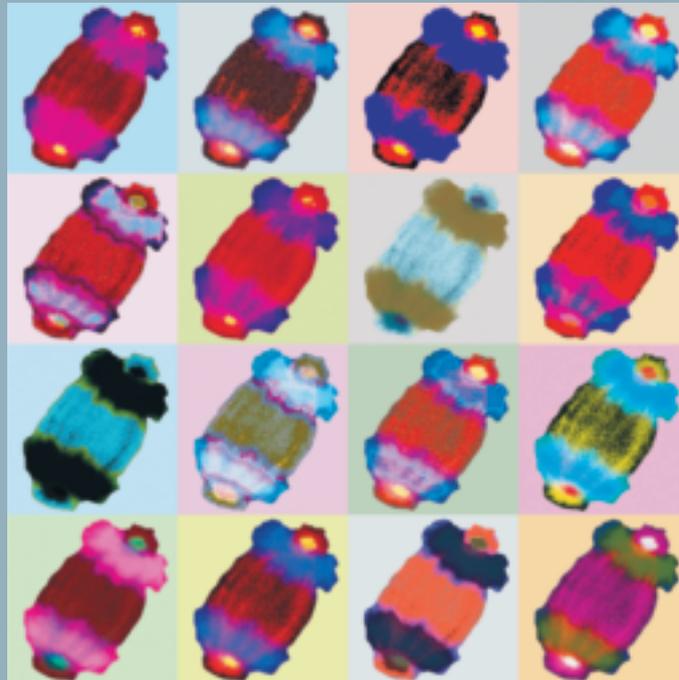


## Mécanismes du développement tumoral

Les modifications phénotypiques subies par une cellule au cours du processus de transformation maligne sont le reflet de l'acquisition consécutive de modifications génétiques. Ce processus multi-étapes n'est pas une transition abrupte d'une croissance normale à une croissance tumorale, mais il se déroule progressivement sur 20 ans ou plus. La mutation de gènes critiques, comprenant des gènes suppresseurs de tumeur, des oncogènes et des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, conduit à une instabilité génétique et à une perte progressive de la différenciation. La croissance tumorale est due à l'incapacité des cellules cancéreuses à équilibrer la division cellulaire par la mort cellulaire (apoptose), et à la formation de leur propre système vasculaire (angiogenèse). Les cellules transformées perdent leur capacité d'interaction et présentent une croissance non contrôlée. Elles envahissent les tissus environnants et se disséminent finalement par voie sanguine ou lymphatique pour gagner les organes distants.



# CANCEROGENESE MULTI-ETAPES

## RESUME

> Les tumeurs se composent de cellules dont la croissance et les caractéristiques morphologiques sont nettement différentes de celles des cellules normales. Les critères de malignité comprennent l'augmentation de la prolifération cellulaire, la disparition de la différenciation, une croissance infiltrante et la métastase à d'autres organes.

> La transformation maligne est un processus multi-étapes, typiquement une progression à partir d'une lésion bénigne (par exemple un adénome) vers une tumeur maligne (par exemple un carcinome). Cette évolution des cellules malignes est provoquée par l'accumulation consécutive d'altérations des gènes responsables du contrôle de la prolifération cellulaire, de la mort cellulaire et du maintien de l'intégrité génétique.

> Le développement du cancer peut être initié par des agents environnementaux (des cancérigènes chimiques, des rayonnements, des virus) ou des facteurs génétiques héréditaires (mutations germinales).

### Le cancer naît d'une seule cellule

Les tumeurs malignes (ou 'cancers') sont décrites comme étant monoclonales, ce qui signifie que chaque tumeur provient d'une seule cellule. Le développement d'une tumeur maligne à partir d'une cellule normale s'étale généralement sur une période considérable de notre vie. Une période aussi longue se reflète, par exemple, par la différence entre l'âge auquel une personne commence à fumer et l'âge auquel le diagnostic de cancer du poumon est le plus souvent porté. La longue 'période de latence' pour le cancer du poumon et presque toutes les pathologies malignes ne peut s'expliquer par une transition unique d'une cellule normale à une cellule cancéreuse. La tumeur est plutôt le résultat d'un proces-

