

Si les peptides en feuille de trèfle protègent l'intégrité des muqueuses digestives, l'un d'eux est aussi suppresseur de tumeurs gastriques : preuves à l'appui *in vivo* !

Deux stratégies sont particulièrement précieuses pour établir, voire découvrir, la fonction biologique d'une protéine *in vivo* : surexprimer la protéine par expression d'un transgène intégré dans le génome et, à l'opposé, éteindre la synthèse de la protéine par invalidation sélective du gène d'intérêt. Aujourd'hui, c'est au tour des gènes codant pour des peptides en « feuille de trèfle » de subir l'intervention chirurgicale invalidante des biologistes moléculaires. Récemment présentés dans ce journal (*m/s* n° 6/7, vol. 12, p. 846), ces peptides sécrétés par le tractus gastro-intestinal constituent une famille de molécules caractérisées par la présence dans leur structure de domaine(s) P, constitué(s) de trois boucles intrachâînes reconstituées en feuille de trèfle par l'intermédiaire de trois ponts disulfures. Grâce à leur structure compacte, ces peptides ont l'avantage d'être résistants au milieu acide et à l'action protéolytique des enzymes abondantes dans la région luminale gastro-intestinale. Si on pense que les trois principaux membres de cette famille, pS2, ITF (*intestinal trefoil factor*) et SP (*spasmolytic peptide*), sont impliqués dans la réparation intestinale ou gastrique, leurs fonctions et leur mode d'action restent énigmatiques à de nombreux égards. Une première réponse a été apportée récemment avec la surexpression du gène *hpS2* (*human pS2*) dans l'épithélium intestinal de souris, intervention ayant pour conséquences importantes une protection accrue de la muqueuse intestinale vis-à-vis d'un agent « agressif » [1]. Aujourd'hui, deux pas importants viennent d'être franchis avec la parution conjointe dans la revue *Science* de

deux rapports de laboratoires français et américain ayant réalisé respectivement l'invalidation des gènes *mpS2* et *mITF* chez la souris [2, 3]. Dans la première étude, l'absence de synthèse de pS2 n'a aucune conséquence détectable sur la vie embryonnaire, ni même sur l'apparence, le comportement et la fertilité de souris de cinq mois [2]. Comme le révèle une analyse histologique étendue (*figure 1*), nombreux sont les tissus épargnés par

la manipulation génétique : le cerveau, le cœur, le poumon, le foie, le pancréas, la rate, le muscle, la glande mammaire, le côlon, le testicule, l'ovaire, l'utérus et le rein. A la fois attendus et inattendus, en revanche, sont les effets de l'invalidation de *mpS2* sur l'estomac et l'intestin grêle des souris mutantes. Attendus parce que ces deux tissus sont des cibles potentielles de pS2, et inattendus parce que les altérations histologiques

