

## CDK4, cible thérapeutique des adénocarcinomes pulmonaires porteurs d'une mutation de l'oncogène KRAS

Pierre Dubus

EA2406, Histologie et pathologie moléculaire des tumeurs, Université de Bordeaux 2, 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France ; Laboratoire de biologie des tumeurs, Hôpital du Haut Lévêque, CHU de Bordeaux, 33604 Pessac, France. [pierre.dubus@u-bordeaux2.fr](mailto:pierre.dubus@u-bordeaux2.fr)



### Thérapie ciblée des adénocarcinomes pulmonaires

La compréhension de la biologie des cancers a permis l'émergence de thérapies à la carte, ciblées en fonction du profil moléculaire de la tumeur [15]. La recherche de mutations du gène *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) [1] fait partie de l'arbre thérapeutique décisionnel de prise en charge des adénocarcinomes pulmonaires et peut déboucher sur la prescription d'inhibiteurs de tyrosines kinases comme le Gécitinib (Iressa) ou l'Erlotinib (Tarceva). La mise en évidence dans 20 à 30 % des cas d'une mutation activatrice de *KRAS* reste un facteur d'exclusion de ces thérapies ciblées [16].

### KRAS, une cible pharmacologique difficile

La protéine KRAS est une GTPase recrutée à la membrane après activation de divers récepteurs par des stimulus extracellulaires. La forme activée, KRAS-GTP va réguler de multiples fonctions cellulaires comme la division, la mobilité, l'apoptose, la transcription, la traduction, l'adhésion, l'endocytose et le trafic intracellulaire (pour revue, voir [2]). Dans les cancers, les mutations du gène *KRAS* touchent préférentiellement les codons 12 et 13 et ont pour conséquence une très forte réduction de l'activité GTPase. De fait, la protéine oncogénique se présente sous sa forme KRAS-GTP constitutivement active. Sur le plan pharmacologique, il est plus facile d'obtenir des inhibiteurs d'une activité enzymatique que de restaurer une acti-

tivité défaillante, telle l'activité GTPase. Ainsi des approches indirectes ciblées sur les régulateurs et les effecteurs en aval de *KRAS* sont activement recherchées.

### Modèles précliniques de tumeurs pulmonaires associées à une mutation de *Kras*

L'équipe de Mariano Barbacid a développé un modèle murin *Kras<sup>+/LSLV12Ggeo</sup>; RERT<sup>ert/ert</sup>* [3] permettant une activation conditionnelle et post-natale de la mutation *Kras<sup>G12V</sup>* dans un petit nombre de cellules afin de modéliser un événement moléculaire retrouvé dans de nombreux cancers humains, tels que les carcinomes pancréatiques, coliques et pulmonaires (Figure 1). Plusieurs mois après l'activation de l'oncogène *Kras*, ces souris développent exclusivement des tumeurs pulmonaires de type adénomes et adénocarcinomes conduisant à leur mort [3]. Ces animaux constituent un modèle préclinique de cancérogenèse pulmonaire d'intérêt pour l'évaluation de thérapies ciblant la signalisation de l'oncogène *KRAS* : on peut citer l'inactivation de la CAAX farnésyltransférase<sup>1</sup> [4] ou l'inhibition des kinases RAF, MEK et ERK.

### Les kinases dépendantes des cyclines (CDK), cibles thérapeutiques potentielles en oncologie

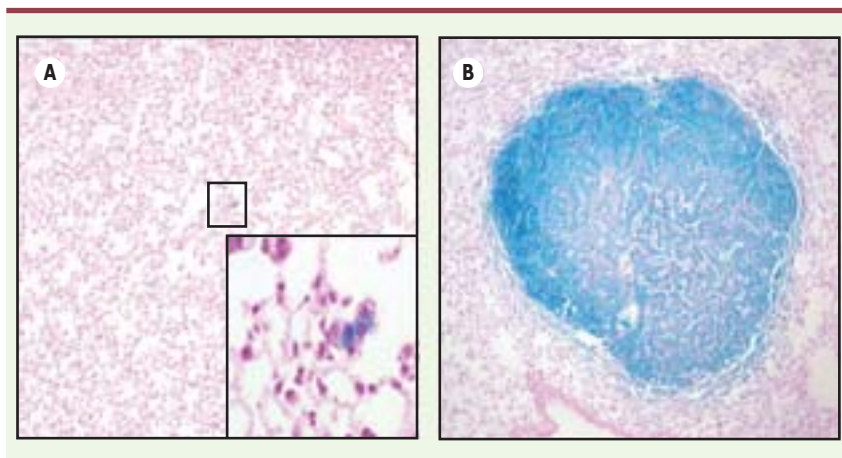
L'inactivation génique spécifique des différentes kinases dépendantes des