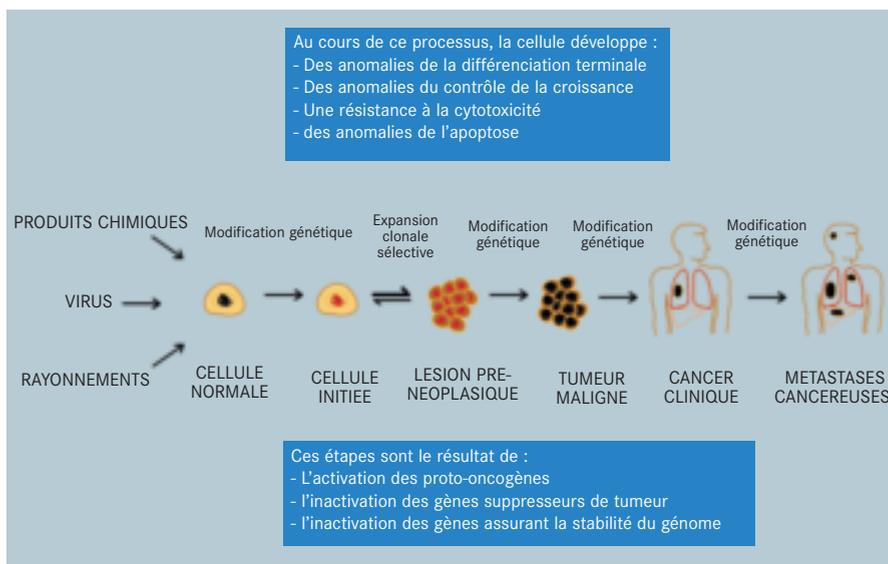


Fig. 3.1 La cancérogenèse est un processus en plusieurs étapes, impliquant un grand nombre d'événements génétiques et épigénétiques dans les proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes anti-métastases.

sus évolutif mettant en jeu des générations successives de cellules qui tendent progressivement vers une prolifération cancéreuse [1].

Les observations histopathologiques chez l'homme étaient ce scénario, et toute une gamme de lésions pré-cancéreuses ont été identifiées [2]. De la même manière, chez l'animal de laboratoire, des populations cellulaires spécifiques peuvent être identifiées comme le signe d'un engagement vers la malignité, et elles peuvent être exploitées comme un indicateur précoce dans le cadre de tests de cancérogénicité [3]. Ainsi, d'un point de vue morphologique, le cancer peut être perçu comme le résultat d'un processus biologique complexe.

### De multiples étapes sont nécessaires à l'apparition d'un cancer

Des 'modèles' animaux du développement cancéreux, consistant le plus souvent à traiter des rongeurs par des cancérigènes chimiques ou d'autres agents induisant le cancer, ont indéniablement confirmé que

des étapes spécifiques de la transformation maligne pouvaient avoir lieu séparément [4]. Les agents chimiques qui provoquent le cancer chez les animaux sans que d'autre traitement soit nécessaire sont parfois appelés 'cancérigènes complets' (bien que 'cancérigènes' seul soit adapté). La plupart de ces cancérigènes lèsent l'ADN des cellules ou des tissus qui y sont exposés. Les activités de lésion de l'ADN peuvent être identifiées en se basant sur des protocoles définis (parfois dénommés 'tests à court terme', pour accentuer leur différence par rapport aux tests biologiques chroniques s'étalant sur toute une vie réalisés chez les rongeurs). Les produits chimiques qui présentent une activité mutagène dans les tests à court terme, impliquant en général des souches bactériennes et des extraits exempts de cellules pour catalyser le métabolisme du composé testé, sont dits 'génétoxiques' [5]. Les agents génotoxiques peuvent être des cancérigènes complets, mais ils peuvent aussi agir comme des 'substances initiateurs'.

