



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2010/12/21
 (87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2011/07/14
 (85) Entrée phase nationale/National Entry: 2012/06/12
 (86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2010/052853
 (87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2011/083253
 (30) Priorité/Priority: 2009/12/21 (FR0959325)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12Q 1/68* (2006.01)
 (71) Demandeurs/Applicants:
 INSTITUT GUSTAVE ROUSSY, FR;
 UNIVERSITE NICE SOPHIA ANTIPOLIS, FR;
 INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE
 LA RECHERCHE MEDICALE), FR
 (72) Inventeurs/Inventors:
 BALLOTTI, ROBERT, FR;
 BERTOLOTTO, CORINE, FR;
 BRESSAC DE PAILLERETS, BRIGITTE, FR;
 DE LICHY, MAHAUT, FR;
 LESUEUR, FABIENNE, FR
 (74) Agent: FETHERSTONHAUGH & CO.

(54) Titre : MITF COMME MARQUEUR DE PREDISPOSITION A UN CANCER
 (54) Title: MITF AS A MARKER FOR PREDISPOSITION TO CANCER

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention concerne un mutant de MITF qui est utile en tant que marqueur de prédisposition au développement de cancer et ses utilisations dans le diagnostic et les traitements préventifs, ce mutant présentant une sumoylation diminuée ou absente.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
14 juillet 2011 (14.07.2011)

(10) Numéro de publication internationale
WO 2011/083253 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2010/052853

(22) Date de dépôt international :
21 décembre 2010 (21.12.2010)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0959325 21 décembre 2009 (21.12.2009) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
INSTITUT GUSTAVE ROUSSY [FR/FR]; 39 rue
Camille Desmoulins, F-94805 Villejuif Cedex (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
BALLOTTI, Robert [FR/FR]; Bat A, Le Val Fleuri Bat
A, 10 Avenue Brancolar, F-06100 Nice (FR).
BERTOLOTTI, Corine [FR/FR]; Bat A, Le Val Fleuri
Bat A, 10 Avenue Brancolar, F-06100 Nice (FR).
BRESSAC DE PAILLERETS, Brigitte [FR/FR]; 53 rue
de l'Yser, F-92330 Sceaux (FR). DE LICHY, Mahaut
[FR/FR]; 44 avenue de Suffren, F-75015 Paris (FR).
LESUEUR, Fabienne [FR/FR]; 56 rue Villon, F-69008
Lyon (FR).

(74) Mandataires : GALLOIS, Valérie et al.; Becker &
Associés, 25 rue Louis le Grand, F-75002 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues (règle 48.2.h))

— avec la partie de la description réservée au listage des
séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : MITF AS A MARKER FOR PREDISPOSITION TO CANCER

(54) Titre : MITF COMME MARQUEUR DE PREDISPOSITION A UN CANCER

(57) Abstract : The present invention relates to a mutant of MITF which is of use as a marker for predisposition to the development of cancer and to uses thereof in diagnosis and preventive treatments, sumoylation being reduced or absent in this mutant.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un mutant de MITF qui est utile en tant que marqueur de prédisposition au développement de cancer et ses utilisations dans le diagnostic et les traitements préventifs, ce mutant présentant une sumoylation diminuée ou absente.



WO 2011/083253 A1

MITF COMME MARQUEUR DE PREDISPOSITION A UN CANCER

La présente demande se rapporte au domaine médical, et plus particulièrement à celui de la détermination d'une prédisposition à développer un cancer.

Dans environ 5% des cancers, des mutations constitutionnelle activant des oncogènes ou inactivant des gènes suppresseurs de tumeurs (dits gènes majeurs ou à effet fort), confèrent aux porteurs un risque élevé (supérieur à 50% au cours de la vie) de développer un cancer, à l'origine de formes familiales, du sujet jeune ou d'atteintes multiples. L'expression de la maladie peut varier sous l'influence d'autres facteurs génétiques (dits modificateurs, gènes à effets faibles) ou environnementaux. L'identification des personnes à risque permet de leur faire bénéficier de mesures de prévention et de surveillance visant un dépistage précoce. Dans certains cas, la mutation germinale constitutionnelle peut orienter la thérapie anticancéreuse, c'est le cas des traitements anti-PARP chez les patientes porteuses de mutations germinales de BRCA1 et BRCA2 (Hennessy B.T.J., JCO, 2010, 28, 3570- 3576).

Le mélanome est une tumeur maligne des mélanocytes. C'est un des cancers de la peau les plus rares mais il est cause de la majorité des décès dus au cancer de la peau. Malgré de nombreuses années de recherche intensive, le seul traitement efficace est la résection chirurgicale de la tumeur primaire avant qu'elle n'atteigne une épaisseur de plus d'1 mm. Selon un rapport de l'OMS, il y a environ 48 000 décès liés aux mélanomes par an. Dans plusieurs études, une augmentation du risque de développer un cancer du sein, un lymphome ou un cancer du rein chez les patients ayant des mélanomes cutanés a été discutée.

Concernant le mélanome, deux gènes à effet fort ont été identifiés à ce jour, *CDKN2A* codant les protéines p16^{INK4A} et p14^{ARF}, et *CDK4*. Le facteur environnemental majeur est l'exposition aux UV. Les gènes à effets faibles connus sont principalement des gènes codants des protéines impliquées dans la pigmentation, *MC1R* étant le plus étudié à ce jour. 50% des familles à trois cas de mélanome n'ont pas de gène de prédisposition identifié.

Dans ce contexte, les inventeurs ont étudié le gène *MITF*, gène majeur de régulation du mélanocyte (1) et oncogène (2,3) comme gène candidat de prédisposition au mélanome. MITF est un facteur de transcription de la famille bHLH-LZ qui joue un rôle majeur dans la survie et le développement des mélanocytes. MITF est impliqué dans la régulation de la mélanogenèse. Le rôle de MITF est inhabituel puisqu'il est à la

fois inducteur et répresseur de la prolifération cellulaire. En effet, ce facteur est nécessaire d'une part pour la différenciation terminale des mélanocytes et/ou la pigmentation, et d'autre part pour le comportement malin en induisant la prolifération cellulaire. Des mutations constitutionnelle « perte de fonction » de MITF ont été associées à des maladies autosomales dominantes, notamment le Syndrome de Waardenburg et le Syndrome de Tietz, se caractérisant par une surdité avec des anomalies de la pigmentation de la peau, des cheveux et/ou de l'iris.

Le gène MITF comprend 9 exons. Six isoformes de *MITF* ont été identifiées. Chez l'Homme, on les définit généralement comme les isoformes 1 à 6, l'isoforme 4 étant plus connue sous le nom d'isoforme M. Chez la souris, on utilise plutôt la nomenclature avec des lettres. Ces isoformes sont transcrites par des promoteurs spécifiques. De plus, elles se distinguent par leur région N-terminale et contiennent toutes les exons 2 à 9, l'exon 1 étant spécifique de chaque isoforme (1). L'isoforme 4, plus communément appelé MITF-M, se différencie des autres isoformes par une insertion de six acides aminés. Cette isoforme a été détectée uniquement dans des mélanocytes ou des cellules transformées *in vivo* (nevus, mélanome, etc) ou dérivées *in vitro* (lignées). Les autres isoformes sont exprimées dans beaucoup de tissus et de lignées cellulaires, parfois aussi avec des spécificités tissulaires.

WO 00/47765 enseigne que l'épissage alternative du gène MITF produit des transcrits *mitf+* et *mitf-* codant pour des protéines différant par l'insertion de six acides aminés supplémentaires dans *mitf+*. L'expression de *mitf+* et *mitf-* prédomine respectivement dans les cellules saines et tumorales. Cette demande de brevet divulgue donc une méthode semi-quantitative pour évaluer, prédire, ou surveiller le risque et le traitement de mélanomes. WO 05/116249 décrit également une méthode quantitative basée sur ces variants d'épissage de MITF.

Dans la présente invention, les inventeurs ont identifié une mutation constitutionnelle récurrente du gène *MITF*, appelée ici E318K (selon la nomenclature de l'isoforme 4), qui est utile comme marqueur de prédisposition au cancer.

Le gène *MITF* (facteur de transcription associé à la microphthalmie) est bien connu de l'homme du métier et peut être caractérisé par son référencement dans des bases de données comme UniGene (Hs.166017), HomoloGene (4892) and GeneID (4286). Il est également appelé MI, WS2A ou bHLHe32.

Cette mutation E318K est localisée dans l'exon 9 du gène *MITF*, en particulier en position 952 de l'isoforme M selon la nomenclature HGVS. Elle consiste en la substitution d'un nucléotide G par un nucléotide A (c.952G>A) et résulte en la substitution d'un acide glutamique par une lysine (p.Glu318Lys). Cet exon 9 est commun à tous les variants d'épissage de *MITF*. Dans l'isoforme *MITF-M*, ce résidu est en position 952 du transcrit et provoque la mutation de l'acide aminé en position 318. Le terme « mutation E318K » désigne la mutation, quelque soit sa position dans les isoformes de *MITF*. Notamment, la position du nucléotide muté et de l'acide aminé dans les différents variants d'épissage est indiquée ci-dessous.

10

Isoforme	Autre nom	ref transcrit	Ref protéine	Mutation	SEQ ID No
ISOFORM 1	MITF-A	NM_198159	NP_937802	E419K	35
ISOFORM 2	MITF-H	NM_198177	NP_937820	E403K	36
ISOFORM 3	MITF-C	NM_006722	NP_006713	E418K	37
ISOFORM 4	MITF-M	NM_000248	NP_000239	E318K	38
ISOFORM 5		NM_198158	NP_937801	E312K	39
ISOFORM 6		NM_198178	NP_937821	E394K	40

15

20

Le mutant *MITF* E318K a montré une activité plus forte que *MITF* sauvage pour l'activation de la transcription du gène *HIF1A*, ce gène étant connu comme jouant un rôle majeur dans la carcinogenèse rénale (activé secondairement aux mutations « pertes de fonction » des gènes de prédisposition au cancer du rein, tels que *VHL*, *FH*, *SDHB*). De plus, il a été établi que cette mutation diminue la sumoylation de *MITF*, influençant ainsi peut-être la stabilité de la protéine ou la quantité de protéines codées par les gènes cibles. En effet, l'acide aminé E318 fait partie d'un des deux sites de sumoylation de la protéine *MITF*. Le gène *MITF* codant un facteur de transcription, la protéine *MITF* mutée E318K est susceptible d'activer en continu certains de ses gènes cibles. Il est aussi possible que la mutation change la localisation de la protéine *MITF* ou son ratio nucléo-cytoplasmique.

25

Les inventeurs ont découvert que le mutant *MITF* E318K est plus représenté chez des patients présentant un mélanome malin cutané conjointement à un cancer du rein. La mutation serait également plus représentée chez les sujets ayant développé un mélanome cutané malin et un cancer du rein ou dans les familles présentant des

mélanomes et des cancers du rein chez des apparentés, ou un mélanome cutané et un autre cancer, notamment une polyglobulie ou un lymphome. Ce mutant est présent à une fréquence très faible (2/2846 sujets, soit une fréquence d'hétérozygotes de 0,0007 dans une première cohorte, et 11/1824 sujets, soit une fréquence d'hétérozygotes de 0,003 dans une deuxième cohorte) chez les sujets sains témoins. Les inventeurs ont montré que la forme non-sumoylée de *MITF* conduit à des mélanocytes moins différenciés et des cellules plus prolifératives.

Par ailleurs, il est probable que ce mutant soit également plus représenté chez les sujets ayant développé une ou des tumeurs issues de la crête neurale telles que le cancer neuroendocrinien, un sarcome, un neuroblastome ou une tumeur du système nerveux (TSN), ou d'autres types de cancers selon les résultats préliminaires des inventeurs tels qu'un lymphome, un cancer du poumon, un cancer du rein, un cancer du sein, un cancer du pancréas, une tumeur pédiatrique, un cancer du système hématopoïétique, un cancer du système digestif, une polyglobulie ou une combinaison de ces types de cancer. Les sites de sumoylation comprennent classiquement le motif consensus W-K-X-E dans lequel W est un acide aminé hydrophobe et X est un quelconque acide aminé. *MITF* possède deux sites de sumoylation : le premier site ayant la séquence IKRE (avec le K en positions respectives dans les isoformes 1, 2, 3, 4, 5 et 6 : 289, 273, 288, 182, 182 et 126) et le deuxième site ayant la séquence IKQE (avec le K en positions respectives dans les isoformes 1, 2, 3, 4, 5 et 6 : 417, 401, 416, 316, 310 et 254). Les mutations de K182 et K316 augmentent la transcription d'un gène cible, mélastatine/TRPM, mais n'influencent pas la capacité de la protéine à se lier à l'ADN, ni la localisation ou la stabilité de la protéine (Miller AJ et al, JBC, 2005, 280 : 146-155).

L'enseignement pour le mutant E318K de *MITF* de la présente invention est généralisable à toute mutation de *MITF* diminuant ou abolissant la sumoylation de la protéine *MITF* à un des sites de sumoylation ou au deux.

Par conséquent, la présente invention concerne une méthode pour déterminer si un sujet a une prédisposition à ou une susceptibilité de développer un cancer choisi parmi la liste suivante : un mélanome cutané malin, un cancer du rein, un cancer de la thyroïde, un sarcome, un neuroblastome, une tumeur du système nerveux central (TSNC), un lymphome, un cancer du poumon, une polyglobulie, et des combinaisons de ceux-ci, comprenant la détermination dans un échantillon biologique du sujet de la présence d'une mutation dans *MITF* (facteur de transcription associé à la

microphthalmie) diminuant ou abolissant la sumoylation de MITF, la présence de cette mutation indiquant que le sujet a une prédisposition à ou une susceptibilité de développer un tel cancer. Dans un mode de réalisation particulier, notamment lorsque la mutation dans MITF est E318K (c'est-à-dire E318K dans l'isoforme 4 ou la substitution du résidu Glu correspondant dans les autres isoformes de MITF par un résidu Lys), le cancer est un mélanome cutané malin ou une combinaison d'un mélanome cutané malin et d'un autre cancer, en particulier un cancer choisi parmi un cancer neuroendocrinien, un sarcome, un neuroblastome ou une tumeur du système nerveux (TSN), un lymphome, un cancer du poumon, un cancer du rein, un cancer du sein, un cancer du pancréas, une tumeur pédiatrique, un cancer du système hématopoïétique, un cancer du système digestif, une polyglobulie et des combinaisons de ceux-ci. Le cancer peut également être choisi parmi un cancer du rein, un cancer de la thyroïde, un sarcome, un neuroblastome, une tumeur du système nerveux central (TSNC), un lymphome, un cancer du poumon, une polyglobulie, et de combinaisons de ceux-ci. Dans un mode de réalisation particulier, la combinaison est celle d'un mélanome cutané malin et d'un cancer du rein.

De préférence, la mutation est une substitution d'un résidu lysine et/ou d'un résidu acide glutamique d'un des sites de sumoylation de MITF ou des deux sites. Ainsi, la mutation est la substitution d'un résidu sélectionné dans le tableau ci-dessous par un quelconque des 19 autres acides aminés.

Isoforme	Ref transcrit	Ref protéine	1 ^{er} site de sumoylation		2 ^{ème} site de sumoylation	
ISOFORM 1	NM_198159	NP_937802	K289	E291	K417	E419
ISOFORM 2	NM_198177	NP_937820	K273	E275	K401	E403
ISOFORM 3	NM_006722	NP_006713	K288	E290	K416	E418
ISOFORM 4	NM_000248	NP_000239	K182	E184	K316	E318
ISOFORM 5	NM_198158	NP_937801	K182	E184	K310	E312
ISOFORM 6	NM_198178	NP_937821	K126	E128	K254	E256

Plus précisément, un résidu lysine peut être substitué par un quelconque des 19 autres acides aminés ; et/ou, un résidu acide glutamique peut être substitué par un quelconque des 19 autres acides aminés.

De préférence, la méthode comprend la détection d'une substitution du résidu « K316 » (c'est-à-dire K316 dans l'isoforme 4 ou le résidu Lys correspondant dans les autres isoformes de MITF) et/ou du résidu « E318 » (c'est-à-dire E318 dans l'isoforme 4 ou le résidu Glu correspondant dans les autres isoformes de MITF) par un quelconque
5 des 19 autres acides aminés.

Dans un mode de réalisation préféré, la méthode comprend la détection d'une substitution du résidu « E318 » (c'est-à-dire E318 dans l'isoforme 4 ou le résidu Glu correspondant dans les autres isoformes de MITF) par un quelconque des 19 autres acides aminés. Dans un mode de réalisation encore plus préféré, la méthode comprend
10 la détection de la mutation « E318K » (c'est-à-dire E318K dans l'isoforme 4 ou la substitution du résidu Glu par un résidu Lys correspondante dans les autres isoformes de MITF).