cyclines régulant le cycle cellulaire (Cdk1, Cdk2, Cdk4 et Cdk6) a permis d'affiner la compréhension de leurs fonctions [5]. Seule Cdk1 est strictement indispensable au cycle cellulaire et à la mitose [6]. Par contre, l'absence de l'une ou de plusieurs des Cdk2, 4 et 6 est compensée *in vivo* par la présence de complexes dits illégitimes associant la cycline partenaire de la Cdk absente à une autre Cdk. Il existe cependant des types cellulaires dont la prolifération reste spécifiquement liée à une ou deux Cdk. Ainsi, la prolifération post-natale des cellules  $\beta$  pancréatiques est dépendante de l'activité de Cdk4 [7] et celle des cardiomyocytes de la présence de Cdk4 ou de Cdk2 [8]. D'après ces données, l'inhibition pharmacologique des CDK devrait conduire à une toxicité prévisible acceptable vis-à-vis de la majorité des cellules normales et à la possibilité d'une action efficace ciblée sur certaines populations cellulaires tumorales qui, du fait d'anomalies acquises, seraient devenues dépendantes de l'activité d'une de ces CDK. Ainsi, l'analyse des profils moléculaires de glioblastomes humains a permis de prédire la sensibilité des cellules tumorales en culture ou de xéno-greffes tumorales à un inhibiteur pharmacologique de CDK4 et de CDK6 [9, 10].

### Cdk4, talon d'Achille des adénomes et adénocarcinomes murins mutés pour *Kras*

Afin d'étudier l'importance relative des différentes Cdk2, 4 et 6 dans le développement et la progression des tumeurs pulmonaires liées à l'oncogène *Kras<sup>V12G</sup>*,

<sup>1</sup> La CAAX farnésyltransférase est une enzyme hétérodimérique qui lie un groupe farnésyl à une cystéine dans des protéines contenant une boîte CAAX (C, cystéine; A, acide aminé aliphatique; X, méthionine ou sérine).



pneumocytes de type 2 exprimant l'oncogène  $Kras^{G12V}$  (A : x 20 et insert x 400). **B.** Trois mois plus tard, une tumeur pulmonaire formée de cellules épithéliales  $Kras^{G12V}$  s'est développée (B : x 20).

des animaux double-mutants ont été produits par le groupe de M. Barbacid par croisement des souris  $Kras^{+}/LSLV12G_{geo}$ ;  $RERT^{ert/ert}$  avec les animaux *knock-out* pour chacun des gènes codant les Cdk [11-13]. *In vitro*, l'absence de l'une des Cdk2, 4 ou 6 altère la croissance de cellules murines (MEF, *murine embryo fibroblasts*) portant la mutation  $Kras^{V12G}$ . De même, l'inactivation par sh (*short hairpin*)ARN de CDK2, 4 ou 6 inhibe la prolifération de lignées de cellules d'adénocarcinomes pulmonaires humains portant une mutation *KRAS*, mais n'a que peu d'effet sur des lignées de cellules de carcinomes pulmonaires non mutées pour *KRAS*. Ces résultats ne sont que partiellement confirmés *in vivo*.

Les souris  $Kras^{+}/LSLV12G_{geo}$ ;  $RERT^{ert/ert}$  portant une inactivation germinale de *Cdk2* ou de *Cdk6* développent des tumeurs pulmonaires et leur survie est similaire à celle des animaux contrôles porteurs de tumeurs  $Kras^{V12G}$ . En revanche, l'absence de *Cdk4* conduit à une sénescence accélérée des cellules  $Kras^{V12G}$  bloquant leur prolifération ainsi que le développent associé de tumeurs pulmonaires [14]. Si les tumeurs sont déjà installées, l'inactivation génétique conditionnelle de *Cdk4* conduit à une nette inhibition de la croissance tumorale associée à l'expression par les cellules tumorales de marqueurs de sénescence ainsi qu'à une réaction inflammatoire du stroma. Le traitement

préventif des animaux  $Kras^{+}/LSLV12G_{geo}$ ;  $RERT^{ert/ert}$  par PD0332991, un inhibiteur pharmacologique sélectif de CDK4 et de CDK6, permet de retarder le développement tumoral. Le traitement par ce même inhibiteur d'animaux déjà porteurs de tumeurs permet d'en ralentir significativement la progression [14].

