

furent obtenus en utilisant les souris transgéniques PS2APP et en quantifiant le signal fluorescent résultant de l'interaction de l'anticorps mAb31 avec les plaques amyloïdes contenues dans le cerveau de ces souris [6]. Nous avons également montré, en utilisant le même modèle animal lors d'une étude prolongée quatre mois, que cette meilleure pénétration de l'anticorps est corrélée à une meilleure efficacité du traitement mesurée par l'augmentation de la dégradation des plaques amyloïdes.

Perspectives

Le *brain shuttle* que nous avons développé est basé sur l'utilisation d'un mécanisme de transport naturellement

existant. Cette technologie pourrait offrir de nombreuses perspectives thérapeutiques pour le traitement de maladies neurologiques en permettant le passage de grosses molécules telles que des anticorps, des peptides, des enzymes ou autres facteurs de croissance dans le parenchyme cérébral. L'étude effectuée chez la souris devra maintenant être reproduite chez l'homme afin d'ouvrir les portes du cerveau à une nouvelle génération de molécules thérapeutiques. ♦

Opening the brain to new therapies

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare avoir des liens durables avec l'entreprise Hoffmann La Roche AG.

RÉFÉRENCES

1. Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 2008 ; 57 : 178-201.
2. Armulik A, Genove G, Mae M, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 2010 ; 468 : 557-561.
3. Pardridge WM. Drug transport across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012 ; 32 : 1959-72.
4. Banks WA, Terrell B, Farr SA, et al. Passage of amyloid beta protein antibody across the blood-brain barrier in a mouse model of Alzheimer's disease. *Peptides* 2002 ; 23 : 2223-6.
5. Niewoehner J, Bohrmann B, Collin L, et al. Increased brain penetration and potency of a therapeutic antibody using a monovalent molecular shuttle. *Neuron* 2014 ; 81 : 49-60.
6. Bohrmann B, Baumann K, Benz J, et al. Gantenerumab: a novel human anti-Abeta antibody demonstrates sustained cerebral amyloid-beta binding and elicits cell-mediated removal of human amyloid-beta. *J Alzheimers Dis* 2012 ; 28 : 49-69.
7. Gosselet F, Candela P, Cecchelli R, Fenart L. La barrière hémato-encéphalique. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 987-92.

NOUVELLE

Mutations récurrentes des gènes *RHOA* et *FYN* dans les lymphomes T périphériques

Lucile Couronné^{1,2,3}, Christian Bastard⁴, Olivier A. Bernard^{5,6,7}

Séquençage à haut débit dans les lymphomes T périphériques

Les lymphomes T périphériques constituent un groupe hétérogène d'entités au pronostic globalement sombre dont les mécanismes de développement sont encore mal compris. Des mutations des gènes *TET2* (*methylcytosine dioxygenase 2*), *DNMT3A* (*DNA [cytosine-5-]-methyltransferase 3 alpha*) et *IDH2* (*isocitrate dehydrogenase*), entraînant une dérégulation du contrôle de la méthylation de l'ADN, ont déjà été rapportées dans les deux sous-types histologiques les plus fréquents, le lymphome T angio-immunoblastique (AITL) et le lymphome T périphérique, non spécifié (PTCL, NOS)

[1-4]. Les mutations de *TET2* sont associées au phénotype T *follicular helper* (TFH) [2], défini par la positivité des cellules tumorales pour les antigènes CD10 et PD1, la prolifération de cellules folliculaires dendritiques positives pour le CD21, et la présence de cellules B exprimant l'EBV (*Epstein Barr virus*) [5], mais ne sont observées que chez une fraction des patients.

