéasome et est dégradée [10]. Le rôle d'APC dans ce système de dégradation n'est pour l'instant pas très clair. En présence d'un signal de prolifération relayé par Wnt, l'activité de la kinase GSK3 est inhibée, la β -caténine n'est pas phosphorylée, elle s'accumule et permet donc, en association au TCF/LEF, l'émission du signal de prolifération (*figure 1*).

Mutations de la β -caténine et cancérogénèse

Or une dérégulation de cette signalisation vient d'être mise en évidence dans la cancérogénèse colorectale [4, 5]. En effet, une mutation au niveau

du gène APC est un événement essentiel de la tumorigénèse intestinale, survenant à la fois dans les formes familiales (FAP ou polyposes coliques), et dans les formes sporadiques (où plus de 80 % des cas présentent une mutation du gène APC [11]). La très grande majorité des mutations de ce gène conduit à une protéine tronquée qui n'est plus capable de dégrader la β -caténine ; ces mutations aboutissent donc à une accumulation de β -caténine libre capable d'émettre un signal de prolifération continu. De plus, dans les cas de cancers colorectaux où APC n'est pas muté, des mutations activatrices du gène de la β -caténine ont été fréquemment observées qui concernent toutes le domaine de phosphorylation par la GSK3. Ce sont, soit des délétions, soit des mutations ponctuelles, affectant un des acides aminés cibles de la phosphorylation. Des mutations similaires ont été décrites dans des lignées de mélanomes humain [6].

Des mutations activatrices sont fréquemment observées dans les hépatocarcinomes

Notre objectif général est de caractériser, par une approche d'oncogénèse ciblée, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'hépatocarcinogénèse ; pour cela nous utilisons différents modèles de souris transgéniques créées au laboratoire, programmées pour développer des hépatocarcinomes [12, 13]. Chez ces souris transgéniques, le nodule tumoral acquiert des propriétés particulières caractéristiques de la transformation néoplasique : une résistance à l'apoptose induite par un anticorps

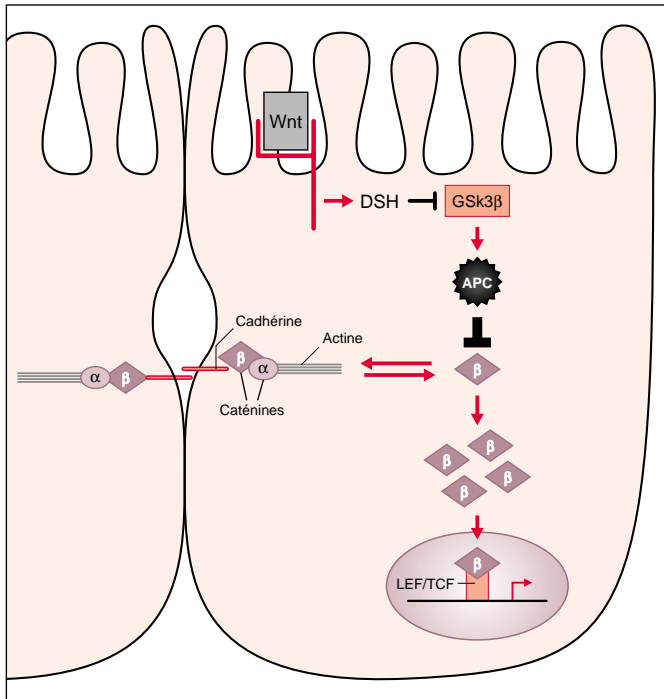


Figure 1. **Voie de transmission du signal Wnt/β-caténine.** Dans le complexe d'adhérence la β-caténine sert de relai entre les cadhérines et le cytosquelette d'actine. Présente sous forme libre dans le cytoplasme et le noyau, elle joue un rôle-clé dans la transmission du signal relayé par les facteurs de la famille Wnt. Les différents acteurs de cette voie de signalisation sont : une famille de récepteurs (les récepteurs Frizzled) et, du côté intracellulaire, une molécule DSH (dishevelled) dont le rôle serait, en réponse à un signal relayé par Wnt, d'inhiber l'activité de la kinase GSK3β. Quand la β-caténine est phosphorylée par GSK3β, elle est prise en charge par le système ubiquitine/protéasome et est dégradée. Lorsque la β-caténine libre s'accumule, elle est capable, en association avec les facteurs de transcription de la famille TCF (T-cell factor)/LEF (lymphoid enhancer factor), de contrôler l'expression de gènes cibles impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose. Le pool de β-caténine libre serait ainsi très finement contrôlé : les facteurs Wnt favorisent son accumulation, et le produit du gène suppresseur de tumeur APC participe à sa dégradation. Des mutations activatrices de cette voie ont été décrites dans différents types de cancérogenèse et impliquent, soit des mutations d'APC avec perte de fonction, soit des mutations activatrices de la β-caténine.