### Perspectives

L'ensemble de ce travail démontre une dépendance des cellules épithéliales pulmonaires préneoplasiques ou néoplasiques murines portant la mutation  $Kras^{V12G}$  vis-à-vis de l'activité de Cdk4. S'il confirme que des mutations oncogéniques peuvent modifier les besoins des cellules tumorales en certaines CDK, il remet en question la valeur prédictive des tests pharmacologiques réalisés sur des cultures cellulaires par rapport à l'évolution tumorale *in vivo*. Certes, on peut aussi s'interroger sur la valeur d'une réponse de tels modèles précliniques. Les mécanismes moléculaires à l'origine des adénocarcinomes humains restent infiniment plus complexes et variés que ceux à l'œuvre dans un modèle murin. Aussi, il sera particulièrement intéressant d'analyser si l'association à la thérapeutique d'inhibiteurs de CDK4 sera suffisante pour améliorer la réponse clinique des patients porteurs d'un adénocarcinome pulmonaire avec une mutation avérée de *KRAS*. ♦

**Figure 1.** L'administration d'une faible dose de 4-OH tamoxifène aux souris  $Kras^{+}/LSLV12G_{geo}$ ;  $RERT^{ert/ert}$  adultes permet l'activation de la recombinaison *cre* au hasard dans un petit nombre de cellules. L'expression de l'oncogène  $Kras^{G12V}$  régulée par le promoteur endogène est couplée à l'expression de la  $\beta$ -galactosidase, un traceur enzymatique permettant de repérer les cellules qui portent la mutation sur des préparations histo-chimiques [3]. **A.** Par exemple, deux semaines après l'administration de tamoxifène et malgré une histologie pulmonaire normale, l'activité  $\beta$ -galactosidase permet l'identification de quelques

### CDK4, a specific target in the treatment of lung adenocarcinomas mutated for KRAS

#### CONFLIT D'INTÉRÊTS

L'auteur déclare n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to Gefitinib therapy. *Science* 2004; 304 : 1497-500.
2. Malumbres M, Barbacid M. Ras oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 2003; 3 : 7-13.
3. Guerra C, Mijimolle N, Dhawahir A, et al. Tumour induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 2003; 4 : 111-20.
4. Mijimolle N, Veslasco J, Dubus P, et al. Protein farnesyltransferase in embryogenesis, adult homeostasis and tumor development. *Cancer Cell* 2005; 7 : 313-24.
5. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 2009; 3 : 153-66.
6. Santamaria D, Barriere C, Cerquiera A, et al. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 2007; 448 : 811-5.
7. Martin J, Hunt SL, Dubus P, et al. Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic  $\beta$ -cell proliferation but not homeostatic cell number. *Oncogene* 2003; 22 : 5261-9.
8. Barriere C, Santamaria D, Cerquiera A, et al. Mice thrive without Cdk4 and Cdk2. *Mol Oncol* 2007; 1 : 72-83.
9. Wiedemeyer WR, Dunn IF, Quayle SN, et al. Pattern of retinoblastoma pathway inactivation dictates response to CDK4/6 inhibition in GBM. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107 : 11501-6.
10. Michaud K, Solomon DA, Oermann E, et al. Pharmacologic inhibition of Cyclin-Dependent kinase 4 and 6 arrests the growth of glioblastoma multiforme intracranial xenografts. *Cancer Res* 2010; 70 : 3228-38.
11. Rane SG, Dubus P, Mettus RV, et al. Loss of cyclin-dependent kinase 4 expression causes infertility and insulin-deficient diabetes while its activation results in pancreatic islet hyperplasia. *Nat Genet* 1999; 22 : 44-52.



12. Ortega S, Prieto I, Odajima J, *et al.* Cyclin dependant kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet* 2003 ; 35 : 25-31.
13. Malumbres M, Sotillo R, Santamaria D, *et al.* Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependant kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 2004 ; 118 : 493-504.
14. Puyol M, Martin A, Dubus P, *et al.* A synthetic lethal interaction between K-Ras oncogenes and Cdk4 unveils a therapeutic strategy for non small cell lung carcinoma. *Cancer Cell* 2010 ; 18 : 63-73.
15. Blay JY. Le futur des thérapeutiques ciblées en oncologie : trouver les cibles, traiter tôt et au long cours. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 1073-4.
16. Besse B, Le Chevalier T, Soria JC. Prédiction de la réponse à l'Iressa® : un mécanisme inattendu. *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 750-1.