Deux groupes viennent de rapporter les résultats de séquençage à haut débit de lymphomes T périphériques [5, 6]. De façon similaire, après une première analyse par séquençage de l'ensemble des régions codantes du génome (*whole-exome sequencing*) des

¹ Service d'hématologie adulte, Assistance publique-Hôpitaux de Paris (APHP), hôpital Necker, Paris, France ;

² Inserm UMR1163, CNRS ERL 8254, Institut Imagine, Paris, France ;

³ Université Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité, Paris, France ;

⁴ Inserm U918, Université de Rouen, Centre Henri Becquerel, Rouen, France ;

⁵ Inserm U985, Villejuif, France ;

⁶ Université Paris-Sud, Orsay, France ;

⁷ Institut Gustave Roussy, Villejuif, France.

lucile.couronne@gmail.com

cellules d'une série limitée de patients, les gènes mutés ont été analysés dans une cohorte d'extension indépendante de lymphomes T périphériques (159 patients pour l'équipe japonaise, 125 patients pour l'équipe américaine) en utilisant des techniques sensibles de détection comme le séquençage haut débit [5, 6] ou la PCR quantitative spécifique d'allèle [6].

Le reséquençage ciblé réalisé par l'équipe japonaise a confirmé la présence de mutations des gènes *TET2*,



Gène	Mutation	Conséquence prédite	Fréquence (PTCL)	Fonction protéique	Remarques
RHOA	C16R	ND	25,0 %	Petite GTPase : polarisation, migration, contrôle des éléments dynamiques du cytosquelette	Récurrence de RHOA G17V Spécifique des PTCL de phénotype TFH (<i>T follicular helper</i>)
	G17V	Inactivation			
	G17E	ND			
	G17del	Inactivation			
	T19I	ND			
	D120Y	ND			
CD58	A161E	Inactivation	4,0 %	Interaction entre cellules immunitaires	Mutations permettant d'échapper à l'immunosurveillance antitumorale. Aussi observées dans des lymphomes de type B
	F43fs	Inactivation			
	K60fs	Inactivation			
	S107X	Inactivation			
	R152X	Inactivation			
	G210C	ND			
FYN	G210S	ND	3,0 %	SRC kinase/signalisation intracellulaire en amont du TCR, induisant la prolifération et la différenciation T	Mutations sensibles au dasatinib, inhibiteur des kinases SRC
	L174R	Activation			
	R176C	Activation			
ATM	Y531H	Activation	2,0 %	Impliquée dans les mécanismes de réparation de l'ADN	Gène supresseur de tumeur
	T2333K	ND			
	D2959N	ND			
TET3	R3008H	ND	1,5 %	Oxygénase dépendante du 2 OG et du Fe(II)/contrôle de la méthylation de l'ADN	Apparentée à TET2
	G1360S	ND			
CDKN2A	D1469fs	Inactivation	1,5 %	Contrôle du cycle cellulaire	Gène supresseur de tumeur
	E69X	Inactivation			
PRKD2	R80X	Inactivation	1,5 %	Signalisation intracellulaire en amont du TCR, induisant la prolifération et la différenciation T	
	R147W	ND			
RHOT2	V680M	ND	1,5 %	Famille des RHO GTPases	
	p.442_splice	ND			
B2M	R123Q	ND	0,7 %	Interaction entre cellules immunitaires	Mutations permettant d'échapper à l'immunosurveillance antitumorale. Aussi observées dans des lymphomes de type B
	M1R	Inactivation			
SMARCAL1	E56X	Inactivation	0,7 %	Famille SWI/SNF/remodelage de la chromatine	
	T417M	ND			

Tableau I. Nouvelles mutations identifiées par le séquençage haut débit d'échantillons de lymphomes T périphériques (PTCL). ND : non déterminé ; ATM : ataxia telangiectasia mutated ; B2M : beta 2-microglobulin ; SMARCAL1 : SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1 ; PRKD2 : protein kinase D2 ; CDKN2A : cyclin-dependent kinase inhibitor 2A ; CD58 : lymphocyte function-associated antigen 3 (LFA-3) ; RHOT2 : ras homolog gene family member T2.