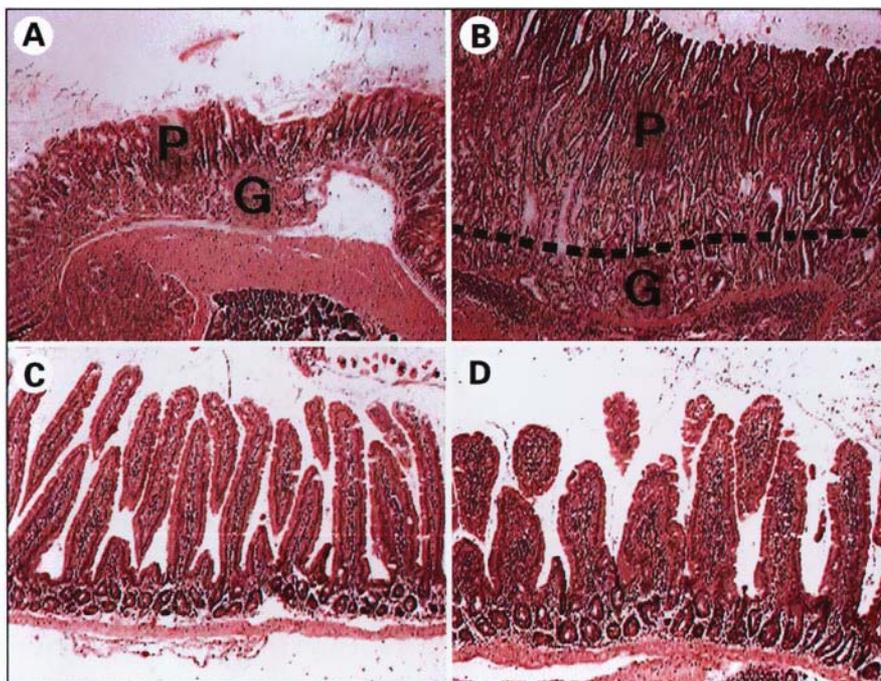


Figure 1. **Analyse histologique de tissus gastriques et intestinaux de souris *mpS2*^{+/+} et *mpS2*^{-/-} âgées de 5 mois.** A, B. Glandes (G) et cryptes (P : pits) d'une section de l'antrum chez les souris *mpS2*^{+/+} (A) et *mpS2*^{-/-} (B). Chez la souris *mpS2*^{-/-}, on observe, à la périphérie de l'adénome, une hyperplasie sévère et un allongement important des cryptes gastriques. C, D. Sections d'intestin grêle de souris *mpS2*^{+/+} (C) et *mpS2*^{-/-} (D). Chez la souris *mpS2*^{-/-}, la muqueuse intestinale s'est fortement épaissie, des cellules inflammatoires sont apparues. Au niveau de l'épithélium de surface, les villosités restent quasiment indemnes.

observées au niveau de l'antré et du pylore, en particulier, révèlent la formation d'adénocarcinomes. En premier lieu, c'est un phénotype à pénétrance constante (observé chez toutes les souris homozygotes *mpS2*^{-/-} des deux sexes) qui caractérise l'invalidation de *mpS2*: chez les animaux de trois semaines, la muqueuse gastrique a subi un épaississement important qui apparaît, à cinq mois, sous la forme d'un adénome circulaire particulièrement développé affectant toute la muqueuse antropylorique. Alors que les glandes gastriques conservent leur apparence, la muqueuse présente une hyperplasie sévère accompagnée d'un allongement des cryptes gastriques. Les cellules épithéliales (en surface et le long des cryptes) sont fortement dysplasiques, perdent leur polarité, se différencient et ne synthétisent plus de mucus. Dans la partie supérieure de l'adénome, la formation de ponts interglandulaires perturbe sensiblement l'architecture glandulaire. Enfin, encore plus spectaculaire est l'apparition, dans 30 % des cas, de foyers carcinomateux au centre des adénomes, conduisant à des déformations glandulaires importantes, et à la migration de cellules épithéliales vers les couches profondes de la muqueuse. Si l'estomac est l'organe le plus atteint par l'invalidation de *mpS2*, l'intestin grêle est également affecté. Bien qu'aucune altération histologique ne soit observée chez les souris de trois semaines, à cinq mois la situation a évolué singulièrement: la muqueuse intestinale interne s'est fortement épaissie, des cellules inflammatoires (lymphocytes, plasmocytes et macrophages) sont apparues, et on observe davantage de lymphocytes intra-épithéliaux. Au niveau de l'épithélium de surface, en revanche, les villosités restent indemnes et les cellules épithéliales (absorbantes et à mucus) conservent leur état de différenciation et leur fonction. Une autre conséquence de l'invalidation de *mpS2* à laquelle on pouvait s'attendre concerne SP, le frère de pS2 par sa structure en feuille de trèfle, synthétisé normalement au niveau de l'estomac, du duodénum et du pancréas. Ainsi, alors que toutes les souris *mpS2*^{-/-} synthétisent toujours SP au niveau pancréatique, seule une sur trois est encore capable de synthétiser