La mutation peut être détectée au niveau protéique ou nucléique. Les techniques pour identifier la mutation telle que définie ci-dessus dans le gène *MITF* ou ses
15 transcrits (ARNm) sont bien connues de l'homme du métier et incluent notamment et de manière non-exhaustive le séquençage, l'hybridation sélective et/ou l'amplification sélective. Au niveau nucléique, la détection peut se faire sur un échantillon d'ADN génomique, d'ARNm, ou d'ADNc.

Notamment, le séquençage de MITF peut être complet ou partiel. En effet, la
20 méthode peut comprendre uniquement le séquençage de la région comprenant le résidu suspecté d'être muté et même uniquement le séquençage de ce résidu particulier.

Par hybridation sélective est entendu que l'ADN génomique, l'ARN ou l'ADNc est mis en présence d'une sonde spécifique de MITF du mutant et éventuellement d'une sonde témoin spécifique de MITF ne présentant pas cette mutation ou de MITF
25 sauvage. Les sondes peuvent être en suspension ou immobilisées sur un substrat. Typiquement, les sondes seront marquées pour être plus facilement détectables. Les sondes sont notamment des molécules d'acide nucléique simple-brin de 8 à 1000 nucléotides, de préférence de 10 à 800 ou de 15 à 50 nucléotides.

L'acide nucléique peut être amplifié avant détection de la mutation. Ainsi, un
30 couple d'amorces spécifiques des régions entourant la position de la mutation à détecter (c'est-à-dire en amont et en aval) sera conçue. Typiquement, les amorces sont des molécules d'acides nucléiques simple-brin de 5 à 60 nucléotides, de préférence de 8 à 25 nucléotides. Une complémentarité parfaite est préférée puisqu'elle assure une haute

spécificité. Cependant, certains mésappariements peuvent être tolérés. Une fois l'amplification du gène *MITF* ou de l'exon contenant la mutation, ou encore d'un de ses transcrits faite, l'amplicon est utilisé pour la détection de la présence de la mutation par séquençage ou hybridation spécifique ou par toute autre technique appropriée connue de l'homme du métier. La mutation peut également être détectée par analyse des courbes de fusion (voir par exemple, WO2007/035806).

La présence de la mutation peut également être détectée par amplification sélective du mutant. Ainsi, un couple d'amorces est préparé, l'une des amorces s'hybridant spécifiquement avec la séquence portant la mutation à détecter. Cette amorce sera capable d'initier l'amplification ou de s'hybrider avec sa cible uniquement si la séquence porte le nucléotide muté. Par conséquent, la présence d'un amplicon indiquerait que *MITF* porte la mutation testée alors, que l'absence de cet amplicon indiquerait que *MITF* ne présente pas cette mutation.

Bien entendu, ces techniques peuvent être facilement adaptées par l'homme du métier pour détecter simultanément ou en parallèle plusieurs mutations du ou des site(s) de sumoylation. Ainsi, les techniques permettraient de détecter une ou plusieurs mutations codant pour la substitution de résidus sélectionnés parmi le groupe constitué de K182, E184, K316 et E318 dans l'isoforme 4 de *MITF* ou des résidus correspondant dans les autres isoformes de *MITF*.

Lorsque la mutation est détectée au niveau protéique, la méthode utilise un anticorps capable de discriminer entre *MITF* présentant la mutation à détecter et *MITF* ne présentant pas cette mutation. Notamment, l'échantillon biologique est mis en contact avec un anticorps spécifique de *MITF* présentant la mutation à détecter et la présence de complexe immun est détectée. Différentes méthodes permettent de détecter ces complexes immuns comme les méthodes d'ELISA, radio-immuno-essai (RIA) et tests immuno-enzymatiques (IEMA). Par « anticorps » sont également désignés tous les fragments et dérivés d'anticorps conservant la capacité de se fixer spécifiquement au mutant à détecter de *MITF* par rapport au *MITF* ne présentant pas cette mutation. Là encore, ces techniques peuvent être facilement adaptées par l'homme du métier pour détecter simultanément ou en parallèle plusieurs mutations du ou des site(s) de sumoylation. Ainsi, les techniques permettraient de détecter une ou plusieurs substitution(s) de résidus sélectionnés parmi le groupe constitué de K182, E184, K316 et E318 dans l'isoforme 4 de *MITF* ou des résidus correspondant dans les autres

isoformes de MITF, par exemple à l'aide d'une combinaison d'anticorps spécifique de chaque mutant de MITF présentant une ou plusieurs de ces substitutions.

De manière alternative, la mutation diminuant ou abolissant la sumoylation de MITF peut être détectée au niveau protéique de manière indirecte. Ainsi, la présence de la mutation peut être détectée en mesurant la sumoylation de MITF, une diminution de la sumoylation par rapport à la protéine MITF sauvage indiquant la présence de la mutation. Les exemples détaillent comment mesurer cette sumoylation. De même, la mutation diminuant la sumoylation, la protéine MITF mutée est stabilisée et donc détectable dans des coupes tissulaires par immunohistochimie ou immunofluorescence. La détection de la mutation ou de la présence/absence de sumoylation pourrait également se faire par spectrométrie de masse (WO/2005/003390).

Dans un mode de réalisation particulièrement intéressant de la présente invention, la mesure de la sumoylation de *MITF* se fait de manière indirecte par la détermination de la localisation cellulaire de *MITF* détectée par immunohistochimie ou immunofluorescence. En effet, de manière surprenante et très originale, la diminution de la sumoylation de la protéine *MITF* entraîne une modification de la localisation cellulaire de la protéine *MITF* visible par immunohistochimie dans les cellules tumorales. La protéine sauvage présente une localisation uniquement ou essentiellement nucléaire alors que la protéine portant la mutation diminuant la sumoylation de la protéine, en particulier la mutation E318K, présente une localisation à la fois nucléaire et cytoplasmique. Ainsi, la présente invention concerne une méthode dans laquelle la mutation diminuant la sumoylation de *MITF* est détectée par la détermination de la localisation cellulaire de *MITF* en immunohistochimie, une localisation nucléaire étant indicatif de la protéine MITF sauvage alors qu'une localisation nucléaire et cytoplasmique étant indicatif de la protéine *MITF* présentant une mutation diminuant la sumoylation de *MITF*, en particulier *MITF* mutée E318K. La mutation peut aussi permettre une détection par IHC ou IF de la protéine MITF dans des tissus où la forme sauvage est indétectable par ces mêmes méthodes.

La mutation peut être détectée dans une quelconque isoforme de MITF. Dans un mode de réalisation particulier, la mutation est détectée dans l'isoforme 4.

Le terme « sujet » réfère ici à un mammifère, de préférence à un humain.

Le terme « échantillon biologique » réfère ici à un échantillon de tissu sain ou tumoral, par exemple une biopsie et notamment une biopsie de peau, de rein, de

thyroïde, ou de poumon, ou de liquide biologique, par exemple un échantillon de sang, de liquide céphalo-rachidien, d'urine, ou de lymphe. De préférence, l'échantillon biologique est un échantillon de sang. Les méthodes de la présente invention peuvent comprendre une étape préalable de prélèvement de l'échantillon biologique.

5 Bien entendu, les méthodes de la présente invention considèrent également, outre la détection de la mutation diminuant ou abolissant la sumoylation de MITF, la détection d'autres marqueurs de prédisposition au cancer.

La présente invention concerne également l'utilisation de moyens de détection de la mutation diminuant ou abolissant la sumoylation de MITF pour la préparation
10 d'un kit de diagnostic destiné à déterminer si un sujet a une prédisposition à ou une susceptibilité de développer un cancer choisi parmi la liste suivante : un mélanome cutané malin, un cancer neuroendocrinien, un sarcome, un neuroblastome ou une tumeur du système nerveux (TSN), un lymphome, un cancer du poumon, un cancer du rein, un cancer du sein, un cancer du pancréas, une tumeur pédiatrique, un cancer du
15 système hématopoïétique, un cancer du système digestif, une polyglobulie, et des combinaisons de ceux-ci, la présence de cette mutation indiquant que le sujet a une prédisposition à ou une susceptibilité de développer un tel cancer. Dans un mode de réalisation particulier, le cancer est choisi parmi un mélanome cutané malin, un cancer du rein, un cancer de la thyroïde, un sarcome, un neuroblastome, une tumeur du système
20 nerveux central (TSNC), un lymphome, un cancer du poumon, un polyglobulie et des combinaisons de ceux-ci. De manière préférée, le cancer est choisi parmi un mélanome cutané malin, un cancer du rein, et une combinaison de ceux-ci. Les moyens de détection peuvent comprendre ou consister en une sonde spécifique de MITF portant la mutation à détecter, un couple d'amorces permettant l'amplification d'un segment
25 nucléotidique comprenant la mutation à détecter, un couple d'amorces dont l'une d'elles s'hybride spécifiquement avec la séquence portant la mutation à détecter (permettant ainsi une amplification sélective du mutant à détecter de MITF), un anticorps spécifique du mutant à détecter de MITF, des moyens permettant la détection et la mesure de la sumoylation de MITF, des contrôles négatifs permettant de détecter MITF ne présentant
30 pas la mutation à détecter, ou des combinaisons de ceux-ci. Dans un mode de réalisation particulier, notamment lorsque la mutation dans MITF est E318K (c'est-à-dire E318K dans l'isoforme 4 ou la substitution du résidu Glu correspondant dans les autres isoformes de MITF par un résidu Lys), le cancer est un mélanome cutané malin ou une

combinaison d'un mélanome cutané malin et d'un autre cancer, en particulier d'un cancer choisi parmi cancer neuroendocrinien, un sarcome, un neuroblastome ou une tumeur du système nerveux (TSN), un lymphome, un cancer du poumon, un cancer du rein, un cancer du sein, un cancer du pancréas, une tumeur pédiatrique, un cancer du système hématopoïétique, un cancer du système digestif, une polyglobulie, et des combinaisons de ceux-ci. Dans un mode de réalisation particulier, le cancer est choisi parmi un mélanome cutané malin, un cancer du rein, un cancer de la thyroïde, un sarcome, un neuroblastome, une tumeur du système nerveux central (TSNC), un lymphome, un cancer du poumon, un polyglobulie et des combinaisons de ceux-ci. De manière préférée, le cancer est choisi parmi un mélanome cutané malin, un cancer du rein, et une combinaison de ceux-ci.

L'intérêt de la détection d'une prédisposition ou d'une susceptibilité au cancer est que le sujet peut bénéficier d'un suivi clinique ou d'une surveillance permettant de détecter l'apparition d'un cancer à un stade précoce et donc d'augmenter les chances de guérison. Par ailleurs, la détection de la mutation peut permettre d'orienter la prise en charge thérapeutique du patient et/ou d'augmenter l'efficacité des traitements. Par ailleurs, le sujet identifié peut également bénéficier d'un traitement préventif. Ce traitement est destiné à empêcher ou retarder l'apparition du cancer.

Ainsi, la présente invention concerne également une méthode pour sélectionner les patients pouvant bénéficier d'un traitement préventif ou d'une surveillance médicale comprenant la détermination de la susceptibilité au cancer du patient par la méthode selon la présente invention et la sélection des sujets présentant la mutation diminuant ou abolissant la sumoylation de MITF.

Le traitement préventif envisagé peut comprendre l'administration de composés polyphénoliques. En effet, il a été notamment montré que des composés polyphénoliques de l'enveloppe du riz fermentée diminuent le niveau de protéine MITF (5). Ainsi, ce traitement pourrait contrecarrer la diminution de la sumoylation de la protéine MITF et ses conséquences fonctionnelles sur ses gènes cibles, MITF étant un facteur de transcription. Par ailleurs, les polyphénols du thé noir ont une action chimiopréventive qui pourrait se faire par un arrêt du cycle cellulaire et par un mécanisme pro-apoptique (6). Par conséquent, la présente invention concerne les composés polyphénoliques pour une utilisation dans le traitement préventif du cancer chez des sujets présentant une mutation de MITF diminuant ou abolissant la

sumoylation de MITF et l'utilisation de composés polyphénoliques pour la préparation d'un médicament destiné au traitement préventif du cancer (chimio-prévention) chez des sujets présentant une mutation de MITF diminuant ou abolissant la sumoylation de MITF. Elle concerne en outre une méthode de traitement comprenant l'administration
5 d'une dose thérapeutique efficace de composés polyphénoliques à des sujets présentant une mutation de MITF diminuant ou abolissant la sumoylation de MITF, prévenant ou retardant ainsi l'apparition d'un cancer. De préférence, les composés polyphénoliques sont des composés polyphénoliques de l'enveloppe du riz fermentée ou des polyphénols du thé noir. La demande de brevet WO 05/099721 décrit également de nombreux autres
10 composés polyphénoliques utiles pour la prévention du cancer, notamment via leur effet antioxydant.

L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples qui suivent, lesquels se veulent illustratifs et non limitatifs.

15 **BREVE DESCRIPTION DES FIGURES**

Figure 1 : (Fig 1a) Arbre généalogique de la première famille à cas multiples de mélanomes dans laquelle le mutant MITF E318K a été identifié ; (Fig 1b) électrophorégramme de la mutation constitutionnelle (sang) chez une personne atteinte de mélanome et cancer du rein.

20 Figure 2 : Activation de la transcription du promoteur de HIF1A mais pas de MET en présence de la protéine MITF portant la mutation E318K par rapport à la protéine MITF sauvage.

Figure 3 : Diminution de la sumoylation de la protéine MITF portant la mutation E318K.

25 Figure 4 : La mutation E318K diminue la sumoylation de la protéine MITF. Fig 4a) Des cellules HEK293 ont été co-transfectées avec un plasmide codant pour MITF couplée à myc sauvage ou mutée (K182R ; E318K ; K182R/E318K) et un plasmide vide pSG5 ou codant pour His-SUMO1. Les cellules ont été lysées dans un tampon bouillant et testées par western blot pour MITF et ERK2 pour s'assurer la charge
30 suffisante de chaque ligne. Fig 4b) Des cellules HEK293 ont été co-transfectées avec un plasmide codant pour MITF couplée à myc sauvage ou mutée (K182R ; E318K ; K182R/E318K) et un plasmide vide pSG5 ou codant pour His-SUMO2. Les cellules ont été testées par western blot pour MITF et ERK2. Fig 4c) Des cellules HEK293 ont été

co-transfectées avec un plasmide codant pour MITF couplée à myc sauvage ou mutée (K182R ; E318K ; K182R/E318K) et un plasmide vide pSG5 ou codant pour His-SUMO1. Les lysats cellulaires ont été purifiés en utilisant des colonnes Ni-NTA et analysés par western blot pour MITF (panneau du haut). Un western blot a été fait sur les lysats cellulaires avant purification pour contrôler l'expression de MITF et la charge suffisante de chaque ligne (panneau du bas).

Figure 5 : La mutation E318K pourrait affecter la localisation cellulaire de MITF et changer son activité transcriptionnelle. Fig 5a) Une analyse par immunofluorescence de cellules HEK293 transfectées avec un plasmide codant pour MITF couplée à myc sauvage ou mutée (K182R ; E318K ; K182R/E318K) et colorées avec un anti-myc suivi par un anticorps secondaire anti-souris marqué par Alexafluor 594. Les noyaux cellulaires ont subi une coloration par contraste avec du DAPI. La barre représente 10 μ m. Fig 5b) Coloration immunohistochimique de mélanomes et de cancers du rein avec des anticorps anti-MITF (x200). Les mélanomes avec MITF sauvage montrent une coloration nucléaire alors que les mélanomes avec MITF muté E318K montrent une coloration nucléaire et cytoplasmique. Le cancer du rein avec MITF sauvage ne montre pas de marquage alors que le cancer du rein avec MITF muté E318K montrent une coloration nucléaire et cytoplasmique. Fig 5c) Des cellules HEL293 ont été transfectées de manière transitoire avec un plasmide rapporteur luciférase synthétique qui contient 3 copies d'une boîte M et avec un plasmide pCDNA3 vide ou codant MITF sauvage ou mutée. L'activité luciférase a été normalisée par l'activité β -galactosidase et les résultats ont été exprimés comme le facteur de stimulation de l'activité luciférase de base pour des cellules non-stimulées.