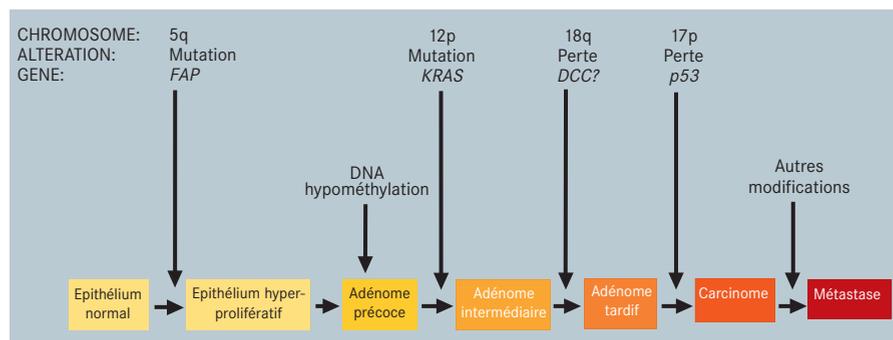
Après un traitement unique avec une substance initiatrice, la croissance tumorale peut être facilitée par des produits chimiques (ou des traitements) qui stimulent la prolifération cellulaire, en induisant parfois des lésions légèrement toxiques dans le tissu exposé. Ces agents sont appelés 'promoteurs' (Tableau 3.1). Tout comme ces produits chimiques génotoxiques, une gamme d'agents non génotoxiques peut provoquer le cancer chez l'homme et/ou l'animal de laboratoire [6]. Les étapes de la tumorigénèse désignent 'l'initiation' qui couvre les lésions aux cellules exposées, puis la 'division' de ces cellules qui va entraîner une modification irréversible de leur potentiel de croissance, et la 'progression' s'adressant aux multiples cycles de réplication cellulaire entraînant le passage graduel d'une cellule initiée vers une croissance autonome et cancéreuse. Le 'processus métastatique' désigne la dissémination finale des cellules malignes aboutissant à de multiples localisations tumorales. L'identification précise de ces différentes phases au milieu des années 1970 a montré que la cancérogenèse est un processus multi-étapes. On peut dire que la plus grande découverte de la recherche sur le cancer au cours des dernières décennies fut l'élucidation de la cancérogenèse multi-étapes au niveau génétique moléculaire.

### Base moléculaire de la pathologie tumorale

Vogelstein et coll. [7], dans une publication qui a fait école, ont démontré que les différentes étapes de l'évolution cellulaire du cancer du côlon chez l'homme, identifiées histologiquement comme une hyperplasie, un adénome précoce, un adénome tardif, etc., pouvaient se distinguer par des modifications génétiques successives (fig. 3.2). Les modifications génétiques comprennent l'activation des oncogènes par mutation sur des sites spécifiques et la perte de régions chromosomiques (impliquant nécessairement de multiples gènes) dont on a ensuite démontré qu'elles étaient les emplacements de gènes suppresseurs de tumeur. Depuis cette description initiale, les connaissances relatives à la base génétique

Facteur		Localisation du cancer
<b>Hormones</b>	Oestrogènes, progestérone Gonadotrophines Testostérone	Utérus, glande mammaire ovaire, testicules, glande pituitaire, prostate
<b>Produits pharmaceutiques</b>	Contraceptives oraux Stéroïdes anabolisants Analgésiques	Foie Foie Bassinnet rénal
<b>Substances diverses</b>	Acides biliaires Acides gras saturés Sel Tabac Saccharine, uracile, mélamine, acide téréphtalique et autres xénobiotiques provoquant des calculs urinaires Dichlorobenzène, triméthylpentane (essence sans plomb), perchlo- éthylène Hydroxyanisole butylé, acid propionique Nitrilotriacétate	Intestin grêle Côlon Estomac Cavité buccale, poumons, vessie, etc.  Reins  Estomac Reins

**Tableau 3.1** Agents promoteurs : agents non génotoxiques qui favorisent la cancérogenèse en stimulant la division cellulaire. La fumée de tabac contient aussi des cancérogènes