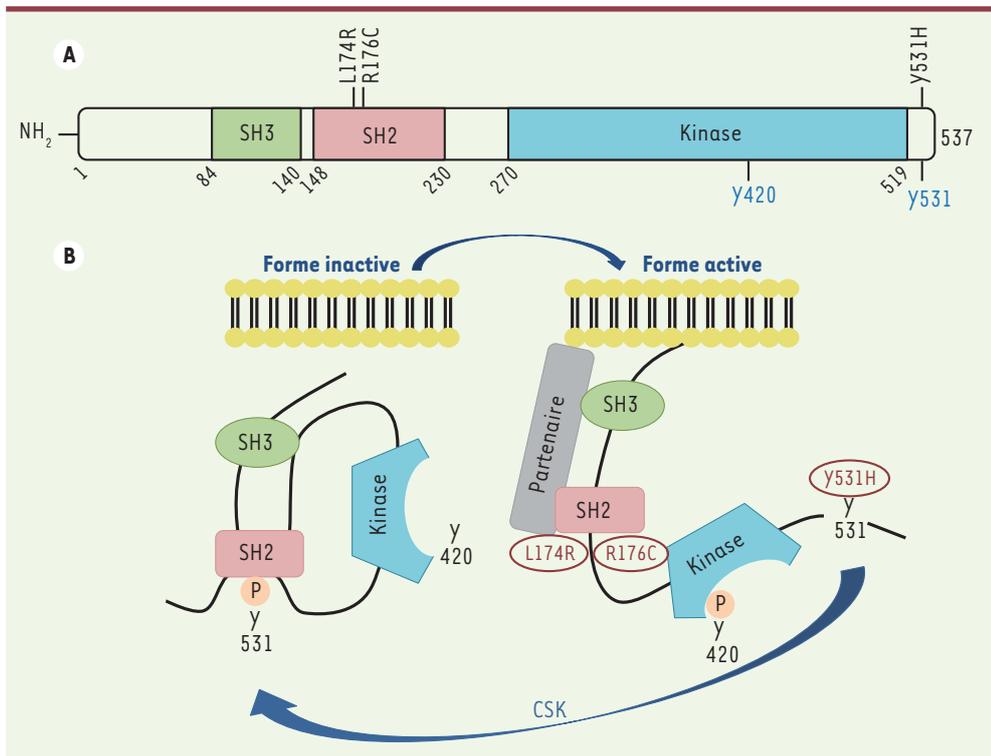


Figure 1. Protéine FYN.

A. Structure protéique de FYN montrant les domaines identifiés et la localisation des mutations observées dans les échantillons de PTCL. **B.** Régulation de l'activité de la SRC kinase FYN. À l'état inactif, la tyrosine 531 située à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine est phosphorylée par l'enzyme CSK, et son interaction avec le domaine SH2 maintient la protéine dans une configuration inactive. Dans l'état actif, la tyrosine 531 est déphosphorylée, et la tyrosine 420 située dans la boucle d'activation du domaine kinase est phosphorylée. Les mutants L174R, R176C

et Y531H abolissent l'interaction entre le domaine SH2 et la phosphotyrosine 531, permettant une configuration ouverte et active de la protéine, qui résiste à l'action de CSK.

DNMT3A, et *IDH2* chez respectivement 69 %, 27 % et 18 % des cas d'AITL et de PTCL,NOS [5]. Ces valeurs sont plus élevées que celles rapportées par le groupe américain, probablement en raison de profondeurs de lecture plus importantes permettant des seuils de détection plus bas [6].

L'équipe américaine a également identifié des mutations somatiques dans des gènes potentiellement intéressants pour les processus de transformation tels que *TET3*, *ATM*, *B2M*, *CD58*, *CDKN2A*, *PRKD2*, *RHOT2* et *SMARCA1* (Tableau I).

Mutations récurrentes des gènes *FYN* et *RHOA*

Des mutations dans deux autres gènes, *FYN* et *RHOA*, sont observées de façon récurrente et ont été testées sur le plan fonctionnel [5, 6].

- *FYN* appartient au groupe des tyrosine kinases SRC et joue un rôle important dans la signalisation du récepteur à l'antigène des lymphocytes T (TCR)

et l'activation lymphocytaire T [7]. Trois mutants de *FYN* ont été détectés : L174R, R176C et Y531H [6] (Figure 1A et Tableau I). Ces mutations affectent négativement l'interaction entre le domaine SH2 et la partie carboxy-terminale de *FYN* qui inhibe normalement l'activité de la protéine. Les mutations conduisent à une configuration ouverte et active de la protéine, et l'activation de la protéine résiste à la surexpression de l'enzyme CSK (*C-terminal Src kinase*), supposée inhiber l'activité de *FYN* (Figure 1B). Dans le modèle cellulaire Rat1A, la croissance des cellules exprimant les mutants *FYN* est inhibée par le dasatinib¹, un inhibiteur pharmacologique des SRC kinases [6].