## NOUVELLE

## Quand les éléments génétiques mobiles bondissent entre espèces animales

Clément Gilbert, Sarah Schaack, Cédric Feschotte

University of Texas, Arlington,  
76010, Texas, États-Unis.  
[cgilbert@exchange.uta.edu](mailto:cgilbert@exchange.uta.edu)  
[cedric@uta.edu](mailto:cedric@uta.edu)

► En 1959, une équipe de microbiologistes japonais montrait pour la première fois que la faculté de résister à certains antibiotiques pouvait être transférée d'une espèce de bactérie à une autre lorsque celles-ci étaient cultivées dans le même milieu de culture [1]. Cinquante ans plus tard, après avoir séquencé et analysé plus de 2 000 génomes bactériens, nous savons maintenant que la plupart des bactéries sont capables d'échanger leur matériel génétique (dont les gènes de résistance aux antibiotiques) de manière horizontale, entre individus d'une même espèce et entre espèces plus ou moins éloignées, sans avoir recours à la reproduction sexuée [2]. Il est aussi désormais admis que les transferts horizontaux de gènes ont un impact évolutif considérable sur l'évolution des procaryotes, tant ils sont fréquents et communs chez ces organismes. L'importance de ce phénomène est moins claire chez les eucaryotes. Bien qu'un nombre grandissant de transferts horizontaux de gènes de procaryotes à eucaryotes aient été décrits, les cas de transferts entre eucaryotes, et notamment entre eucaryotes multicellulaires, restent rares dans la littérature [3]. L'influence exercée par le processus de transfert horizontal sur l'évolution des génomes eucaryotes serait-elle donc négligeable ?

### Influence des éléments transposables sur l'évolution des génomes

Ce paradigme prévaut probablement pour une majorité de biologistes. Il s'explique en partie par l'importance - peut-être disproportionnée - qui a jusqu'à présent été attribuée aux transferts de gènes. Or, contrairement à ce que l'on observe chez les procaryotes, les gènes (séquences codantes) représentent généralement une fraction mineure et relativement statique des génomes eucaryotes (< 2 % du génome humain). Chez la plupart des eucaryotes multicellulaires, le génome nucléaire est composé principalement d'ADN non codant, qui dérive en grande partie de l'activité répliquative d'éléments génétiques mobiles ou éléments transposables (ET). Les ET sont des segments d'ADN ayant la capacité de se déplacer d'un chromosome à l'autre et de se multiplier *via* divers mécanismes. Leur amplification au sein des génomes est parfois si prolifique qu'elle a pour résultat la formation d'immenses familles de séquences répétées en centaines de milliers de copies et dispersées sur tous les chromosomes. Par exemple, ces éléments et leurs reliques moléculaires occupent la moitié du génome humain et plus des trois quarts du génome du maïs [4, 5]. Bien que les ET puissent être simplement perçus comme des parasites génomiques - n'ayant *a priori* aucune utilité

pour leur hôte - ou comme des agents mutagènes délétères, il est indéniable que leur mobilité et leur multiplicité sont à la base de nombreux processus de plasticité génomique. En ce sens, les ET représentent une abondante source de variation et d'innovation génétiques. Les exemples illustrant les multiples mécanismes par lesquels les ET ont contribué à la création de nouveautés génomiques sont maintenant nombreux, que ce soit de manière indirecte, *via* leur activité recombinogénique (source de réarrangements chromosomiques, de réorganisation d'exons), ou encore de manière directe, *via* le recyclage (ou « domestication ») de leur séquence pour former de nouvelles régions régulatrices ou de nouveaux gènes [6]. Considérant la profusion des ET et l'influence qu'ils exercent sur l'évolution des génomes eucaryotes, il semble qu'une évaluation complète et pertinente de l'impact des transferts horizontaux chez ces organismes se doit de considérer les transferts d'ET, en plus des transferts de gènes.

### Transferts horizontaux d'éléments transposables chez les eucaryotes

Dans une synthèse récente de la littérature, nous avons comptabilisé plus de 200 cas robustes de transferts horizontaux d'ET décrits chez les eucaryotes multicellulaires [7]. La liste de génomes