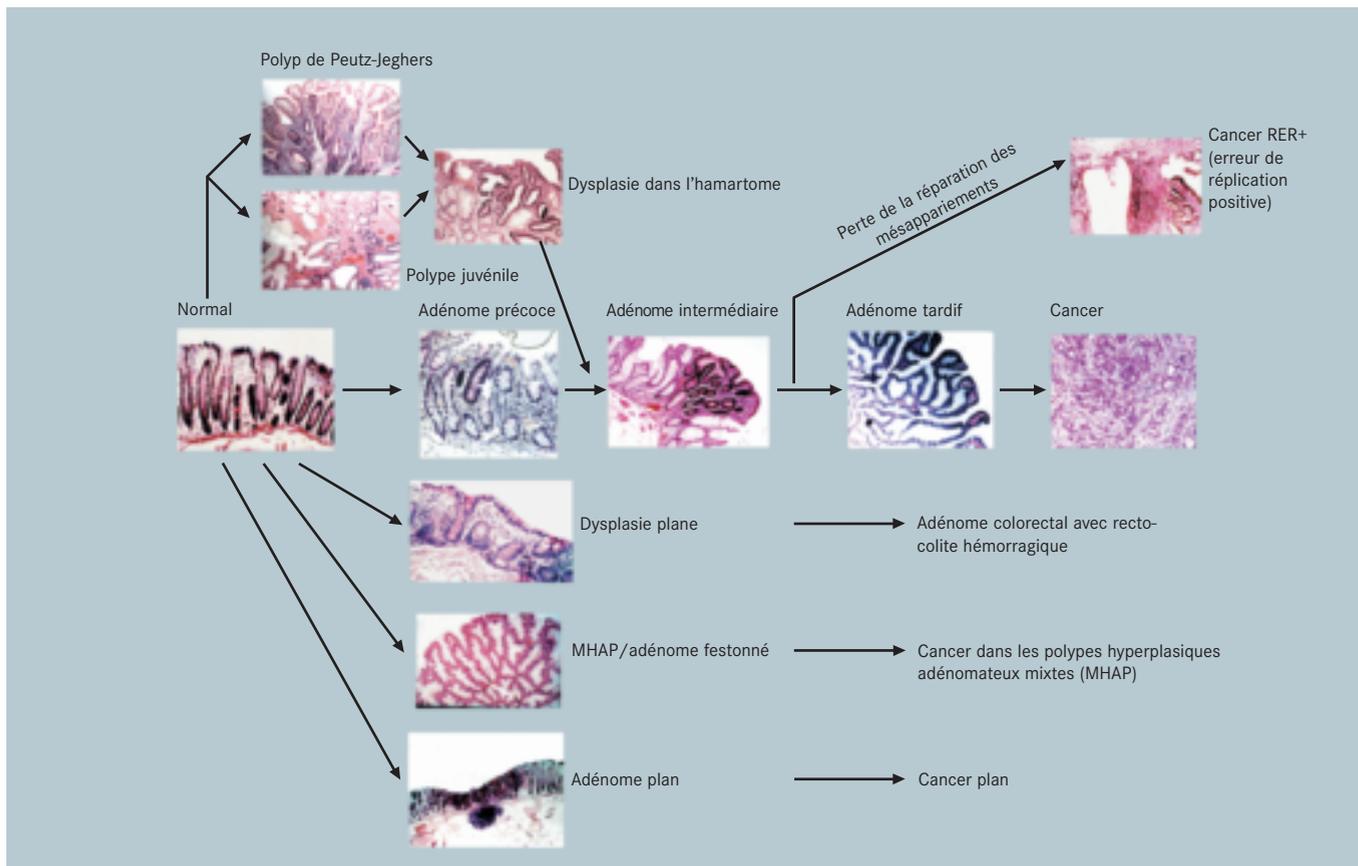
**Fig. 3.2** Modèle original de Vogelstein de l'évolution génétique et histologique du cancer du côlon (*Cancer colorectal*, p. 200).

moléculaire du cancer du côlon humain se sont considérablement étendues (*Cancer colorectal*, p. 200). Pour la plupart des tumeurs, nous n'héritons pas des modifications génétiques de nos parents mais elles surviennent dans une cellule initialement normale. Les cellules issues de cette cellule après la division cellulaire portent les mêmes modifications génétiques, mais les cellules environnantes restent normales. Etant

donné que ces modifications génétiques, n'affectent que les cellules cancéreuses, elles ne sont pas transmises aux enfants de patients cancéreux. Cependant, dans une minorité de cas, des modifications critiques sont transmises par hérédité, résultant en une prédisposition familiale au cancer du côlon ou à un autre cancer.

### Homogénéité et hétérogénéité

La base biologique moléculaire de la



**Fig. 3.3** Représentation histologique de la pathogenèse du cancer colorectal. Les modifications phénotypiques de la morphologie de la muqueuse du côlon reflètent l'acquisition séquentielle d'altérations génétiques.

cancérogénèse multi-étapes initialement décrite pour le cancer du côlon semble pouvoir s'appliquer à tous les types de tumeurs. Toutefois, le degré de détail des descriptions des gènes impliqués dans telle ou telle tumeur particulière est très variable [8]. Certains gènes, et les modifications correspondantes associées à la tumorigénèse (mutation, surexpression, délétion et/ou amplification), sont communs à plusieurs types de tumeurs. Cependant, chaque type de tumeur est associé à un ensemble distinctif d'altérations génétiques. Les gènes en questions sont abordés dans *Pathologie et génétique* pour chaque type de tumeur traité dans le Chapitre 5. Cette énumération de gènes pertinents nécessite un degré de simplification. Il existe une hétérogénéité manifeste entre les différentes

tumeurs du même type. En d'autres termes, toutes les tumeurs ne présenteront pas nécessairement la totalité des modifications génétiques définies pour le type de tumeur en question. En outre, il y a souvent une hétérogénéité marquée dans une même tumeur: les cellules adjacentes sont différentes. La cartographie et l'identification des gènes impliqués dans la transformation maligne sont une composante essentielle de l'étude des mécanismes moléculaires de la cancérogénèse.