- Le gène *RHOA* est touché par une mutation récurrente et spécifique des PTCL, qui entraîne la substitution en position

¹ Inhibe l'activité de la kinase BCR (*breakpoint cluster region*)-ABL (Abelson) caractéristique de la leucémie myéloïde chronique, des kinases de la famille SRC (*SRC*, *LCK*, *YES*, *FYN*), *c-KIT*, *EPHA2*, et *PDGFRβ*.

17 d'une glycine par une valine (G17V), dans 67 à 71 % des cas d'AITL et dans 17 à 18 % des cas de PTCL,NOS [5, 6]. D'autres mutants (C16R, G17E, T19I, D120Y, G17del, A161E) ont été identifiés, mais uniquement de façon isolée dans des échantillons sans mutation *RHOA G17V* [5, 6] (Figure 2A et Tableau I). Les mutations de *RHOA* semblent spécifiques des PTCL,NOS dits *TFH-like*, c'est-à-dire présentant au moins deux des caractéristiques immunohistochimiques des AITL [5]. L'analyse en cytométrie de flux effectuée à partir de prélèvement de quelques cas de PTCL révèle que la charge allélique en *RHOA G17V* est corrélée à la proportion de cellules tumorales présentes dans les différents échantillons [6], et l'étude de sous-populations cellulaires chez deux patients montre que la mutation *RHOA G17V* est restreinte à la population tumorale [5].

Il existe une très forte corrélation entre la présence des mutations *RHOA G17V* et celle des mutations *TET2* et *IDH2* [5,