Figure 6 : Des mélanocytes mutants montrent une pigmentation plus faible. Les culots cellulaires et la mesure de mélanine dans les mélanocytes de deux donneurs sains par rapport à des mélanocytes isolés d'une biopsie de peau de patients présentant la mutation E318K. (***) indique une différence significative avec une p-value inférieure à 0.001 entre les tests. Les deux donneurs ainsi que les porteurs sont d'origine caucasienne.

Figure 7 : La mutation E318K confère un avantage de croissance. Des mélanocytes de souris immortalisés melan-a (gauche), des cellules de mélanome humain métastatique A375 (milieu) et des cellules de carcinome rénal humain RCC4 (droite) ont été transfectés avec un vecteur vide, un vecteur codant la protéine MITF

sauvage (Mi-WT) ou mutante (Mi-E318K). Des photos à 2 semaines (en haut) et l'absorbance après coloration/décoloration au violet cristal des clones (en bas) sont montrées.

EXEMPLES

5 Exemple 1

Les inventeurs ont étudié le gène MITF, considéré comme un oncogène et donc comme gène candidat. Ils ont d'abord étudié s'il existait des mutations du gène MITF (3p14) dans le site de clivage par les caspases (effet anti-apoptotique) dans des familles à cas multiples de mélanome (4), par séquençage de toutes les isoformes. Leurs résultats
10 préliminaires ont montré la présence d'un variant germinal de MITF-M c.952G>A, p.Glu318Lys (E318K) dans une famille d'origine basque espagnole (TRY) à cas multiples de mélanome (avec 2 cancer du rein, 3 tumeurs du système nerveux central, un cancer du poumon et un cancer gastrique du coté maternel d'où vient la E318K), avec transmission coté paternel d'un haplotype 1p22. Le variant était absent chez 180
15 témoins français/caucasiens et 96 basques espagnols (Figure 1 a et b).

Dans des cellules de mélanome B16 (souris), les inventeurs ont montré que le variant MITF, c.952G>A, p.Glu318Lys (E318K) avait une action supérieure à la forme sauvage pour induire la transcription du gène HIF1a et pas celle du gène MET (Figure 2). Les inventeurs ont donc posé l'hypothèse suivante : HIF est le facteur transformant
20 des cellules rénales en l'absence de VHL, en situation d'hypoxie; VHL (mutations pertes de fonction d'un gène suppresseur de tumeur) et MET (mutations activatrices d'un oncogène) sont deux gènes de prédisposition au cancer du rein ; HIF1aF activé par MITF muté E318K pourrait donc avoir le même effet que l'absence de VHL. Les inventeurs ont donc montré que la mutation E318K du gène MITF était présente chez
25 4/55 patients et absente chez 276 témoins ($p=0,0007$) de la sous-collection « mélanome et cancer du rein (cas sporadiques) » de la collection MELARISK. Les inventeurs ont ensuite exploré la fréquence du mutant E318K dans différentes collections biologiques de l'IGR (Institut Gustave Roussy, Villejuif, France). D'autres porteurs de cette mutation ont été identifiés : une patiente ayant développé un cancer du rein juvénile à
30 translocation TFE3 dont la mère avait eu un cancer du sein puis un mélanome, une patiente ayant développé 3 mélanomes et un lymphome; un cas index d'une famille à cas multiple de mélanome; un cas index ayant développé plusieurs mélanomes ; deux patients ayant développé des mélanomes nodulaires ; une patiente ayant développé un

mélanome, un de ses oncles ayant eu une TSNC ; deux patients ayant développé un cancer papillaire du rein ; un patient atteint de polyglobulie. En effet, VHL est l'un des trois gènes de prédisposition à la polyglobulie.

Tableau 1 : Résultats du criblage du mutant MITF E318K

Mélanome et cancer du rein	Nb échantillon	MITF sauvage	MITF E318K	p-value
Sporadique	55	51	4	0,0007
Familial	50	49	1	0,1534
Sporadique et familial	105	100	5	0,0015
Cancer papillaire du rein	24	22	2	0,0062
Mélanome et TNSC, familial			1	0,1687
Polyglobulie	14	13	1	0,0483
Lymphome	16	15	1	0,0548
Mélanomes				
Mélanomes multiples Familiaux	107	106	1	0,2794
Mélanomes multiples Sporadiques	34	33	1	0,1097
Mélanomes nodulaires	90	88	2	0,0600
Mélanomes multiples cutanés familiaux	49	48	1	0,1508

5 Les populations témoins utilisées sont celles des donneurs du sang et du CEPH (N=276).

Exemple 2

Identification de mutations germinales de MITF dans des patients présentant des mélanomes et des cancers du rein

10 Dans le but de confirmer l'identification du variant de *MITF* résultant d'une substitution faux-sens p.E318K (c.952G>A, dans l'isoforme M de *MITF*, NM_000248) associés à une coexistence de mélanomes et de cancers du rein, les inventeurs ont séquencé la séquence codante entière du gène, les liaisons intron-exon et les 8 promoteurs alternatifs chez 62 patients qui présentent à la fois un mélanome et un

cancer du rein. Les inventeurs ont observé cette substitution dans 5 des 62 patients. La fréquence de ce variant est significativement plus élevée que dans une population contrôle de 1824 personnes (4% vs 0,3%, $p = 9,7 \times 10^{-5}$). Ainsi, porter le variant p.E318K conduit à une augmentation de 14 fois pour le risque de développer à la fois un

5 mélanome et un cancer du rein (risque relatif approché (OR) = 14,46 [intervalle de confiance de 95% = 3,79 à 46,82] (Tableau 2)). Pour confirmer que ce variant a un effet sur la susceptibilité à un mélanome seul, les inventeurs ont génotypé 704 patients présentant des mélanomes (qui sont négatifs pour les mutations de prédisposition aux mélanomes de *CDKN2A* et *CDK4*) incluant 422 cas indépendants avec des antécédents

10 familiaux de mélanomes, 242 cas sporadiques avec des mélanomes multiples primaires et 40 cas sporadiques avec un mélanome nodulaire (Tableau 2). Les derniers cas ont été testés car 4 patients sur 5 présentant développer à la fois un mélanome et un cancer du rein et portant la mutation p.E318K ont un moins un mélanome nodulaire (celui-ci étant le type histologique de mélanome le plus rare). La fréquence de p.E318K est

15 significativement plus élevée chez tous les patients présent un mélanome seul par rapport aux contrôles (1,3% vs 0,3%, $p = 4,5 \times 10^{-5}$) et le fait de porter la mutation p.E318K est associé à une augmentation du risque de mélanome supérieure à 4 fois (risque relatif approché (OR) = 4,57 [intervalle de confiance de 95% = 2,05 à 10,68]). Cette augmentation du risque semble principalement due au groupe de patients

20 sporadiques à mélanomes primaires multiples (risque relatif approché (OR) = 7,10 [intervalle de confiance de 95% = 2,67 à 18,62]) alors que l'effet de p.E318K n'était pas significatif chez les patients à mélanome avec des antécédents familiaux de mélanomes (risque relatif approché (OR) = 2,78 [intervalle de confiance de 95% = 0,91 à 7,90]) ou chez les patients avec des mélanomes nodulaires (risque relatif approché (OR) = 8,67

25 [intervalle de confiance de 95% = 0,9 à 41,70] (Tableau 3)). Cependant, le test d'homogénéité de la fréquence de l'allèle p.E318K à travers ces trois groupes étant seulement marginalement significatif ($p = 0,06$). Le matériel biologique était disponible pour des membres supplémentaires affectés dans trois des sept familles sujettes aux mélanomes dans lesquels le proposant portait le variant. Dans chacune des ces familles,

30 p.E318K coségrège avec le mélanome. De manière alternative, pour examiner l'effet de p.E318K sur la susceptibilité au cancer du rein, les inventeurs ont génotypé ce variant dans 187 patients ayant un cancer du rein. La fréquence de p.E318K était également plus élevée chez les patients ayant un cancer du rein que des les contrôles (1,3% vs

0,3%, $p = 0,01$) et l'augmentation du risque de cancer du rein associé avec p.E318K était du même ordre de grandeur que celui observé pour le mélanome seul (risque relatif approché (OR) = 4,53 [intervalle de confiance de 95% = 1,22 à 14,30]) (tableau 2). Il n'y avait aucune preuve significative d'une hétérogénéité de p.E318K, la fréquence de l'allèle à travers les trois groupes de patients (mélanome+cancer du rein, mélanome seul et cancer du rein seul ; $p = 0,08$). Le regroupement de tous les patients augmente la significativité de la différence de fréquence de l'allèle p.E318K entre les cas et les contrôles (1,5% vs 0,3% ; $p = 2,5 \times 10^{-7}$). Dans l'ensemble, les porteurs de p.E318K ont une augmentation du risque de développer un mélanome, un cancer du rein ou les deux de plus de 5 fois (risque relatif approché (OR) = 5,17 [intervalle de confiance de 95% = 2,49 à 11,52]).

Pour estimer si p.E318K prédispose à l'association de mélanomes et d'un autre cancer différent du cancer du rein, les inventeurs ont génotypé 172 patients affectés par un mélanome et une autre tumeur primaire mais aucun porteur de p.E318K n'a pu être identifié (Tableau2). Puisque l'association de p.E318K avec une autre tumeur primaire est un évènement rare, les inventeurs ont planifié l'examen de séries plus larges.

Tableau 2 : Fréquence de la mutation germinale de *MITF* p ;E318K chez des patients souffrant de cancer

Type de tumeur	Nombre De Non-porteur	Nombre De porteur *	Total	Fréquence allèle minoritaire	FET p-value	OR [95%CI]
Contrôles	1813	11	1824	0.003	-	Ref
CM or/and RCC	924	29	953	0.015	2.5×10^{-7}	5.17 [2.49-11.52]
Les deux	57	5 ^a	62	0.040	9.7×10^{-5}	14.46 [3.79-46.82]
CM seul ^b	685	19 ^c	704	0.013	4.5×10^{-5}	4.57 [2.05-10.68]
RCC seul ^d	182	5 ^e	187	0.013	0.012	4.53 [1.22-14.30]
Melanome et autre cancer^f	172	0	172	0	0.61	-

OR = risque relatif approché ; 95%CI = intervalle de confiance de 95% ; p-value = probabilité critique du test ; CM = mélanome ; RCC = cancer du rein.

* Tous les porteurs sont hétérozygotes pour le variant p.E318K.

^a Les 5 patients ont développé un cancer du rein à cellules claires (ccRCC), 4 parmi les 5 patients ont développé au moins un mélanome nodulaire, et le 5^{ème} patient a développé un mélanome à extension superficielle (SSM).

^b Mélanomes familiaux (notamment avec au moins 2 cas confirmés de mélanomes dans la famille), 422 cas; cas sporadiques avec des mélanomes primaires multiples (MPM), 242 cas ; mélanome nodulaire sporadique, 40 cas.

^c Sur 19 porteurs, 7 sont des cas familiaux, 9 sont des cas sporadiques MPM et 2 sont des cas de melanoma nodulaire sporadique.

^d Cancer du rein à cellules claires (ccRCC), 54 cas sporadiques; carcinome papillaire rénal (PRC), 55 cas (22 cas ayant un type I, 30 cas ayant un type II, et 3 cas ayant un sous-type histologique inconnu) ; des phénotypes de cancer du rein mixtes (notamment, papillaire et à cellules claires), 2 cas ; cancer du rein pédiatrique, 5 cas ; Cancer du rein avec un sous-type histologique inconnu, 71 cas.

^e Sur 5 porteurs, un est un cas de cancer du rein à cellules claires ccRCC, 2 sont des cas de carcinome papillaire rénal de type II, 1 est un carcinome juvénile avec une translocation somatique t(X;17)(p11;q25) et 1 est un cas de carcinome papillaire rénal de type I.

^f Cancer du sein, 97 cas, cancer du cerveau, 27 cas, carcinome de la thyroïde non-médullaire, 28 cas, cancer du colon, 10 cas ; autres cancers (testicule, utérus, ovaire, prostate, sarcome et endomètre), 10 cas.

20 Test d'homogénéité des fréquences alléliques parmi les mélanomes seuls, les cancers du rein seuls et la combinaison des deux : $p = 0.078$ (test exact)

Tableau 3 : Fréquence de la mutation germinale de *MITF* p ;E318K chez des patients souffrant de mélanome seul

Type de tumeur	Nombre De Non-porteur	Nombre De porteur *	Total	Fréquence allèle minoritaire	FET p-value	OR [95%CI]
Contrôles	1813	11	1824	0.003	-	Ref
CM seul	685	19	704	0.013	4.5x 10 ⁻⁵	4.57 [2.05-10.68]
Familial	415	7	422	0.008	0.06	2.78 [0.91-7.90]
Mélanome primaire multiple (MPM)	232	10	242	0.021	4.1 x 10 ⁻⁵	7.10 [2.67-18.62]
Mélanome nodulaire	38	2	40	0.025	0.029	8.67 [0.90-41.70]

Test d'homogénéité des fréquences alléliques parmi les 3 catégories de mélanomes seuls (familial, MPM, nodulaire): $p = 0.065$ (test exact) si le test d'homogénéité est fait en comparant familial versus MPM: $p = 0.072$ (test exact)

5 Exemple 3

Conséquences fonctionnelles de la mutation p.E318K de MITF

Cette mutation E318K est située dans l'un des deux sites de sumoylation de la protéine (motif WKXE, 2 sites K182 et K316). Les inventeurs ont montré une diminution de la sumoylation de MITF en présence de la mutation E318K. (Figure 3).

10 Plus précisément, les inventeurs ont généré par mutagenèse dirigée le variant E318K. Par ailleurs, ils ont également préparé le variant K182R et un double mutant K182R :E318K.

Des expériences de Western blot sur des extraits totaux avec un anticorps anti-*MITF*, après coexpression de His-SUMO-1 avec *MITF* sauvage ont révélé la présence
15 d'une bande à 120 kD et un doublet à environ 90 kD, suggérant que MITF subit une sumoylation qui augmente son poids moléculaire (Figure 4A). Bien que l'ajout de protéines SUMO exogène a augmenté le niveau global de sumoylation de *MITF*, le western blot a montré que *MITF* est également sumoylé dans les conditions de base montrant le doublet à 90 kD, excluant ainsi un effet non-spécifique de la sur-expression
20 de SUMO. La mutation K182R a conduit à la disparition complète de la forme de *MITF* de poids moléculaire le plus élevé, mais n'affecte pratiquement pas la bande à 90 kD. Lorsque le codon 318 a été muté par une lysine, les inventeurs ont observé une diminution importante du niveau de toutes les bandes de haut poids moléculaire de *MITF*. Enfin, aucune forme de haut poids moléculaire de *MITF* n'a pu être observée
25 lorsque le double mutant a été utilisé. Des observations similaires ont été faites avec une co-expression de HA-SUMO-2 (Figure 4B) démontrant que le *MITF* sauvage a été modifié par SUMO1 ou SUMO2 et que la mutation E318K affecte à la fois les modifications de SUMO1 et SUMO2. Pour confirmer l'attachement de SUMO-1 à *MITF*, le plasmide His-SUMO-1 a été transfecté seul ou avec les constructions *MITF*.
30 Alors, les protéines contenant His-SUMO-1 ont été purifiées sur une colonne Ni-TFA. Dans les cellules transfectées avec *MITF* sauvage, le western blot avec un anti-*MITF* a révélé des formes de *MITF* sumoylées migrant à environ 90 et 120 kD (Figure 4C). La mutation K182R affecte principalement la forme sumoylée de *MITF* à 120 kD alors

qu'aucune forme sumoylée de *MITF* n'a pu être observée avec E318K ou le double-mutant. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que le codon 316 est un site accepteur majeur de SUMO dans *MITF* et que la mutation E318K diminue drastiquement la sumoylation de *MITF*.

5

Exemple 4

La mutation E318K pourrait changer la localisation de MITF et elle altère son activité transcriptionnelle

La sumoylation orchestre de multiples processus cellulaires en partie par le contrôle de la transduction du signal nucléo-cytoplasmique et de la transcription. Les inventeurs ont examiné si le mutant E318K avec une sumoylation diminuée pouvait altérer la localisation cellulaire de *MITF* (Figure 5A). La coloration par immunofluorescence avec un anticorps anti-*MITF* a montré que le mutant E318K mais également K182R et K182R :E318K ont été détectés dans le noyau des cellules de mélanome, ce qui est cohérent avec la localisation nucléaire de la forme sauvage de *MITF*. Cependant, des expériences d'immuno-histochimie ont permis de montrer, avec des échantillons de mélanome et de cancer du rein, un marquage nucléaire et cytoplasmique pour les mutants E318K (Figure 5B).