#### **Des modifications génétiques multiples sont nécessaires**

On comprend l'émergence d'une population de cellules malignes comme étant l'effet cumulatif de multiples modifications génétiques (cinq, dix ou plus). Ces modifications s'accroissent au cours de

l'évolution d'une cellule normale vers une cellule maligne. On a identifié des gènes appelés oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur (*Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur*, p. 97) d'après leurs fonctions biologiques [9]. Ces gènes font partie de ceux qui facilitent la transmission des signaux de contrôle de croissance depuis la membrane cellulaire au noyau (transduction du signal), qui induisent la division cellulaire, la différenciation ou la mort cellulaire et, peut-être le point le plus critique de tous, qui maintiennent l'intégrité des informations génétiques grâce à la réparation de l'ADN et autres processus similaires (*Activation des agents cancérogènes et réparation de l'ADN*, p. 89). Etant donné qu'en temps normal les mutations ne sont pas des événements fréquents, il semble improbable qu'au cours de la vie humaine, une

## LESIONS PRECURSEURS DANS LES ESSAIS DE CHIMIOPREVENTION

Les essais portant sur l'activité chimio-préventive de différents agents, essais fondés sur l'évaluation de maladies malignes, sont pratiquement ingérables étant donné la longue période (certaine-ment des décennies) potentiellement requise. On s'est par conséquent concen- tré sur des lésions cellulaires ou molécu- laires, dont on a démontré qu'elles étaient des indicateurs valables du développement ultérieur de la malignité. Il est alors possi- ble d'évaluer l'effet d'agents chimiopréven- tifs supposés sur ces lésions précurseurs.

Les lésions précurseurs les mieux testées sont les tumeurs bénignes, telles que les adénomes colorectaux. Le nombre d'adénomes, leur taille et la sévérité de la dysplasie sont des facteurs prédictifs de l'incidence du cancer colorectal. Il a été estimé que 2 à 5 % des adénomes colorectaux, lorsqu'ils ne sont pas traités ou retirés, progressent vers des adéno- carcinomes. Le risque est supérieur pour les gros polypes sévèrement dys- plasiques. Le risque de cancer diminue après ablation du polype, et il existe une forte corrélation entre la prévalence rela- tive d'adénomes et de cancers dans

toutes les populations (Winawer SJ et coll., *N Engl J Med*, 328: 901-906, 1993). Plusieurs études épidémiologiques ont révélé que la prise régulière d'aspirine ou de médicaments apparentés était associée à une réduction de l'incidence des adénomes (*IARC Handbooks of Cancer Prevention*, Vol. 1, Lyon, 1997). Ceci vient encore confirmer que les adénomes sont des lésions précurseurs du cancer du côlon, sachant que l'aspirine diminue l'incidence de ces cancers.

Les lésions précurseurs potentielles de la cancérogénèse englobent à la fois des mar- queurs phénotypiques et des marqueurs génotypiques (Miller AB et coll. *Biomarkers in Cancer Chemoprevention*, IARC Scientific Publications N° 154, Lyon 2001). Ainsi, la leucoplasie buccale est un marqueur recon- nu du cancer de la cavité buccale. La mo- dulation histologique d'un précancer (par- fois dénommée néoplasie intraépithéliale) a été utilisée comme lésion précurseur dans des essais de prévention (Kelloff GJ et coll., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9: 127-137, 2000). En outre, des lésions gé- nétiques comme l'instabilité génomique pro- gressive, telle qu'elle est mesurée par la perte de l'hétérozygotie ou l'amplification sur des locus microsatellites spécifiques, ont été prises en considération (Califano J et coll., *Cancer Res*, 56 : 2488-2492, 1996).



Fig. 3.6 L'adénome tubulaire du côlon est une lésion précurseur du cancer colorectal.