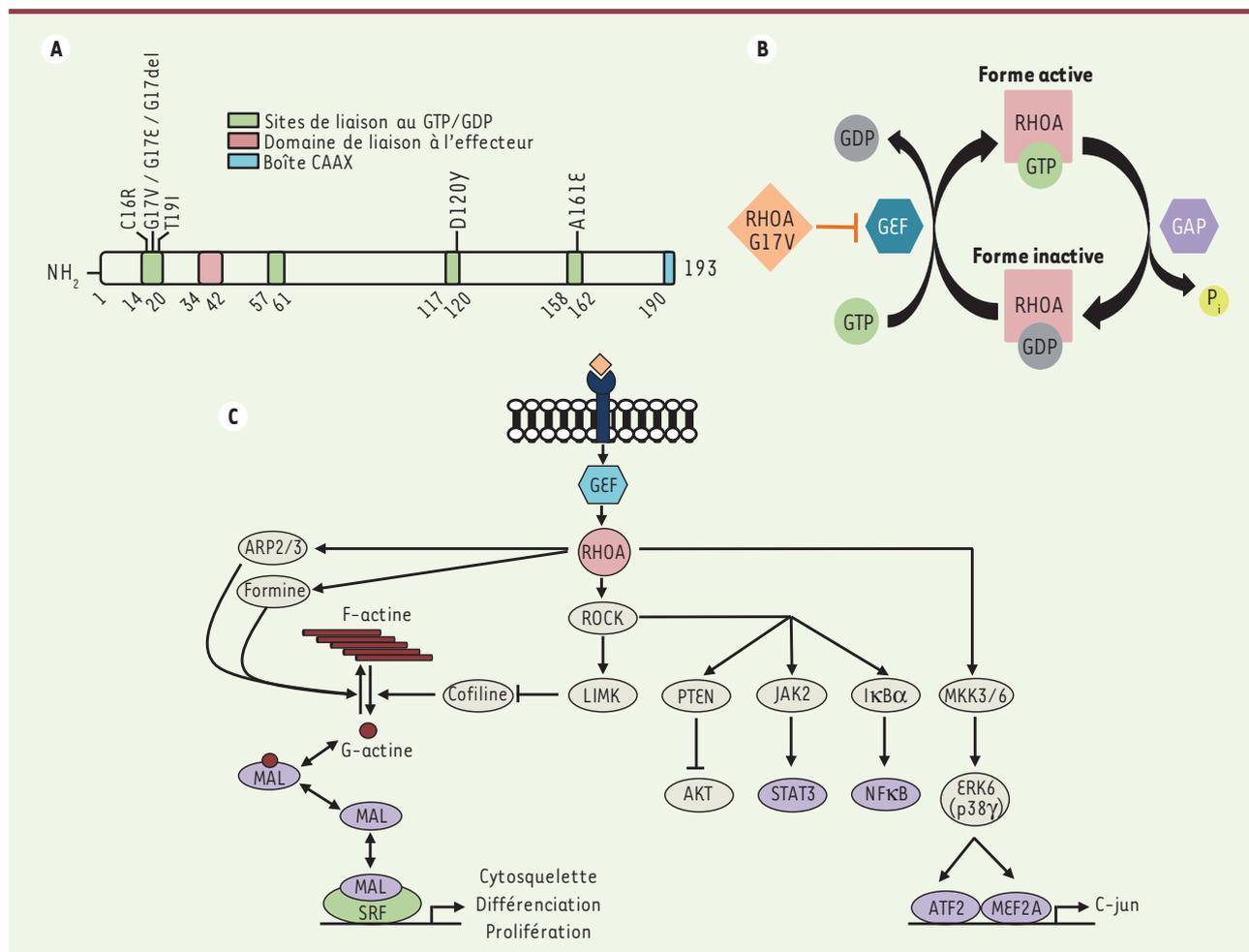


Figure 2. Protéine RHOA. **A.** Structure protéique de RHOA montrant les domaines identifiés et la localisation des mutations observées dans les échantillons de PTCL. **B.** Représentation schématique du cycle de la GTPase RHOA. La forme active est liée au GTP alors que la forme inactive est liée au GDP. Le passage d'une forme à l'autre s'effectue grâce à l'activité des GEF qui facilitent l'échange du GDP en GTP, et des GAP qui stimulent l'activité GTPase intrinsèque de RHOA permettant l'hydrolyse de GTP en GDP. Le mutant RHOA G17V bloque l'activation de RHOA en séquestrant les GEF. **C.** Schéma des voies de signalisation intracellulaires en aval de RHOA.

6]. Les mutations *TET2* et *DNMT3A* ont, dans la plupart des cas, une charge allélique significativement plus élevée que celle des mutations *RHOA* et *IDH2*, et peuvent être observées dans d'autres cellules hématopoïétiques que les lymphocytes T [5], suggérant qu'elles surviennent probablement avant celles de *RHOA* et d'*IDH2* dans l'histoire naturelle de la maladie [5].

Conséquences fonctionnelles de la mutation RHOA G17V

La protéine RHOA fait partie de la famille des petites GTPases qui ont la propriété de passer d'un état inactif lié au GDP

à un état actif lié au GTP. L'équilibre entre ces deux conformations est régulé par l'activité des facteurs d'échange de guanine (GEF) qui catalysent la dissociation du GDP et le chargement en GTP et donc activent RHOA, et par celle des protéines activatrices de GTPases (GAP), qui stimulent l'hydrolyse du GTP en GDP et donc inactivent RHOA [8-10] (Figure 2B). RHOA est impliquée dans nombre de processus cellulaires via l'activation de voies de signalisation variées [11] (Figure 2C). Elle régule en particulier l'activité du facteur de transcription *serum response factor* (SRF), en contrôlant la localisation subcellulaire

d'un cofacteur de la famille MRTF MKL1/MAL. En effet, RHOA est responsable de l'incorporation de l'actine monomérique G au sein des filaments d'actine F. Cet équilibre contrôle la localisation nucléaire de MAL qui, une fois entré dans le noyau, interagit avec SRF (Figure 2C) et stimule la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération, la différenciation, la motilité cellulaires et le contrôle des éléments dynamiques du cytosquelette [12].