10

15

Type de marquage	Nucléaire	Nucléaire+cytoplasmique	Aucun
Mélanome contrôle	8/9	1/9	0/9
Mélanome porteur de E318K	0/8	8/8	0/8
Cancer du rein contrôle	0/6	0/6	6/6
Cancer du rein porteur de E318K	0/6	2/6	4/6

Les inventeurs ont également exploré l'effet possible de la substitution E318K sur l'activité transcriptionnelle de *MITF*. Ils ont comparé l'activité de la forme sauvage versus le mutant E318K sur un rapporteur synthétique qui contient 3 copies d'une boîte M apposée à un promoteur minimal SV40. Le mutant E318K a montré une activité transcriptionnelle 2-3 fois plus élevée que celle de la forme sauvage (Figure 5C). Le double mutant était encore plus efficace que le mutant E318K, alors que le simple mutant K182R a montré une activité comparable à celle de la forme sauvage. Ces résultats indiquent que la sumoylation diminue l'activité transcriptionnelle de *MITF*. Les inventeurs ont ensuite vérifié l'effet de la mutation E318K sur des promoteurs physiologiques. Ils se sont concentrés sur MET et HIF1A, deux gènes cibles de *MITF*

20

25

impliqués dans la tumorigenèse des mélanocytes et du rein. La forme sauvage de *MITF* et le mutant E318K ont montré des activités transcriptionnelles similaires pour le promoteur MET (Figure 2) alors que le mutant E318K présentant une activité transcriptionnelle plus élevée du promoteur HIF1A en comparaison de la forme sauvage. Par conséquent, la mutation p.E318K peut exercer son effet oncogénique via une régulation transcriptionnelle exacerbée de HIF1A.

Exemple 5

La mutation E318K confère un phénotype cellulaire moins différencié et plus prolifératif

La production de pigment est un trait de la différenciation des mélanocytes caractérisée par une croissance réduite alors que les cellules faiblement pigmentées corrélatent étroitement avec des phénotypes prolifératifs et moins différenciés. De plus, l'hypoxie et HIF1A soutiennent la survie, la prolifération et la transformation des mélanocytes, et la progression des mélanomes. Par conséquent, les inventeurs ont trouvé que des mélanocytes isolés de biopsies de peau d'un patient portant la mutation germinale étaient moins pigmentés que les mélanocytes de deux donneurs sains ne portant pas la mutation, tous trois de type caucasien (Figure 6). La transcription de *MITF* est modifiée par deux voies de signalisation par des récepteurs, incluant le récepteur de la mélanocortine-1 (MC1R). Enfin, en comparaison de *MITF* sauvage, l'expression de E318K stimulait la croissance des mélanocytes immortalisés (Figure 7A Melan-a), des cellules de mélanomes (Figure 7B, A375) et aussi des cellules de carcinome de rein déficient en VHL (Figure 7C, RCC4). Pris ensemble, les données suggèrent que le mutant de *MITF* E318K confère un avantage de croissance constitutif.

25

Matériels et Méthodes

Melarisk est une collection unique de familles enclines aux mélanomes (MELARISK) qui a été initiée en 1985 par l'Institut Gustave Roussy (Pr AVRIL) et l'INSERM ((Florence Demenais, U946), avec une participation des dermatologues (en particulier, depuis 2005 le CHU Cochin, Pr AVRIL et les Hospices Civils de Lyon, Pr THOMAS) et d'oncogénéticiens. Le matériel biologique est conservé à la Biobanque de susceptibilité au cancer de l'IGR (sang, lymphocytes congelés, lignées cellulaires lymphoblastiques établies par le Généthon, ADN). Les données familiales,

30

démographiques, cliniques et de facteur de risque de mélanome ont été collectées depuis plusieurs années maintenant et sont stockées dans une base de données MySQL dans l'unité INSERM U946.

Séquençage direct de *MITF*

5 Les amorces utilisées pour le séquençage de *MITF* sont données dans le tableau ci-dessous. Le protocole d'amplification consistait en 35 cycles avec des étapes de température à 94°C, 60°C, et 72°C de 30 secondes chacune.

Les produits de PCR ont été séquencés avec la technique de « Big Dye Terminator », version 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, Californie) sur des
10 séquenceurs ABI Prism[®] 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Californie).

Tableau. Séquences des amorces pour le gène *MITF*

Fragment amplifié	Séquence Sens 5' > 3'	Séquence Antisens 5' > 3'	Taille du produit (pb)
Exon 1a_part1	SEQ ID NO 1	SEQ ID NO 2	377
Exon 1a_part2	SEQ ID NO 3	SEQ ID NO 4	394
Exon 1b	SEQ ID NO 5	SEQ ID NO 6	298
Exon 1e	SEQ ID NO 7	SEQ ID NO 8	232
Exon 2 / Exon 1c	SEQ ID NO 9	SEQ ID NO 10	396
Exon 1 (M)	SEQ ID NO 11	SEQ ID NO 12	389
Exon 2	SEQ ID NO 13	SEQ ID NO 14	426
Exon 3	SEQ ID NO 15	SEQ ID NO 16	271
Exon 4	SEQ ID NO 17	SEQ ID NO 18	257
Exon 5	SEQ ID NO 19	SEQ ID NO 20	447
Exon 6a/6b	SEQ ID NO 21	SEQ ID NO 22	280
Exon 7	SEQ ID NO 23	SEQ ID NO 24	320
Exon 8	SEQ ID NO 25	SEQ ID NO 26	563
Exon 9	SEQ ID NO 27	SEQ ID NO 28	544

Génotypage de la mutation *MITF* E318K par PCR avec une sonde MGB

Taqman

15 Les réactions de PCR ont été faites avec 10 ng d'ADN génomique en présence de 0.2 µmol/L sondes MGB TaqMan soit (5'-VIC-ATC AAG CAA GAA CCC G-3' - SEQ ID No 29) qui s'apparie parfaitement avec la séquence de *MITF* sauvage ou (5'-6-FAM-CAA GCA AAA ACC CG-3' - SEQ ID No 30) qui s'apparie parfaitement avec la séquence de *MITF* qui code la mutation E318K. Les concentrations finales des autres
20 réactifs ont été les suivantes: 1× Universal Master mix (Applied), 0,4 µmol/L d'amorce sens (5'-TGCTCTCCAGATTTGGTGAATCG-3' - SEQ ID No 31), 0,4 µmol/L d'amorce antisens (5'-GGTCTTGGCTGCAGTTCTCAA-3' - SEQ ID No 32). La taille

de l'amplicon de PCR est de 67 pb. Le cyclage de PCR a été fait sur un thermocycleur 2720 ABI™ comme suit: 95 °C pendant 15 min; 30 cycles de 95 °C pendant 15 s et 60 °C pendant 1 min. La discrimination allélique a été faite par mesure finale de fluorescence sur un 7900HT Fast real Time PCR system ABI™ et analysée en utilisant le logiciel SDS v2.3 ABI™. Des échantillons d'ADN soit sauvage soit E318K ont été inclus dans chaque expérience de génotypage comme contrôles. Les échantillons mutés génotypés ont été vérifiés par séquençage direct en utilisant le protocole et les amorces ci-dessus détaillés pour l'exon 9 de *MITF*.

Plasmides

La construction pCDNA3-Mi de la forme M de *MITF* a été décrite précédemment (7). Les mutations de *MITF*, K182R et/ou E318K, ont été générées avec la méthode QuickChange (Stratagene) en utilisant les amorces sens suivantes et leurs compléments antisens: Mi-K182R 5'-cttcccaacataagaaggagctcacagc-3' (SEQ ID No 33); MI-E318K 5'-ggatcatcaagcaaaaaccagttcttgag-3' (SEQ ID No 34). La présence de mutations a été confirmée par séquençage.

His-SUMO1 et His-HA-SUMO2 étaient des dons de M. A. Dejean et ont été décrits dans l'article suivant (8).

Co-transfections et immunodétection

Des cellules HEK293 cultivées sur des plaques à 6 puits (10^4 cellules/puit) ont été transfectées avec les plasmides indiqués (2 µg d'ADN total/puit) et du FuGENE 6™ (Roche Applied Science). 48 heures après, les cellules ont été lavées avec du PBS puis lysées à 95 °C dans 1×tampon de charge (41,6 mM Tris, pH 6,8, 1,5% SDS, 6,7% glycérol) et portées à ébullition pendant 5 minutes supplémentaires.

Les protéines ont été séparées par électrophorèse dans un gel 10% SDS-polyacrylamide et transférées sur des membranes PVDF. Les protéines ont été détectées en utilisant l'ECL (Amersham) et des anticorps anti-MITF (Abcam), anti-HA tag (Abcam), anti-SUMO1 (Santa Cruz Biotech) ou anti-ERK2 (Santa Cruz Biotech).

Tests de mesures d'expression de rapporteurs

Des cellules humaines 501mel et de souris B16 ont étéensemencées dans des plaques à 24 puits (25×10^3 cellules/puit) et, les jours suivants, les cellules ont été transfectées de manière transitoire en utilisant 0,3 µg de plasmide rapporteur (pHIF1α et

pMet), 0,05 µg de plasmides codant MIT ou de pCDNA2 vide, 2 µl de réactif lipofectamine (Invitrogen) et 0,05 µg pCMVβGal pour contrôler la variabilité dans l'efficacité de transfection. Les cellules ont été lysées et testées pour les activités luciférase et β-galactosidase 48 heures après. Les transfections ont été répétées au moins trois fois.

Immunofluorescence

Les cellules HEK293 ont étéensemencées sur des lamelles de verre (100 x 10³ cellules) dans une plaque à 6 puits et transfectées avec 3 µg de plasmides MITF ou pCDNA3 vide en utilisant 10 µl de lipofectamine. 48 h plus tard, les cellules ont été fixées pendant 10 min avec du paraformaldéhyde 4% dans du PBS, lavées avec du PBS et perméabilisées pendant 2 min avec du Triton X-100 0,1%/albumine sérique bovine 1% (BSA). Ensuite, les échantillons ont été lavés une fois avec du PBS et traités avec NH₄Cl 50 mM pendant 2 min, puis lavés 3 fois dans du PBS, et colorés pendant 1 h avec un anticorps anti-MITF (Abcam) dans du BSA 1%/PBS. Les échantillons ont alors été lavés 3 fois dans du PBS pendant 5 min et coloré secondairement pendant 1 h avec un anticorps de chèvre anti-souris conjugué au Alexa-488 (Molecular Probes) dans BSA 1%. Les cellules ont été lavées une fois dans du PBS, subies une coloration de contraste avec du 4,6-diamino-2-phénylindole (DAPI), lavées 3 fois dans du PBS, et montées en utilisant Fluomount-G (Southern Biotech, Birmingham AL). Les cellules ont été examinées avec un microscope Zeiss Axiophot équipé avec une illumination épifluorescente.

Détermination du contenu en mélanine

Approximativement 6 x 10⁶ mélanocytes ont été culotés par centrifugation à 1000 g pendant 5 min et lavées deux fois avec un tampon phosphate. Une partie des culots a été solubilisée dans NaOH 0,5 M pendant 1 h à 80°C et les densités optiques ont été mesurées à 405 nm. L'autre partie a été utilisée pour déterminer le contenu en protéine par un test BCATM (Pierce). Le contenu en mélanine a été corrigé par la concentration en protéines et exprimé en pourcentage de cellules contrôles (100%).

Test de formation de colonies

Les cellules de mélanome humain A375 et de carcinome rénal humain RCC4 (80000 par puits) ont été transfectées avec un total par puits de 3 µg d'ADN (MITF sauvage ou E318K) incluant 10 % de pBABE-puro en utilisant Fugene (Roche). De la puromycine (1 µg/ml) a été ajoutée au milieu 48 h après transfection. 14 jours plus tard,

les cellules ont été fixées, colorées avec du cristal violet 0,4% et les plaques ont été photographiées. Les cellules ont également été décolorées avec de l'acide acétique 10 % dans du PBS et l'absorbance à 610 nm, reflétant le nombre de cellules, a été mesurée.

Immunohistochimie

5 Après déparaffinage des lames et avoir démasqué les antigènes à chaud dans une solution d'Antigen Unmasking solution (Vector Laboratories), les coupes ont été perméabilisées (0,3% triton / PBS 15min) puis rincées rapidement avec du PBS. Après avoir bloqué les peroxydases endogènes, les coupes ont été saturées pendant 30min dans une solution de PBS / BSA 1% / Sérum de chèvre 5%. Puis elles ont été incubées toute
10 la nuit à 4°C avec le 1^{er} anticorps anti MITF clone C5 (dilution 1/10 ou 1/100) dans une solution de PBS/BSA 1%. Après rinçage dans du PBS, les coupes ont été incubées avec le 2^{ème} anticorps biotinylé dans du PBS/BSA 1% 1h à température ambiante. Les coupes ont ensuite été rincées dans du PBS puis incubées dans une solution Avide/biotine HRP (Kit ABC Elite, Vector Laboratories). Après rinçage dans du PBS, les coupes ont été
15 révélées en présence d'un substrat de peroxydase (kit VIP, Vector Laboratories). Les lames ont finalement été montées au Mountex (Cell Path)

REFERENCES

1. Levy, C., et al. (2006) *Trends Mol. Med.*, **12**, 406-414.
- 20 2. Garraway, L.A., et al. (2005) *Nature*, **436**, 117-122.
3. Kido, K., et al. (2009) *Cancer Sci.* **100**, 1863-1869.
4. Larribere, L., et al. (2005) *Genes Dev.* **19**, 1980-1985.
5. Chung, S.Y., et al. (2009) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 1704-1710.
6. Halder, B., et al. (2009) *Carcinogenesis* **29**, 129-138.
- 25 7. Bertolotto C, et al. (1998) *J Cell Biol.* **142**:827-35.
8. Bischof O, et al. (2006) *Mol Cell*; **22**:783-94.

REVENDICATIONS

1- Méthode pour déterminer si un sujet a une prédisposition à ou une susceptibilité de développer un cancer choisi parmi un mélanome cutané malin, un cancer neuroendocrinien, un sarcome, un neuroblastome, une tumeur du système nerveux (TSN), un lymphome, un cancer du poumon, un cancer du rein, un cancer du sein, un cancer du pancréas, une tumeur pédiatrique, un cancer du système hématopoïétique, un cancer du système digestif, une polyglobulie, et des combinaisons de ceux-ci, comprenant la détermination dans un échantillon biologique du sujet de la présence d'une mutation dans MITF (facteur de transcription associé à la microphthalmie) diminuant ou abolissant la sumoylation de MITF, la présence de cette mutation indiquant que le sujet a une prédisposition à ou une susceptibilité de développer un tel cancer.

2- Méthode selon la revendication 1, dans laquelle la mutation dans MITF est une substitution d'un résidu lysine et/ou d'un résidu acide glutamique d'un des sites de sumoylation de MITF ou des deux sites.

3- Méthode selon la revendication 2, dans laquelle la mutation est la substitution d'un résidu sélectionné dans le tableau ci-dessous par un quelconque des 19 autres acides aminés.

Isoforme	SEQ ID No	Ref transcrit	Ref protéine	1 ^{er} site de sumoylation	2 ^{ème} site de sumoylation		
ISOFORM 1	35	NM_198159	NP_937802	K289	E291	K417	E419
ISOFORM 2	36	NM_198177	NP_937820	K273	E275	K401	E403
ISOFORM 3	37	NM_006722	NP_006713	K288	E290	K416	E418
ISOFORM 4	38	NM_000248	NP_000239	K182	E184	K316	E318
ISOFORM 5	39	NM_198158	NP_937801	K182	E184	K310	E312
ISOFORM 6	40	NM_198178	NP_937821	K126	E128	K254	E256

4- Méthode selon la revendication 3, dans laquelle la mutation est une substitution de K316 ou E318 de l'isoforme 4 ou du résidu correspondant dans les autres isoformes de MITF.