D'autres critères d'évaluation des précurseurs comprennent les marqueurs de la prolifération et de la différenciation, les lésions génétiques spécifiques et chromosomiques générales, les molécules régulatrices de la croissance cellulaire, et les activités biochimiques (par exemple, l'inhibition enzymatique). Les protéines sériques présentent un intérêt particulier en raison de leur disponibilité. Ainsi, l'antigène spécifique de la prostate (PSA) est utilisé comme marqueur 'de substitution' pour le cancer de la prostate. On pense que le nombre et la variété des marqueurs des lésions précurseurs continueront d'augmenter, au fur et à mesure des progrès de notre compréhension des bases cellulaires et génétiques de la cancérogénèse.

cellule acquière toutes les mutations nécessaires au développement du cancer, à moins qu'à un moment donné, elle ne perde sa capacité d'autoprotection contre la mutation et acquière ce que l'on appelle

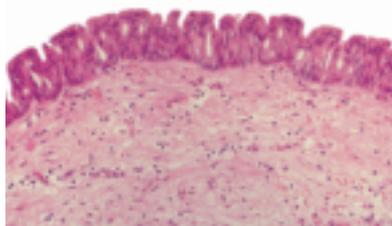


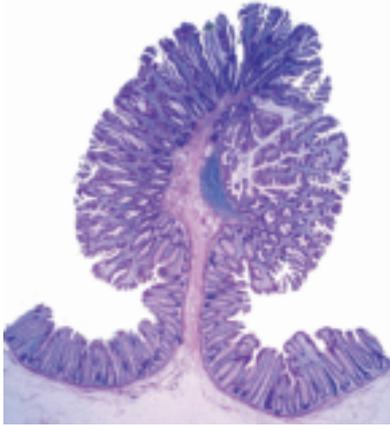
Fig. 3.4 Néoplasie intraépithéliale grave (dysplasie) de l'épithélium d'une voie biliaire intrahépatique, état pathologique provoqué par la lithiase hépatique.

un phénotype 'mutateur' [10]. Ainsi, des modifications de la structure du gène et de l'expression qui entraînent la cancéro- génèse sont progressivement identifiées [11]. Comme indiqué plus haut, les mem- bres de certaines familles présentant une prédisposition au cancer héritent de mutations de certains gènes qui con- tribuent au développement du cancer et par conséquent modifient leur risque individuel face à la maladie. Cependant, dans la plupart des cancers, les modifica- tions génétiques critiques pour la can- cérogénèse proviennent de lésions de l'ADN générées par des produits chimiques, des rayonnements ou des virus (fig. 3.1). Ces lésions ne sont pas totale-

ment, et peut-être pas de manière prédom- inante, produites par un agent extérieur, mais par des processus naturels, comme la production d'espèces oxygénées réactives ou la désamination spontanée de la 5- méthylcytosine naturellement présente dans l'ADN [13]. De plus, comme ceci est illustré dans la seconde étape sur la figure 3.2, il est possible que la modification biologique héréditaire résulte de processus qui ne sont pas génétiques, comme la mo- dulation de l'expression génique par hyper- méthylation [12].

### Viellissement

Outre le développement multi-étapes, certains autres processus sont fondamentaux



**Fig. 3.5** Polype hyperplasique pédonculé du côlon.

dans la maladie maligne, principalement le vieillissement qui peut être considéré à la fois par rapport à l'individu lui-même et à l'échelle des cellules. Chez l'homme, tout comme chez les autres mammifères, l'incidence du cancer augmente de façon très importante avec l'âge. Une augmentation exponentielle a lieu à partir de la moitié de la vie [14]. Le temps est aussi un facteur critique pour la biologie cellulaire. Les cellules normales ne se divisent pas indéfiniment en raison de la sénescence (Encadré : *Téломères et téломérasés*, p. 109). Les cellules sénescées ne peuvent plus être stimulées pour se diviser, elles deviennent

résistantes à la mort cellulaire par apoptose et acquièrent des fonctions différenciées. La sénescence peut aussi être un mécanisme anti-cancéreux qui limite l'accumulation des mutations. Cependant, lorsqu'elles sont maintenues en culture, les cellules traitées par des cancérogènes chimiques ou infectées par des virus oncogènes peuvent éviter d'entrer en sénescence et proliférer indéfiniment. On parle alors de populations cellulaires 'transformées', et lorsqu'elles sont maintenues en culture encore plus longtemps, ces cellules préalablement normales acquièrent les mêmes caractéristiques que les cellules cultivées à partir de tumeurs malignes. Ces altérations des caractéristiques de croissance, entre autres, sont reconnues comme les équivalents expérimentaux de la cancérogenèse multi-étapes par laquelle les tumeurs se développent chez l'animal ou l'homme sain. La base génétique de la sénescence et ses relations à la malignité font l'objet d'une recherche intensive [15].