agoniste de Fas, et une importante reprise de la prolifération. Bclx₁ est surexprimé, ce qui pourrait en partie expliquer l'acquisition de la résistance à l'apoptose (résultats non publiés). Étudiant le rôle oncogénique de la β-caténine, *in vivo*, au niveau de l'épithélium intestinal, dans ces modèles de souris transgéniques, nous avons constaté que le ciblage dans le foie d'une forme activée de β-caténine conduisait à une reprise de la prolifération dans ce tissu. Cela nous a donc amené à examiner si n'apparaissaient pas, au

cours de la transformation tumorale dans ces modèles murins d'hépatocarcinomes, de mutations activatrices du gène de la β-caténine. Cette hypothèse s'est révélée effectivement correcte. Des mutations activatrices du gène de la β-caténine correspondant, soit à des délétions éliminant le domaine de phosphorylation par la GSK3β, soit à des mutations ponctuelles touchant un des acides aminés cibles de cette phosphorylation (figure 2), sont observées dans 50 % des tumeurs développées dans nos modèles d'hépatocarci-

nomes murins résultant de l'expression, soit de l'oncogène *Myc*, soit de l'oncogène *H-Ras*. Les délétions sont majoritairement des délétions éliminant l'exon 2 (qui dans le gène murin code en partie pour le site de phosphorylation de la GSK3β). Nous avons pu mettre aussi en évidence de courtes délétions internes à l'exon 2 qui éliminent tout ou partie de ce site de phosphorylation, ainsi que de grandes délétions impliquant à la fois le site de phosphorylation et le site de liaison à l'α-caténine. Les mutations ponctuelles que nous avons mises en évidence impliquent non seulement les différents acides aminés cibles de la GSK3β, mais aussi ceux encadrant l'acide aminé S33 (figure 2B). Il est intéressant de noter que cette région est conservée dans toute les membres de la famille β-caténine/Armadillo, et qu'il est aussi présent dans les protéines IκBβ, soumises au même système de contrôle, la dégradation par le protéasome après phosphorylation et ubiquitinylation (figure 2B).

La fréquence élevée des délétions nous a fait rechercher le même phénomène dans les hépatocarcinomes humains. Nous avons ainsi pu mettre en évidence ce même type de mutations dans 26 % des hépatocarcinomes humains que nous avons analysés [2]. Ce résultat montre qu'une dérégulation de la voie β-caténine est un événement très fréquemment sélectionné au cours de l'hépatocarcinogénèse et implique pour la première fois la voie Wnt/β-caténine dans ce type de tumorigénèse. Il est maintenant important de savoir si une dérégulation de cette voie, de façon similaire à ce qui est observé pour le cancer colorectal, est un événement essentiel dans la tumorigénèse hépatique, impliquant alors la recherche de mutations d'autres partenaires de cette voie. APC ne semble pas être un bon candidat car la fréquence des hépatocarcinomes n'est pas plus élevée chez les patients atteints de polyposis familiale colique que dans la population générale, et des pertes alléliques au niveau du chromosome 5 ne sont pas non plus observées fréquemment dans les hépatocarcinomes. Cependant, le nombre de plus en plus impressionnant de partenaires