- 5- Méthode selon la revendication 4, dans laquelle la mutation est une substitution de E318 de l'isoforme 4 ou du résidu correspondant dans les autres isoformes de MITF, de préférence par un résidu Lysine.
- 5
- 6- Méthode selon l'une quelconque des revendications, dans laquelle la mutation est détectée au niveau protéique ou nucléique.
- 7- Méthode selon l'une quelconque des revendications, dans laquelle la mutation est
- 10 détectée indirectement par la mesure de la sumoylation de MITF, une diminution de la sumoylation par rapport à la protéine MITF sauvage indiquant la présence de la mutation E318K.
- 8- Méthode selon la revendication 7, dans laquelle la mutation est détectée par la
- 15 détermination de la localisation cellulaire de MITF en immunohistochimie, une localisation nucléaire étant indicatif de la protéine MITF sauvage alors qu'une localisation nucléaire et cytoplasmique étant indicatif de la protéine MITF mutée E318K.
- 20 9- Méthode selon l'une quelconque des revendications, dans laquelle le cancer est choisi parmi la combinaison d'un mélanome cutané malin et d'un cancer du rein, la polyglobulie, et les lymphomes, de préférence d'un mélanome cutané malin et d'un cancer du rein.
- 25 10- Méthode pour sélectionner les patients pouvant bénéficier d'un traitement préventif du cancer ou d'une surveillance médicale pour détection précoce du cancer comprenant la détermination de la susceptibilité au cancer du patient par la méthode selon l'une quelconque des revendications 1-9 et la sélection des sujets présentant la mutation diminuant ou abolissant la sumoylation de MITF.
- 30
- 11- Méthode selon la revendication 10, dans laquelle le traitement préventif du cancer comprend l'administration de composés polyphénoliques.

- 12- Composés polyphénoliques pour une utilisation dans le traitement préventif du cancer chez des sujets présentant une mutation de MITF diminuant ou abolissant la sumoylation de MITF.
- 5 13- Méthode selon la revendication 11 ou composés selon la revendication 12, dans lesquels les composés polyphénoliques sont des composés polyphénoliques de l'enveloppe du riz fermentée ou des polyphénols du thé noir.

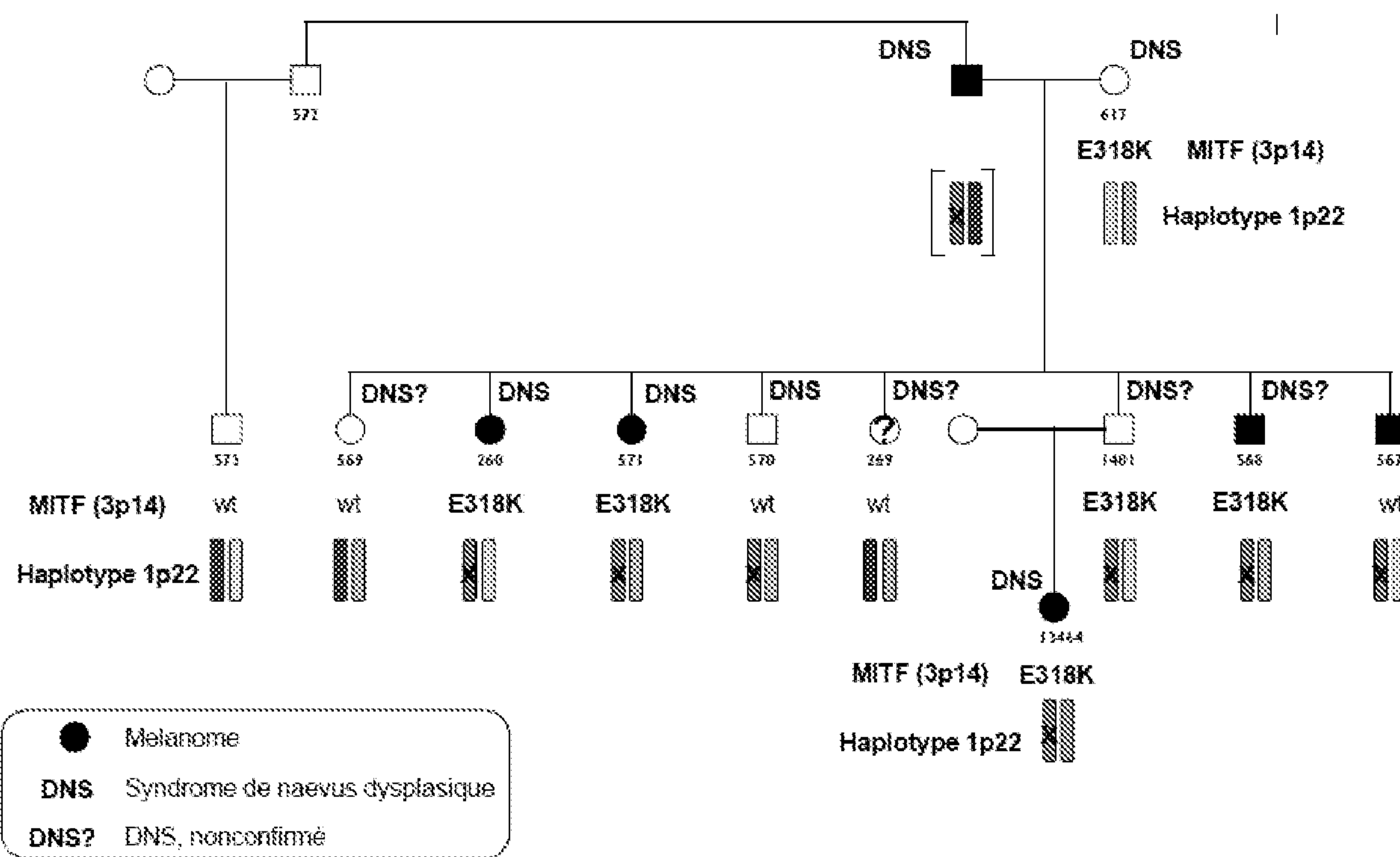


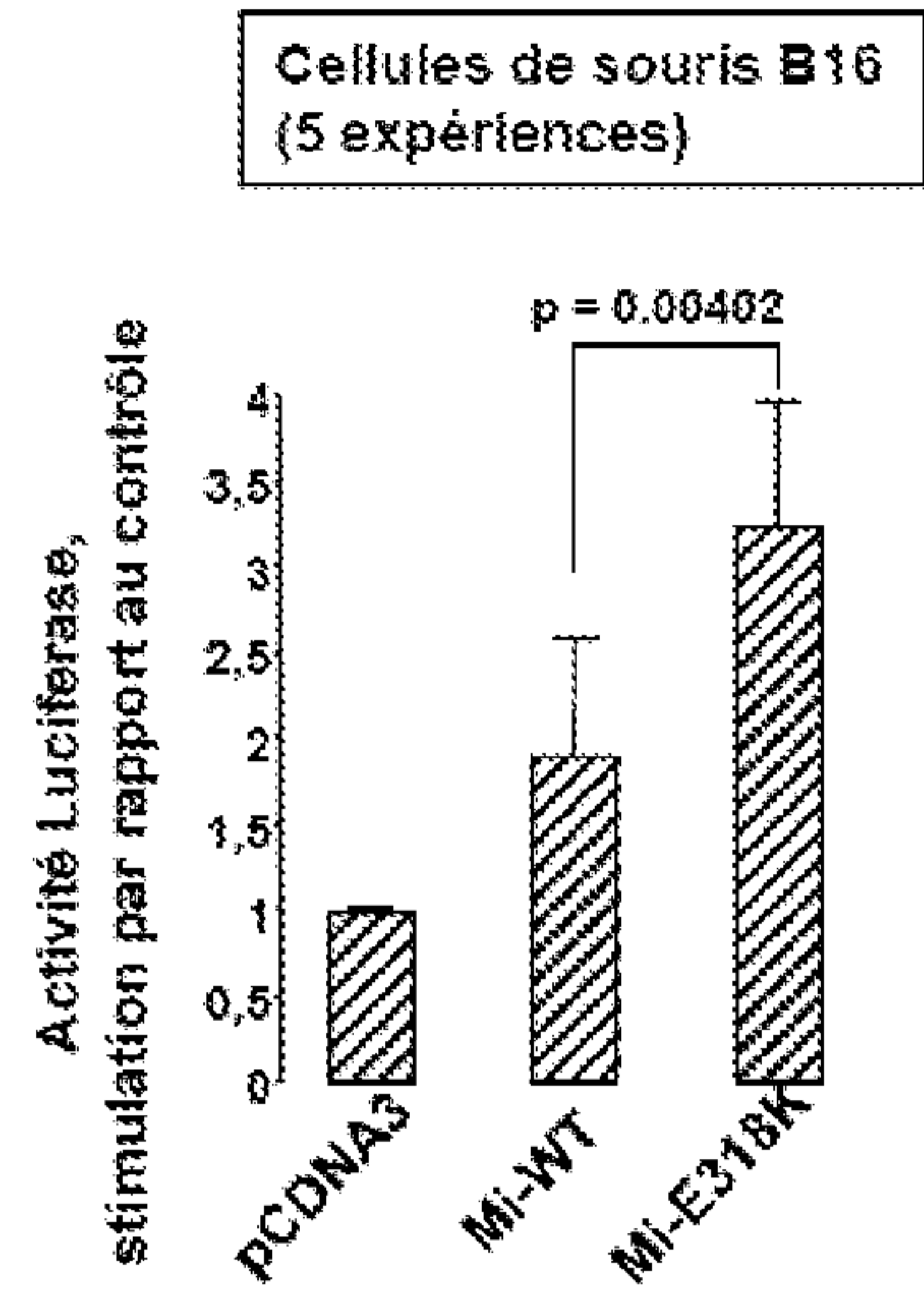
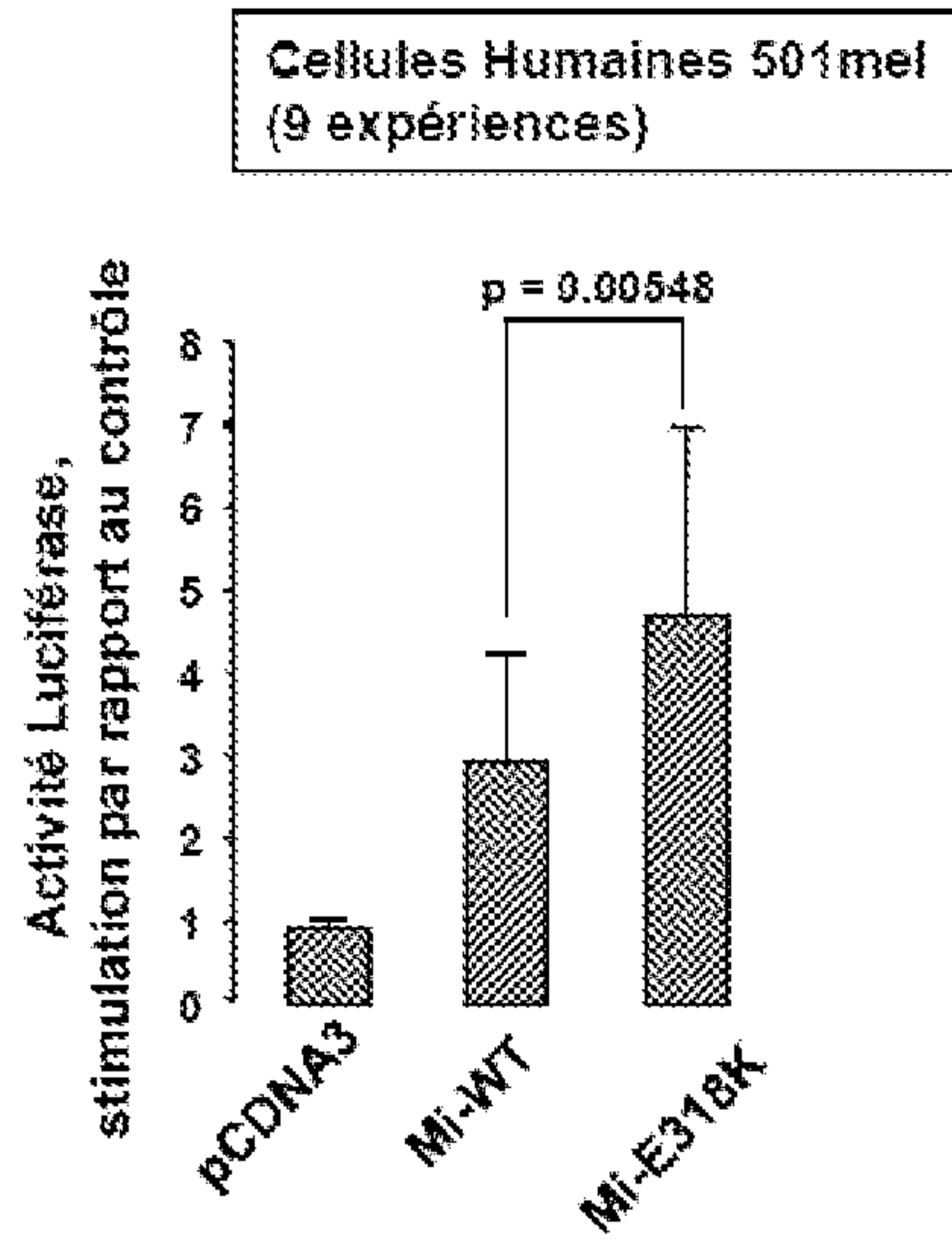
FIGURE 1a

Index	91	101
Reference	caagcaaga	aacccgt
Reference-AA	I K Q	E P
19034	CAAGCAAA	AACCCGT
19034_MITF_ex10_F	CAAGCAAP	AACCCGT
19034_MITF_ex10_R	CAAgCAAP	AACCCGT