#### Prévention du cancer

L'importance de la cancérogenèse multi-étapes ne se limite pas à simplifier notre compréhension de la manière dont se déroule la transition d'une croissance cellulaire normale à une croissance cellulaire maligne. Les études cellulaires

fondamentales mentionnées plus haut servent de base à la prévention du cancer (voir Chapitre 4). Le fait que des types de morphologie et de croissance cellulaires particuliers précèdent l'émergence d'une population cellulaire résolument maligne est à l'origine de la prévention secondaire du cancer.

A ce sujet, on notera par exemple la détection de polypes dans le côlon (fig. 3.5) et la modification morphologique sur laquelle se base le frottis cervico-vaginal (test de Papanicolaou) pour la détection précoce du cancer du col de l'utérus. En outre, des interventions diététiques ou pharmaceutiques destinées à prévenir ou à réparer ces lésions constituent les fondements de la chimioprévention [16]. Encore plus importantes, les connaissances des bases génétiques à l'origine de la croissance tumorale devraient offrir de nouveaux critères pour la détermination individuelle du diagnostic et du pronostic. Les mécanismes, dont on sait aujourd'hui qu'ils interviennent dans la prolifération des cellules cancéreuses, fournissent un point de départ pour le développement de thérapies nouvelles et plus efficaces, dépourvues des effets secondaires qui affligent actuellement souvent les patients atteints d'un cancer [17].

## REFERENCES

- Foulds L, ed. (1969) *Neoplastic Development*, Vol. 1, London, Academic Press.
- Correa P (1996) Morphology and natural history of cancer precursors. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF, eds, *Cancer Epidemiology and Prevention*, New York, Oxford University Press, 45-64.
- Ito N, Imaida K, Asamoto M, Shirai T (2000) Early detection of carcinogenic substances and modifiers in rats. *Mutat Res*, 462 : 209-217.
- Weinstein IB (1982) Carcinogenesis as a multistage process—experimental evidence. In: Bartsch H, Armstrong B, eds, *Host Factors in Human Carcinogenesis (IARC Scientific Publications No. 39)* Lyon, IARC Press, 9-25.
- Vainio H, Magee PN, McGregor DB, McMichael AJ, eds (1992) *Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification (IARC Scientific Publications No. 116)*, Lyon, IARC Press.
- Yamasaki H, Ashby J, Bignami M, Jongen W, Linnainmaa K, Newbold RF, Nguyen-Ba G, Parodi S, Rivedal E, Schiffmann D, Simons JW, Vasseur P (1996) Nongenotoxic carcinogens: development of detection methods based on mechanisms: a European project. *Mutat Res*, 353: 47-63.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 319: 525-532.
- Balmain A, Harris CC (2000) Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. *Carcinogenesis*, 21: 371-377.
- Evan GI, Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411: 342-348.
- Loeb LA (2001) A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res*, 61: 3230-3239.
- Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, 400: 464-468.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*, 61: 3225-3229.
- Marnett LJ, Plataras JP (2001) Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet*, 17: 214-221.
- Armitage P, Doll R (1954) The age distribution of cancer and a multistage theory of carcinogenesis. *Br J Cancer*, 8: 1-12.
- Wynford-Thomas D (1999) Cellular senescence and cancer. *J Pathol*, 187: 100-111.
- Bartsch H (2000) Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention: a summary and challenge of 20 years of interdisciplinary research. *Mutat Res*, 462: 255-279.
- Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G (2001) Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet*, 10: 657-662.

# ACTIVATION DES AGENTS CANCEROGENES ET REPARATION DE L'ADN

## RESUME

> Beaucoup de cancérrogènes chimiques nécessitent une activation spontanée ou enzymatique pour produire des intermédiaires réactifs qui se lient à l'ADN. Les adduits de cancérrogènes à l'ADN qui en résultent peuvent être éliminés de l'ADN par différents processus de réparation à médiation enzymatique.

> Dans les cellules et les tissus présentant une déficience de la capacité de réparation de l'ADN, la réplication de l'ADN endommagé par des cancérrogènes peut aboutir à la mutation de gènes qui régulent la croissance cellulaire et la différenciation dans les populations de cellules cibles. Ces modifications génétiques conduisent généralement à une instabilité génétique progressive qui aboutit à une croissance non contrôlée, à une déficience de la différenciation, à l'invasion et aux métastases.