le peptide gastrique. Le troisième peptide de la famille, ITF, bien que d'origine intestinale, n'est pas altéré. L'ensemble de ces résultats démontre clairement que le gène *mpS2* joue un rôle essentiel dans le programme de différenciation de la muqueuse gastrique (au niveau de l'antré et du pylore tout au moins), mais pourrait agir aussi en tant que gène suppresseur de tumeur dans le tissu gastrique. Cette hypothèse est confortée non seulement par le phénotype observé chez la souris *mpS2*^{-/-}, mais également par la perte de l'expression de *hpS2* dans 50 % des cancers gastriques ou par la détection de transcrits aberrants dans certaines tumeurs. Dans le cas de l'intestin, en revanche, *pS2* ne semble jouer aucun rôle au cours de l'ontogenèse, mais protège efficacement l'intégrité de la muqueuse digestive. La réponse lymphoproliférative locale, développée chez les souris qui ne synthétisent plus pS2, témoigne du rôle protecteur et réparateur du peptide *in vivo*, observation corroborée par la surexpression de *hpS2* au cours de la régénération tissulaire dans des affections intestinales inflammatoires aussi fréquentes que l'ulcère duodéal ou la maladie de Crohn.

C'est un tout autre tableau clinique que présentent les souris *ITF*^{-/-} après invalidation génique de *mITF* par recombinaison homologue [3]. Tout d'abord, la production des deux frères structuraux de ITF, pS2 et SP, n'est pas du tout modifiée. Ensuite, l'épithélium colique, qui synthétise le peptide, est morphologiquement et fonctionnellement intact. Enfin, les souris *ITF*^{-/-} se développent normalement, sans retard de croissance ni désordres gastro-intestinaux. Ce tableau *a priori* sans tache s'assombrit lorsque l'on s'intéresse au mécanisme de réparation tissulaire que ITF est censé contrôler, processus nécessitant la migration de l'épithélium intestinal vers la surface muqueuse. Ainsi, alors que les cellules en cours de prolifération au fond des cryptes sont normalement destinées à migrer vers la surface épithéliale et à se différencier, chez les souris *ITF*^{-/-}, les cellules cryptiques bien qu'étant le siège d'une plus grande activité proliférative, restent « bloquées » au fond des cryptes intestinales. Plus sévère encore est la

perte de la capacité de l'épithélium colique de lutter contre les effets ulcéralisants du DSS (*dextran sulfate sodium*). Cet agent administré dans la boisson des animaux pendant 9 jours affecte de façon dramatique les souris *ITF*^{-/-}, qui perdent davantage de poids et pour la moitié d'entre elles sont sujettes à des diarrhées sanglantes et meurent (contre 10 % chez les souris témoins). Au niveau du côlon, et uniquement chez les souris *ITF*^{-/-}, des sites multiples d'ulcération hémorragique, plus nombreux dans la partie distale, sont observés. Chez les souris témoins, ces altérations sont modérées et nettement en voie de guérison. Le rôle de ITF sur le processus de réparation de l'épithélium digestif a pu être définitivement établi après administration rectale du peptide recombinant à des souris *ITF*^{-/-} ayant subi l'action corrosive de l'acide acétique. En effet, l'augmentation de la migration épithéliale et l'atténuation importante des lésions observées chez les souris traitées témoignent de la mise en route tout à fait efficace du processus de réparation. L'ensemble de ces données établit sans ambiguïté le rôle protecteur et réparateur de l'ITF sur l'intégrité de la barrière intestinale. Outre la participation supposée du système immunitaire dans la protection et la réparation des muqueuses digestives, ces deux études d'invalidation génique établissent définitivement le rôle des peptides en feuille de trèfle dans ces processus. Compte tenu de ces observations, la mise en œuvre d'une thérapie efficace utilisant les peptides en feuilles de trèfle ne paraît pas complètement utopique pour traiter les affections gastro-intestinales.

**B.A.
M.C.R.**

1. Playford RJ, Marchbank T, Goolad RA, Chinery RA, Poulson R, Hanby AM, Wright NA. Transgenic mice that overexpress the human trefoil peptide pS2 have an increased resistance to intestinal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2137-42.
2. Lefebvre O, Chenard MP, Masson R, Linares J, Dierich A, LeMeur M, Wendling C, Tomasetto C, Chambon P, Rio MC. Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil peptide. *Science* 1996; 274: 259-62.
3. Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, Fishman MC. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* 1996; 274: 262-5.