FIGURE 1b

2/7

Promoteur HIF1a



Promoteur MET

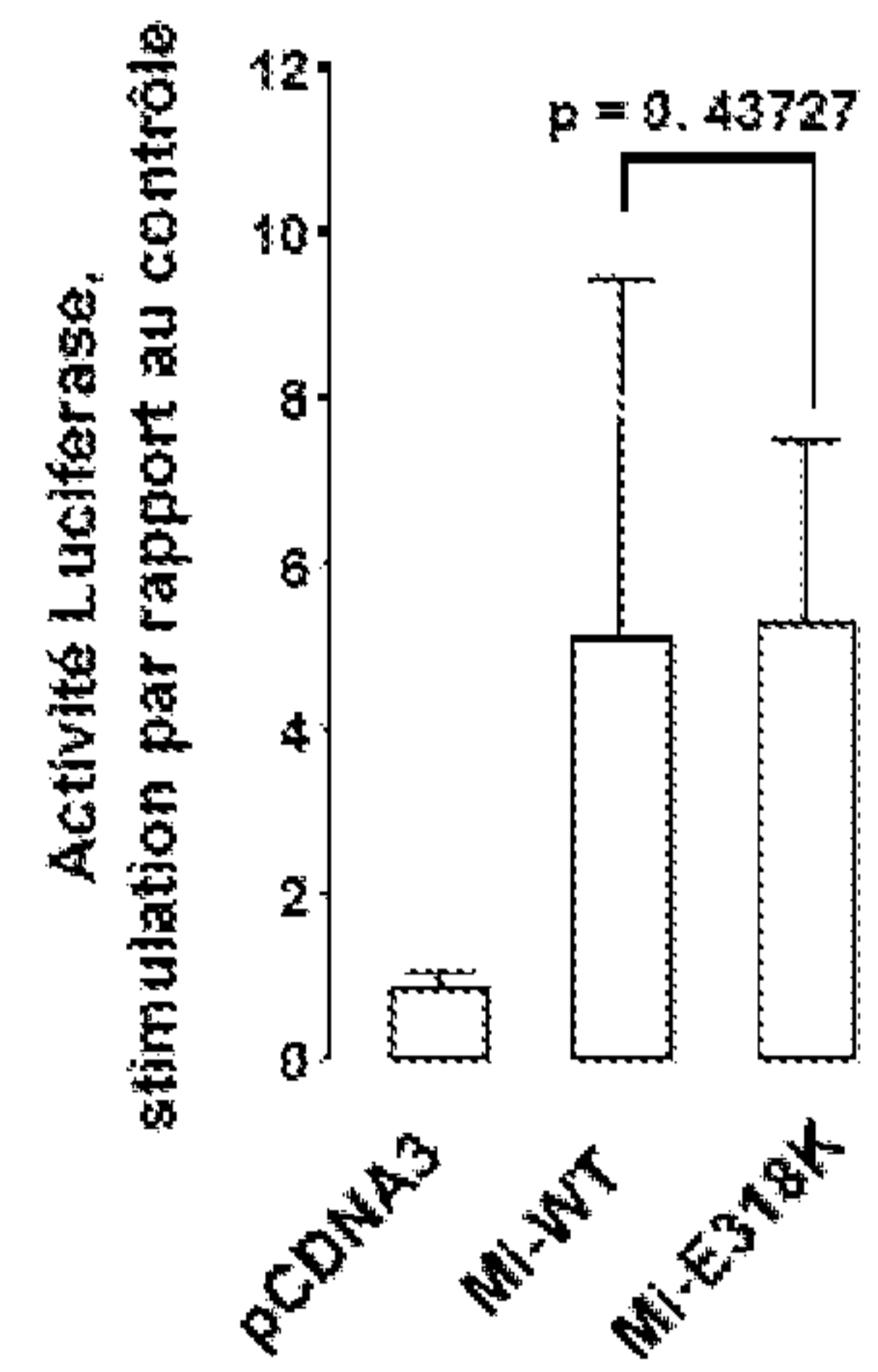
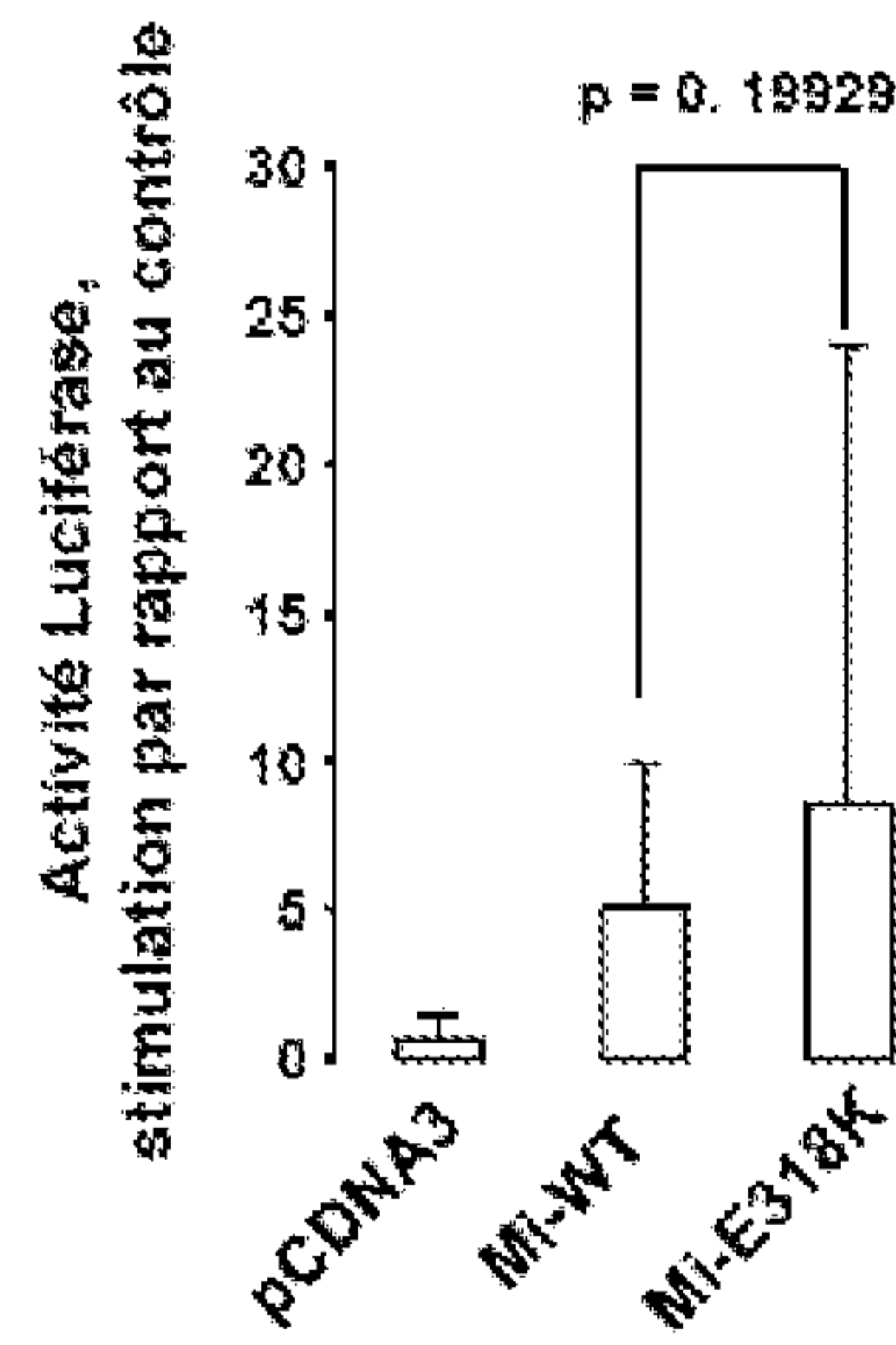