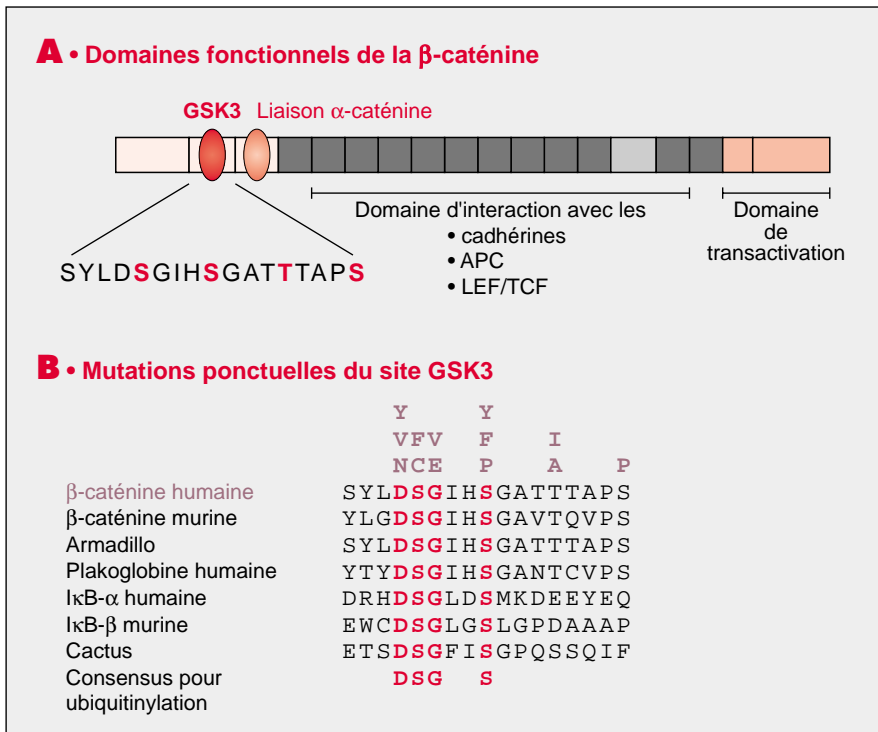


Figure 2. **Mutations activatrices de la β -caténine et cancérogénèse.** **A.** Les différents domaines fonctionnels de la β -caténine. Sur ce schéma est représenté le site de phosphorylation par la GSK3 β , le domaine de liaison à l' α -caténine, le domaine central composé de domaines Armadillo permettant l'interaction de la β -caténine avec tous ses partenaires, et le domaine carboxy-terminal qui comporterait un domaine de transactivation. Les mutations activatrices sont, soit des délétions éliminant tout ou une partie du site de phosphorylation, soit des mutations ponctuelles affectant un des acides aminés cibles, notés en rouge dans la séquence consensus. **B.** Mutations ponctuelles activatrices de la β -caténine. Sur ce schéma sont représentées les différentes mutations ponctuelles (en bistre) que nous avons mises en évidence dans les hépatocarcinomes murins et humains. La séquence du site de phosphorylation de la β -caténine humaine est comparée à la séquence de différents membres de la famille β -caténine/Armadillo, ainsi qu'au site de phosphorylation des protéines I κ B β . Armadillo est l'homologue de la β -caténine chez la drosophile, et la protéine Cactus est l'homologue de la protéine I κ B β chez la drosophile.

de cette voie actuellement décrits, en font autant de candidats potentiels.

Une dérégulation de la voie de transmission du signal Wnt/ β -caténine est vraisemblablement un événement essentiel de nombreux processus de carcinogénèse. L'identification des gènes cibles de cette voie est donc un enjeu majeur tant sur le plan fondamental pour comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu au cours de cette transformation tumo-

rale, que sur le plan thérapeutique, car ces gènes cibles seront autant de cibles potentielles ■

Alix de la Coste
Béatrice Romagnolo
Christine Perret

Inserm U. 129, ICGM, CHU Cochin, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

RÉFÉRENCES

- Buendia MA. Hepatitis B viruses and hepatocellular carcinoma. *Adv Cancer Res* 1992; 59: 167-226.
- de la Coste A, Romagnolo B, Billuart P, et al. Somatic mutations of the β -catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 (sous presse).
- Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997; 11: 3286-305.
- Korinek V, Barker N, Morin PJ, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 1997; 275: 1784-7.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997; 275: 1787-90.
- Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 1996; 272: 1023-6.
- Bellaïche Y, Perrimon N. La voie de signalisation Wntless chez la drosophile. *Med Sci* 1997; 13: 166-74.
- Romagnolo B. APC, β -caténine et cancer: les diaboliques. *Med Sci* 1997; 13: 872-3.
- Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* 1996; 10: 1443-54.
- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 1997; 16: 3797-804.
- Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-70.
- Cartier N, Miquerol L, Tulliez M, et al. Diet-dependent carcinogenesis of pancreatic islets and liver in transgenic mice expressing oncogenes under the control of the L-type pyruvate kinase gene promoter. *Oncogene* 1992; 7: 1413-22.
- Gilbert E, Morel A, Tulliez M, et al. *In vivo* effects of activated H-ras oncogene expressed in the liver and urogenital tissues. *Int J Cancer* 1997; 73: 749-56.

TIRÉS À PART

A. de la Coste.