Fonctionnellement, la mutation RHOA G17V semble exercer un effet dominant négatif sur l'activité de la protéine normale. La surexpression de *RHOA G17V* a

pour effet de réduire, proportionnellement à la dose, le chargement en GTP de la forme sauvage de RHOA, probablement en séquestrant les GEF [5, 6]. Testé avec un vecteur indicateur répondant à SRF, le mutant RHOA G17V n'active pas la transcription, contrairement à la forme sauvage de RHOA, et exerce même un effet dominant négatif sur l'activité de celle-ci [5]. Des analyses globales d'expression génique montrent une signature d'activité de SRF lorsque la forme sauvage de RHOA est surexprimée, mais pas lorsque RHOA G17V l'est [5]. Enfin, l'expression ectopique de RHOA G17V dans des modèles cellulaires conduit aux mêmes anomalies morphologiques que le dominant négatif RHOA T19N et inhibe la formation des fibres de stress [5,6], sans effet évident sur la prolifération cellulaire [5,6]. L'ensemble de ces résultats suggèrent que RHOA G17V est un mutant perte de fonction, exerçant un effet dominant négatif par rapport à l'activité de la protéine sauvage [5, 6] (Figure 2B).

Lymphomes T périphériques : un processus multiétapes

En conclusion, ces données apportent un éclairage nouveau sur les anomalies génétiques survenant au cours de la lymphomagenèse T. Elles sug-

gèrent que le dasatinib pourrait avoir un intérêt thérapeutique chez un petit nombre de patients dont les cellules expriment une mutation de FYN. L'identification d'une mutation récurrente de RHOA (G17V) souligne le rôle important de cette voie de signalisation au cours de la transformation tumorale T. Sa grande spécificité pour les lymphomes à phénotype TFH pourrait permettre une nouvelle classification moléculaire des PTCL et indique que cette voie peut constituer une cible thérapeutique.

Enfin, ces résultats renforcent l'hypothèse d'un processus multiétapes d'installation de la maladie : un premier événement (mutations de *TET2* et/ou *DNMT3A*) affectant des progéniteurs hématopoïétiques précoces serait à l'origine d'une hématopoïèse anormale, puis une deuxième anomalie génétique (mutations de *RHOA*, *FYN* et/ou *IDH2*) survenant secondairement dans des cellules plus matures, conduirait au phénotype de lymphomes T périphériques. ♦

Recurrent mutations in RHOA and FYN in peripheral T cell lymphomas

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

- Couronné L, Bastard C, Bernard OA. TET2 and DNMT3A mutations in human T-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2012 ; 366 : 95-6.
- Lemonnier F, Couronné L, Parrens M, et al. Recurrent TET2 mutations in peripheral T-cell lymphomas correlate with TFH-like features and adverse clinical parameters. *Blood* 2012 ; 120 : 1466-9.
- Quivoron C, Couronné L, Della Valle V, et al. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell* 2011 ; 20 : 25-38.
- Cairns RA, Iqbal J, Lemonnier F, et al. IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood* 2012 ; 119 : 1901-3.
- Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, et al. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet* 2014 ; 46 : 171-5.
- Palomero T, Couronné L, Khiabani H, et al. Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat Genet* 2014 ; 46 : 166-70.
- Palacios EH, Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene* 2004 ; 23 : 7990-8000.
- Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002 ; 420 : 629-35.
- Vega FM, Ridley AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett*. 2008 ; 582 : 2093-2101.
- Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjano IM. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 2007 ; 29 : 356-70.
- Hanna S, El-Sibai M. Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cell Signal* 2013 ; 25 : 1955-61.
- Olson EN, Nordheim A. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010 ; 11 : 353-65.

NOTE AJOUTÉE AUX ÉPREUVES

Pendant la soumission de cet article, un troisième groupe (Corée du Sud) a également publié sur les mutations de RHOA dans les PTCL [1].

RÉFÉRENCE

- Yoo HY, Sung MK, Lee SH, et al. A recurrent inactivating mutation in RHOA GTPase in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet* 2014 ; 46 : 371-5.



Tarifs d'abonnement m/s - 2014

Abonnez-vous

à médecine/sciences

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement
page 518 dans ce numéro de m/s