FIGURE 2

3/7

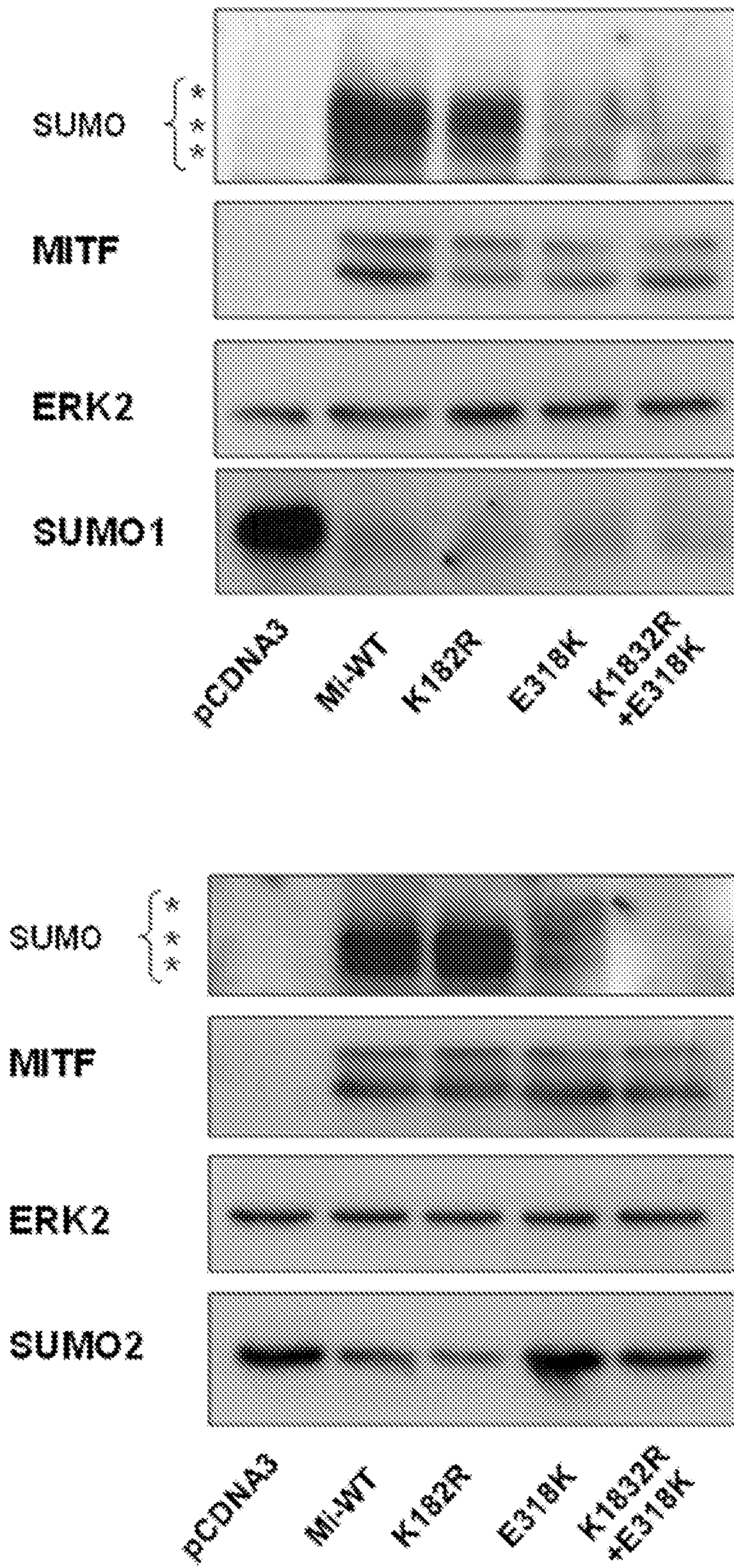


Figure 3

Fig 4a _{kDa}

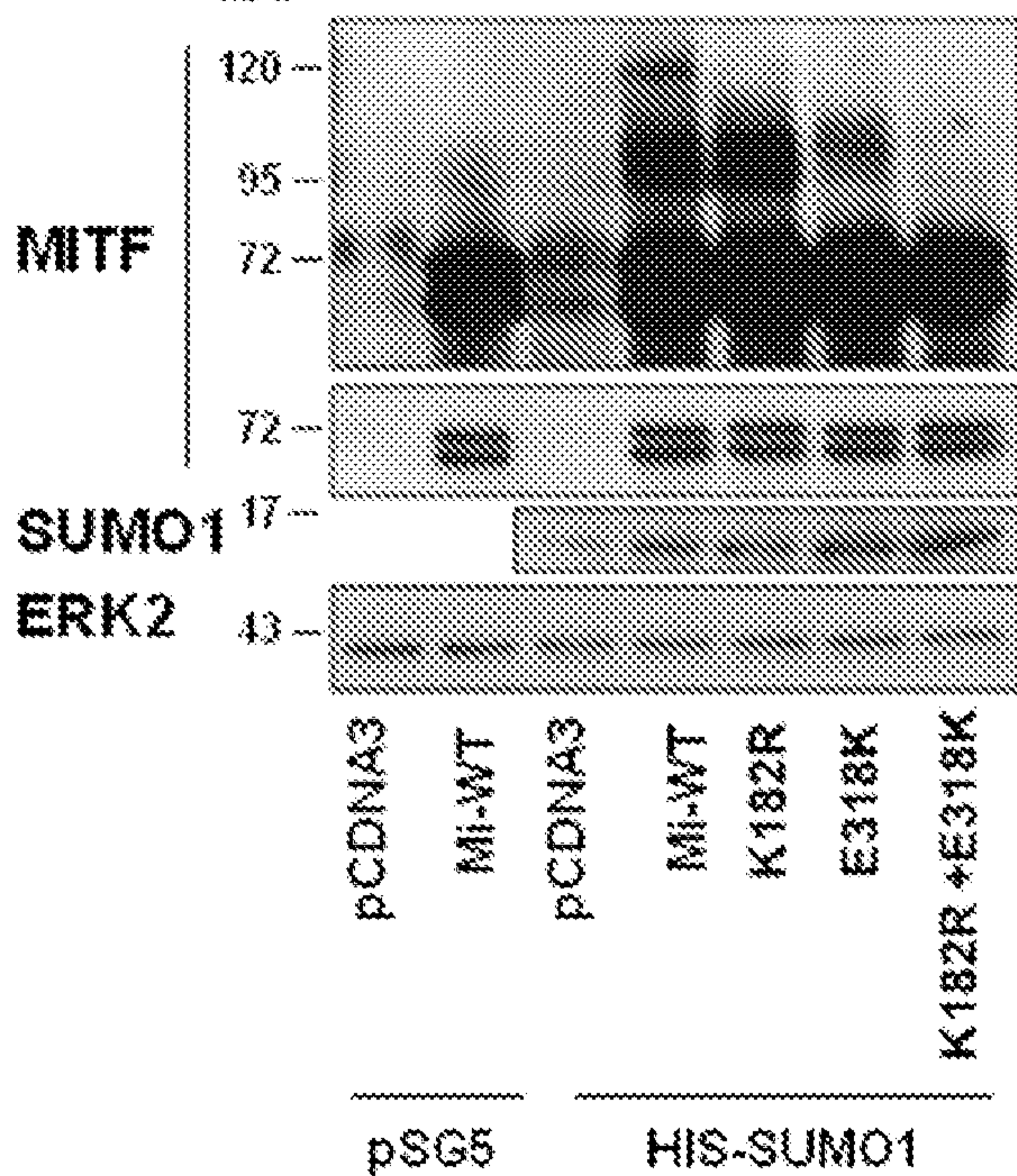


Fig 4b

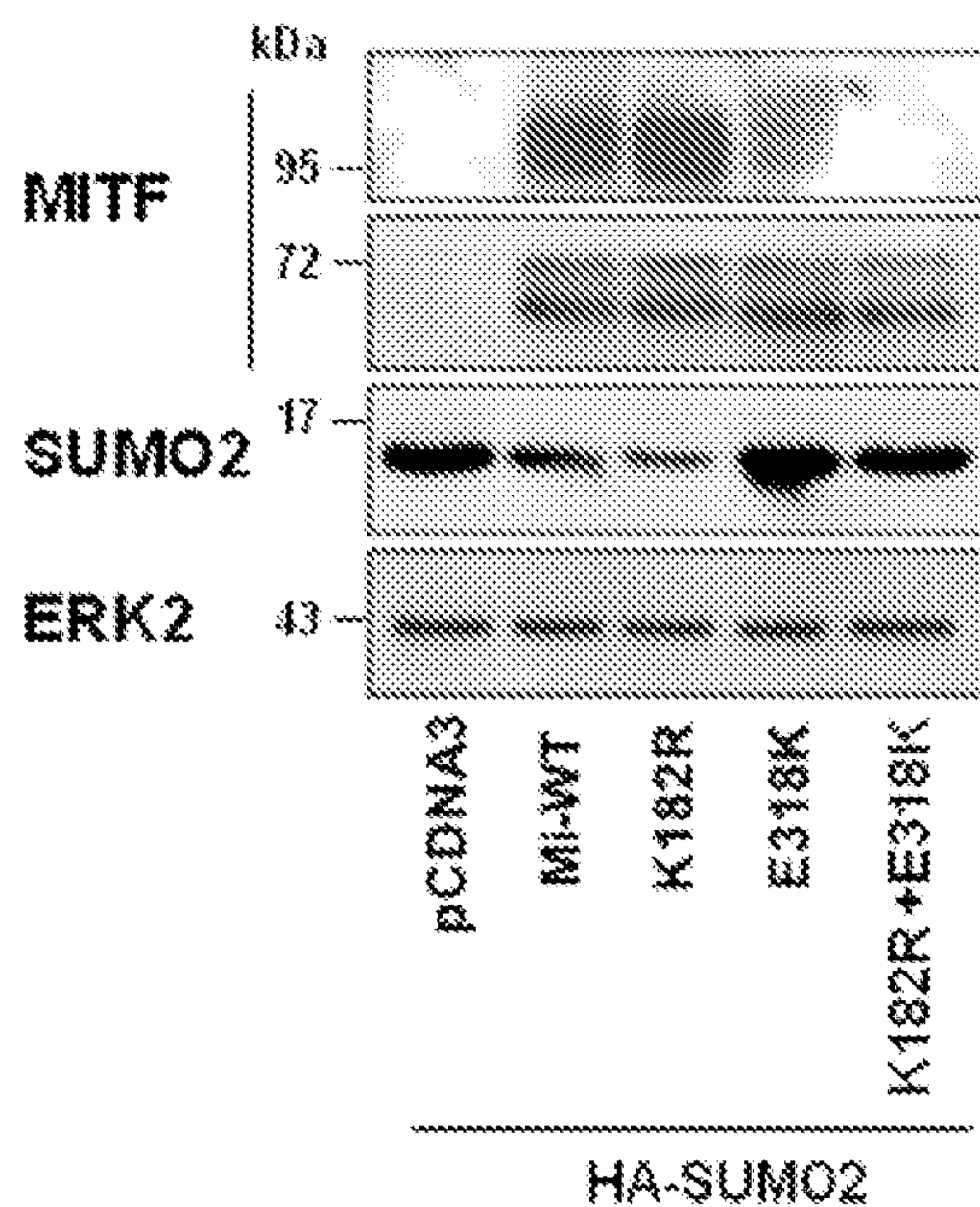


Fig 4c

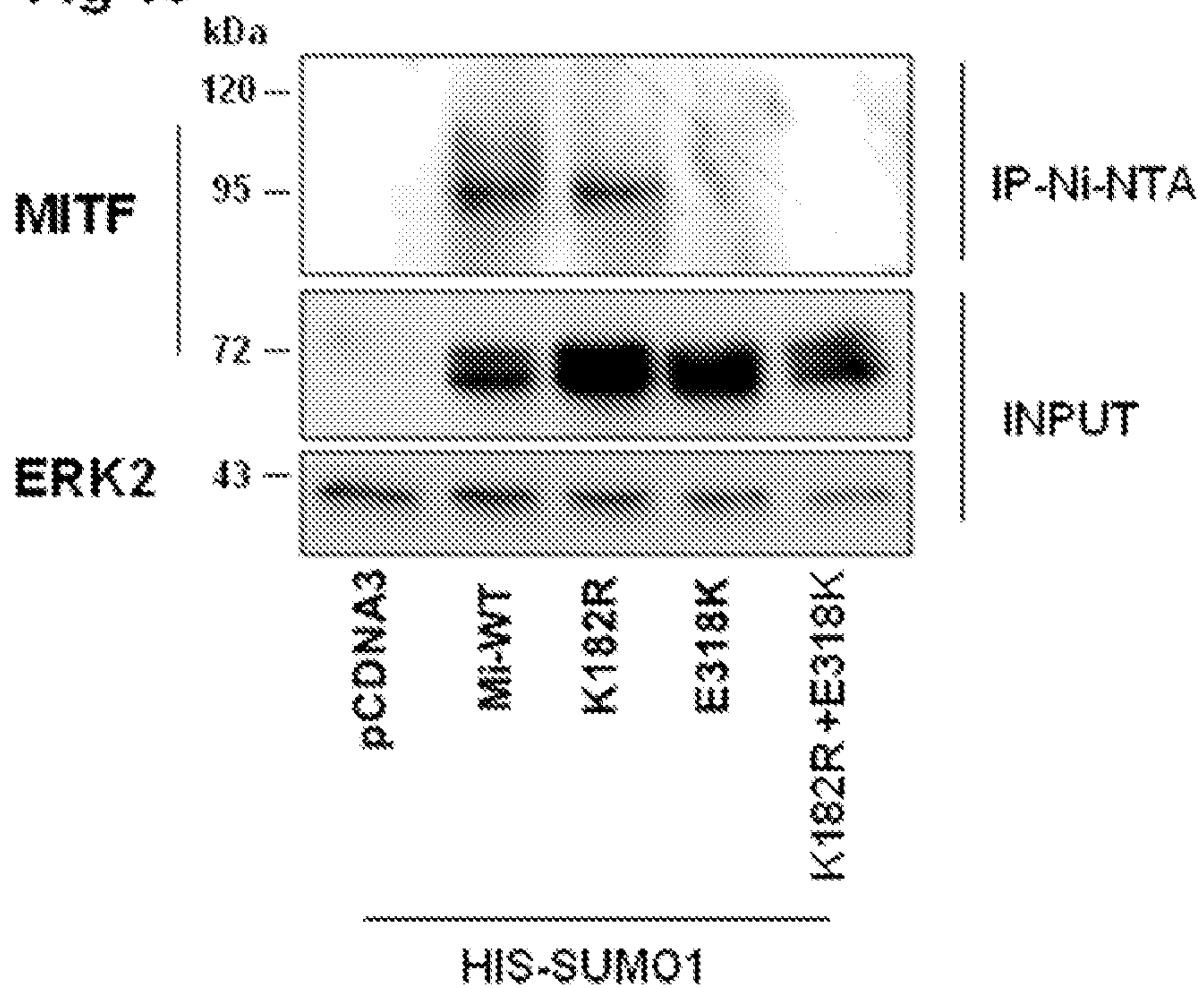


Fig 5a

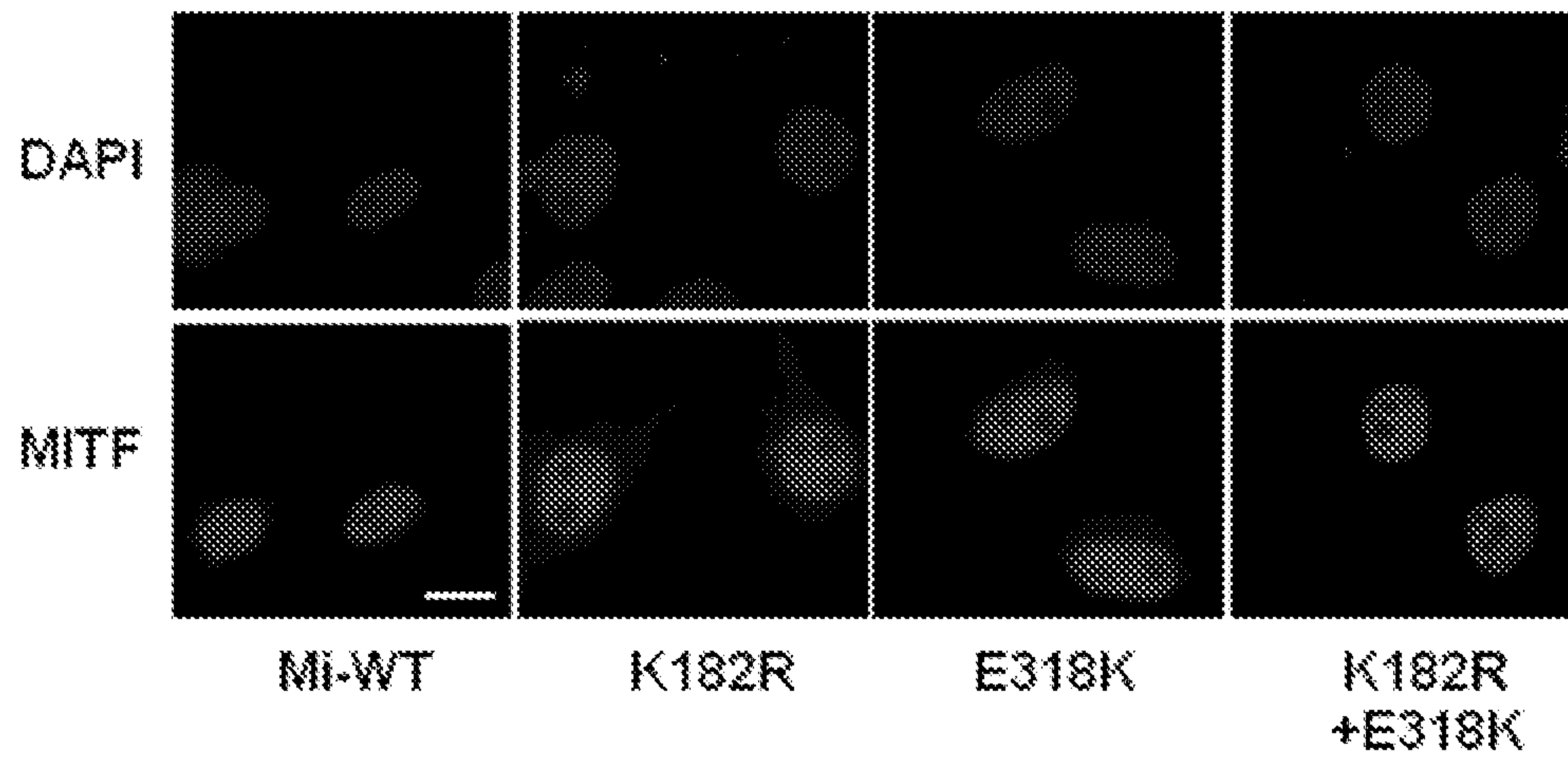
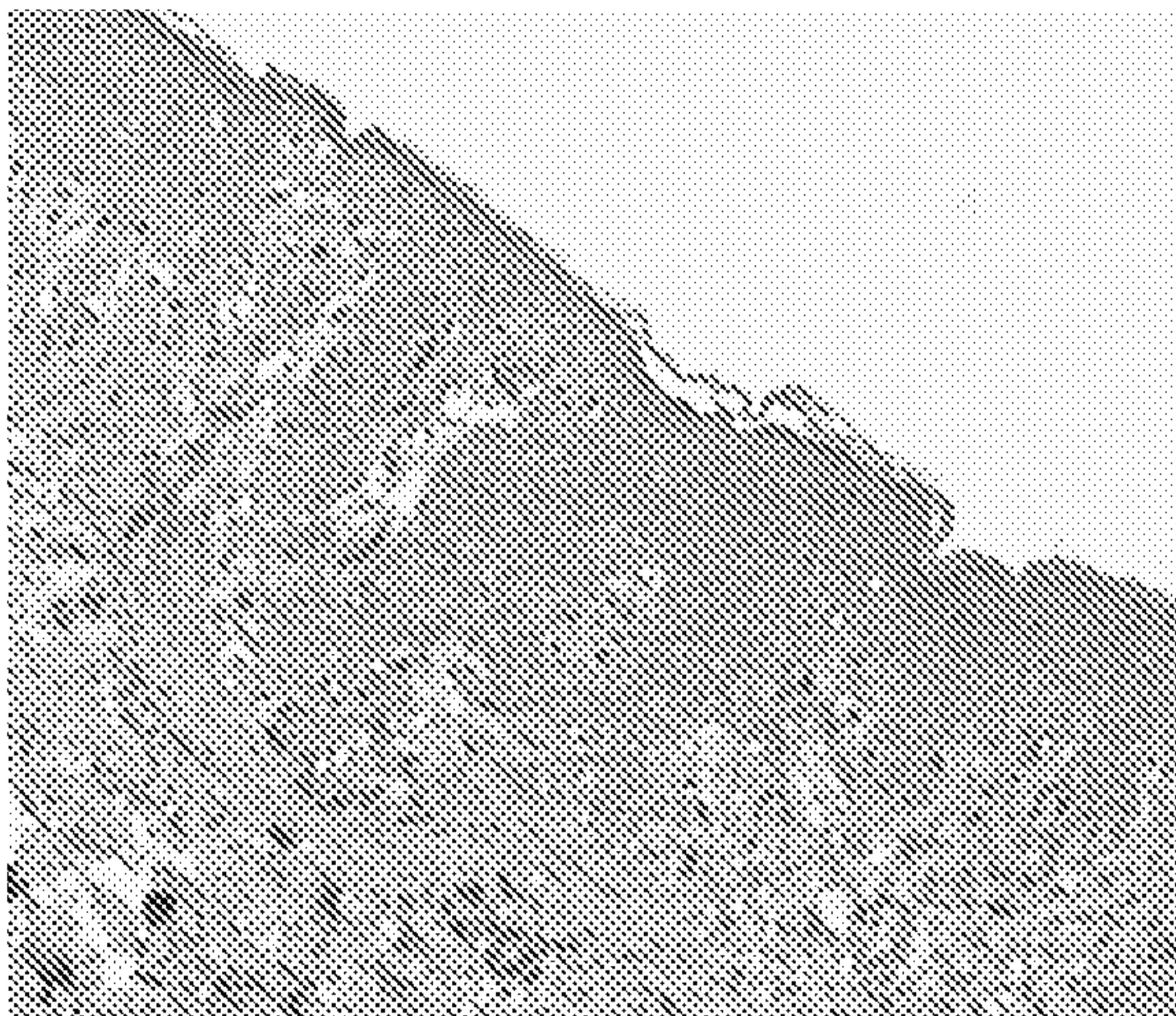
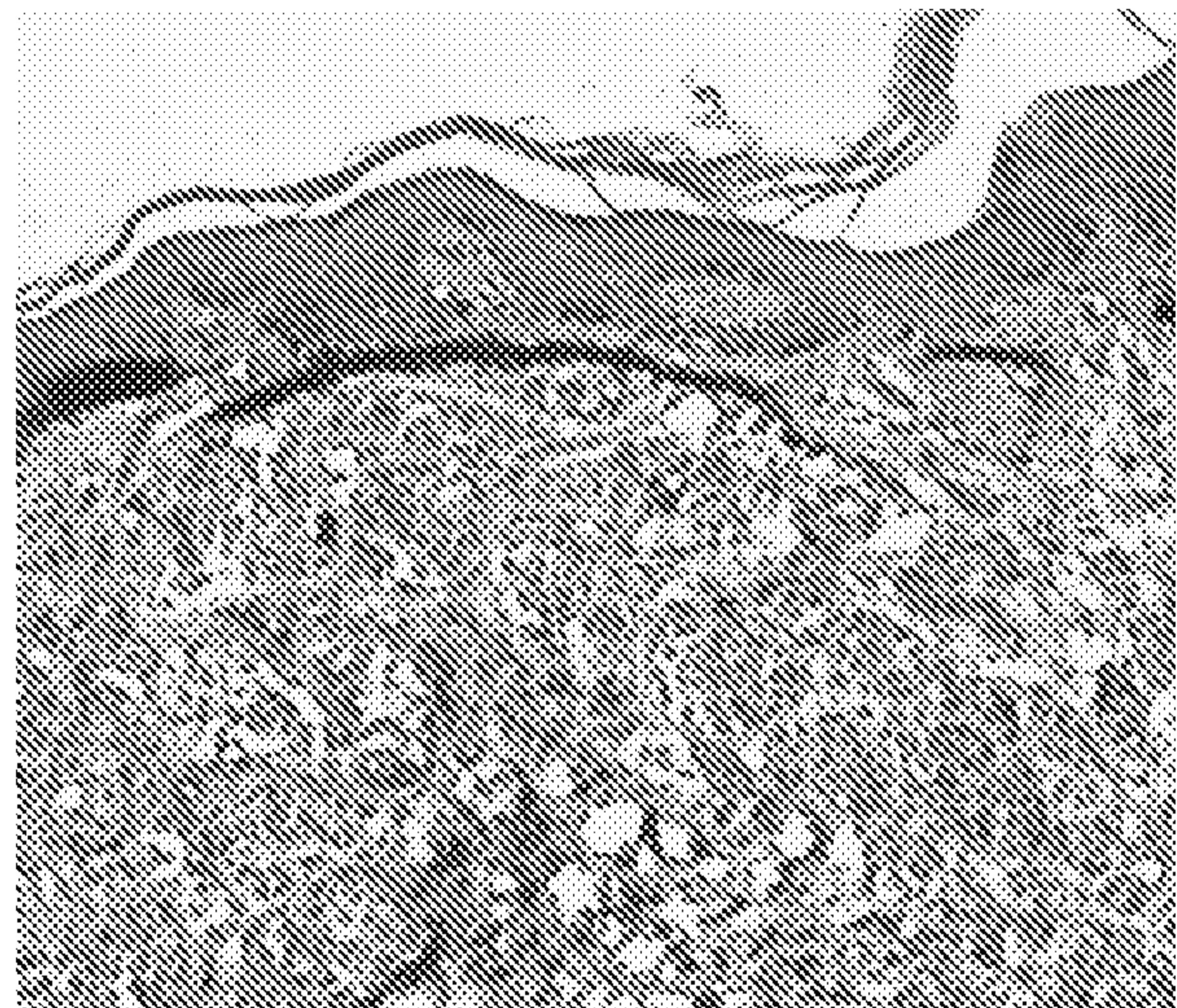


Fig 5b

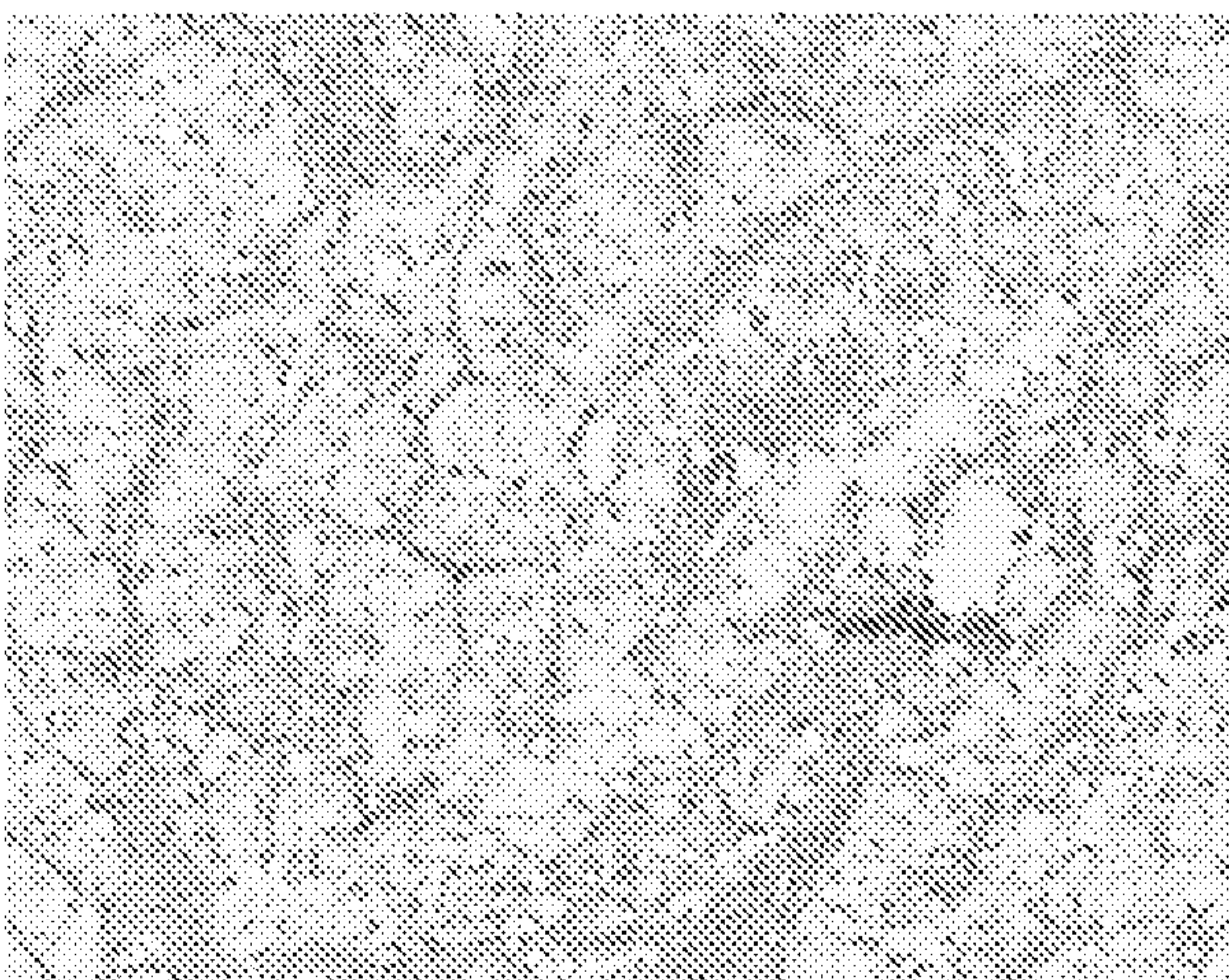
Mélanome contrôle avec MITF sauvage



Mélanome de cas avec MITF E318K



Cancer du rein contrôle avec MITF sauvage



Cancer du rein de cas avec MITF E318K

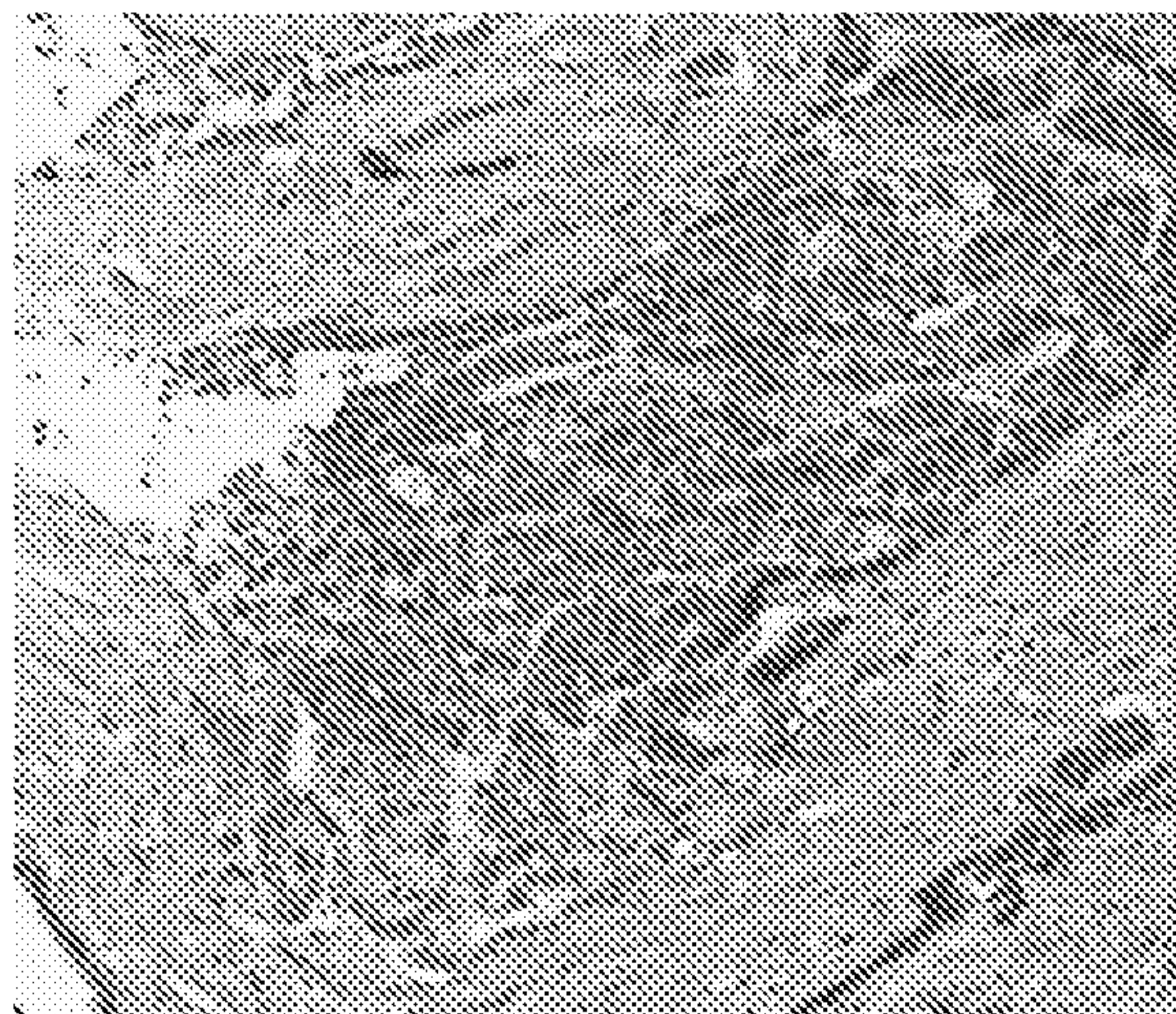


Fig 5c

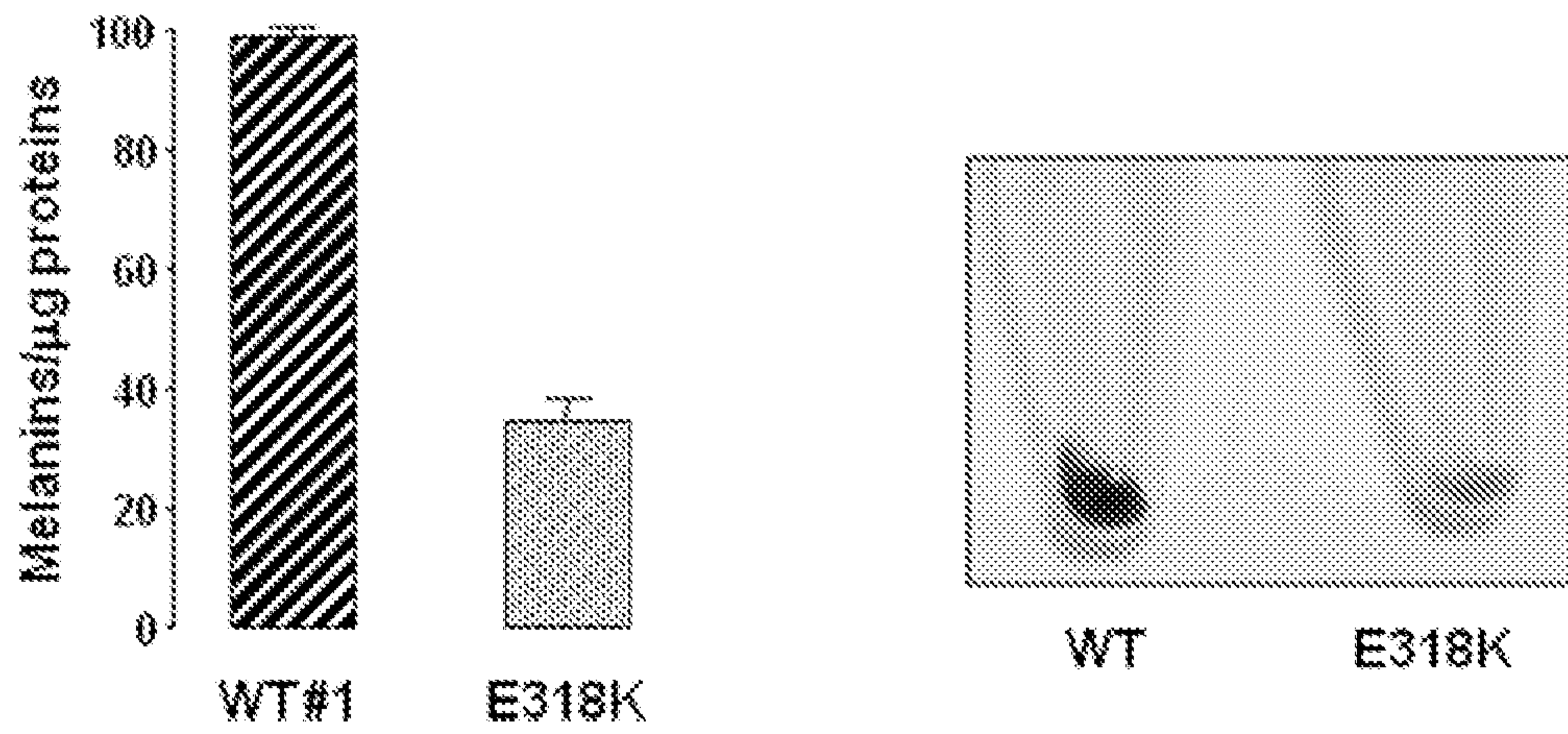
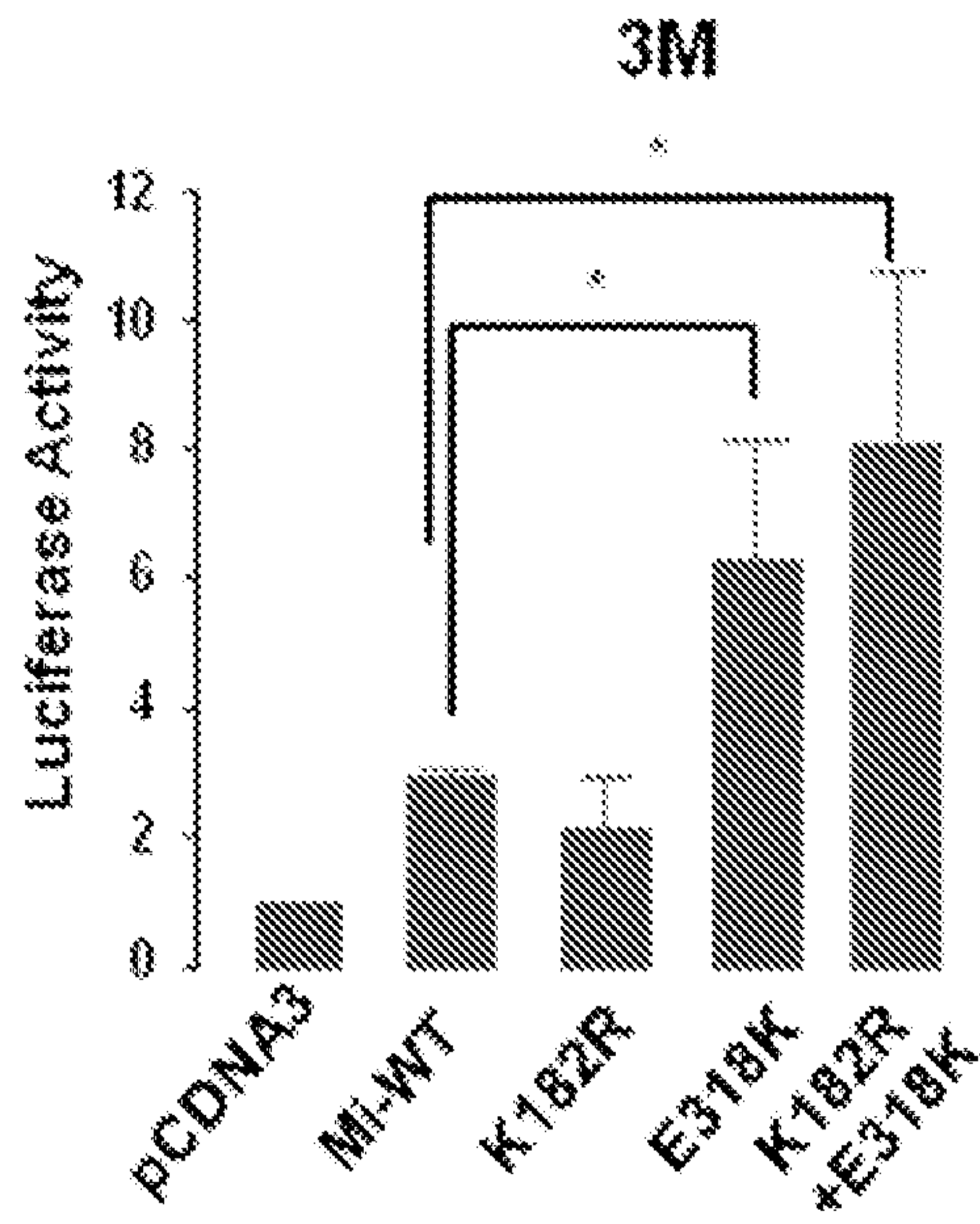


Figure 6

7/7

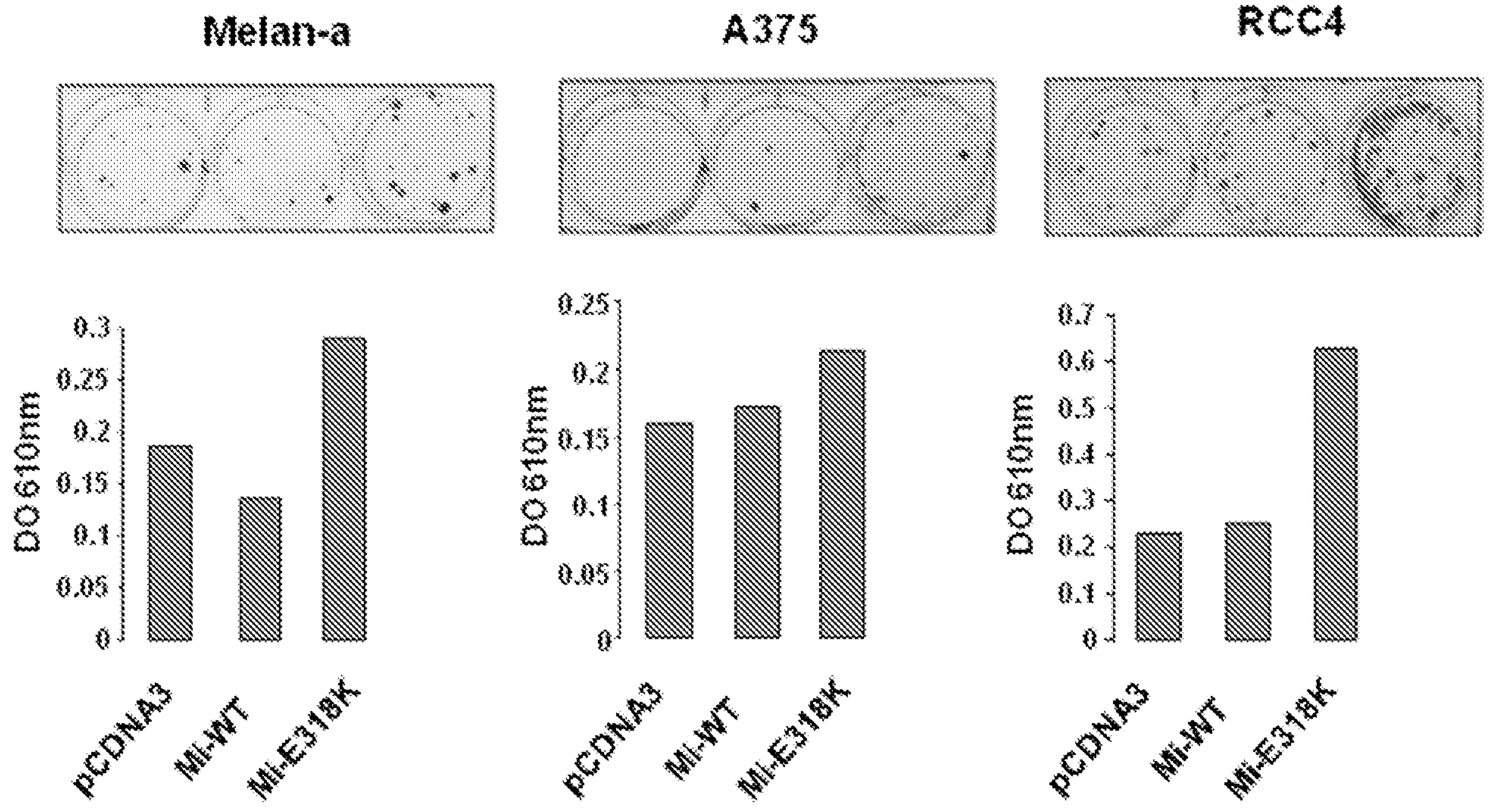


Figure 7