Des études expérimentales sur des rongeurs et des cellules en culture ont conduit à la classification des cancérrogènes chimiques en deux grandes catégories: génotoxiques et non-génotoxiques. Les cancérrogènes génotoxiques modifient la structure de l'ADN, principalement par des liaisons covalentes aux sites nucléophiles. Ces lésions, c'est-à-dire l'entité chimique du cancérrogène lié à l'ADN, sont appelées 'adduits' à l'ADN. La réplication de l'ADN contenant des adduits non réparés peut soit engendrer des modifications de séquences (mutations) dans les molécules d'ADN filles nouvellement synthétisées, soit des réarrangements de l'ADN qui se manifestent par des aberrations chromosomiques.

Cet événement génétique irréversible et critique peut ainsi déboucher sur la fixation de la modification structurelle originale dans l'ADN, ce qui se traduit par la présence d'une lésion génétique permanente et transmissible, ou par la perte

des informations génétiques via des altérations chromosomiques. Cette modification héréditaire, à laquelle on fait parfois référence comme à l'étape 'd'initiation' du processus tumorigène (fig. 3.7), peut perturber le contrôle de la croissance dans la cellule affectée.

## Activation des cancérrogènes

La première indication d'une association de certains cancers à l'exposition à des produits chimiques fut mise en évidence à partir d'observations faites par des cliniciens au XVIIIème et au XIXème siècles. Le domaine de la cancérogenèse chimique expérimentale est né en 1915 avec les expériences de Yamagiwa et Ichikawa, qui ont démontré que l'application de goudron sur des oreilles de lapins induisait des tumeurs cutanées. Dans les années 1940, des expériences sur la peau de souris ont établi l'évolution par étapes du cancer et ont permis de définir deux classes d'agents, les initiateurs et les promoteurs [1]. La plupart des cancérrogènes sont soumis au métabolisme qui aboutit à leur élimination, mais au cours duquel des intermédiaires réactifs sont générés. Cette activation métabolique a pour résultat la modification des macromolécules cellulaires (acides nucléiques et protéines) [2]. Par conséquent, des tests de mutagénicité utilisant des bactéries et des cellules mammaliennes en culture ont été mis au point et sont largement utilisés pour identifier des cancérrogènes potentiels. Il n'est toutefois pas possible de démontrer que tous les produits chimiques connus pour provoquer le cancer se lient à l'ADN et dès lors de les classer comme 'génotoxiques'. L'activation de cancérrogènes chimiques dans le tissu mammalien est principalement le résultat de l'oxydation par les mono-oxygénases microsomaux (cytochromes P450, enzymes de phase I). Les cytochromes P450 sont situés dans le réticulum endoplasmique (membranes internes de la cellule) et constituent une superfamille protéique; on en connaît actuellement environ 50 chez l'homme.

Les produits d'oxydation sont des substrats pour d'autres familles d'enzymes (transférases, enzymes de phase II) qui lient les résidus cancérrogènes à un groupement glutathione, acétyle, glucuronide ou sulfate. Les conjugués résultants sont hydrophiles et peuvent ainsi être facilement excrétés. Les métabolites électrophiles cancérrogènes se présentent comme des produits intermédiaires de ces réactions métaboliques. Les voies métaboliques sont bien caractérisées pour les principales classes de cancérrogènes chimiques (fig. 3.8), englobant les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les amines aromatiques, les N-nitrosamines, les aflatoxines et les halogénures de vinyle qui donnent des espèces électrophiles par activation de la phase I [3]. D'autres voies métaboliques sont connues. A titre d'illustration, les dihaloalcanes sont activés en des métabolites cancérrogènes par les glutathion-S-transférases.

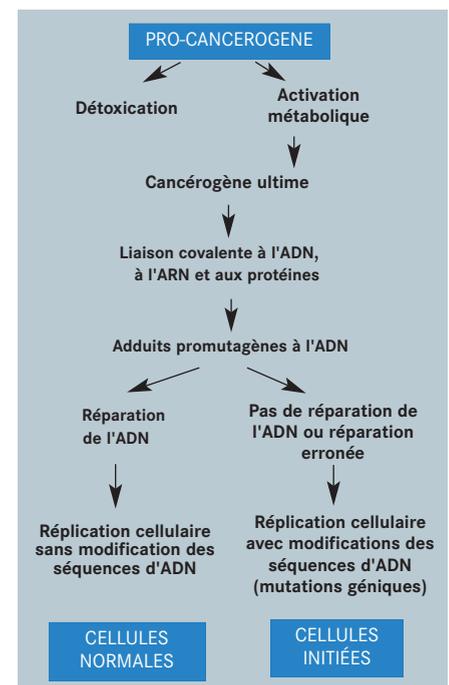
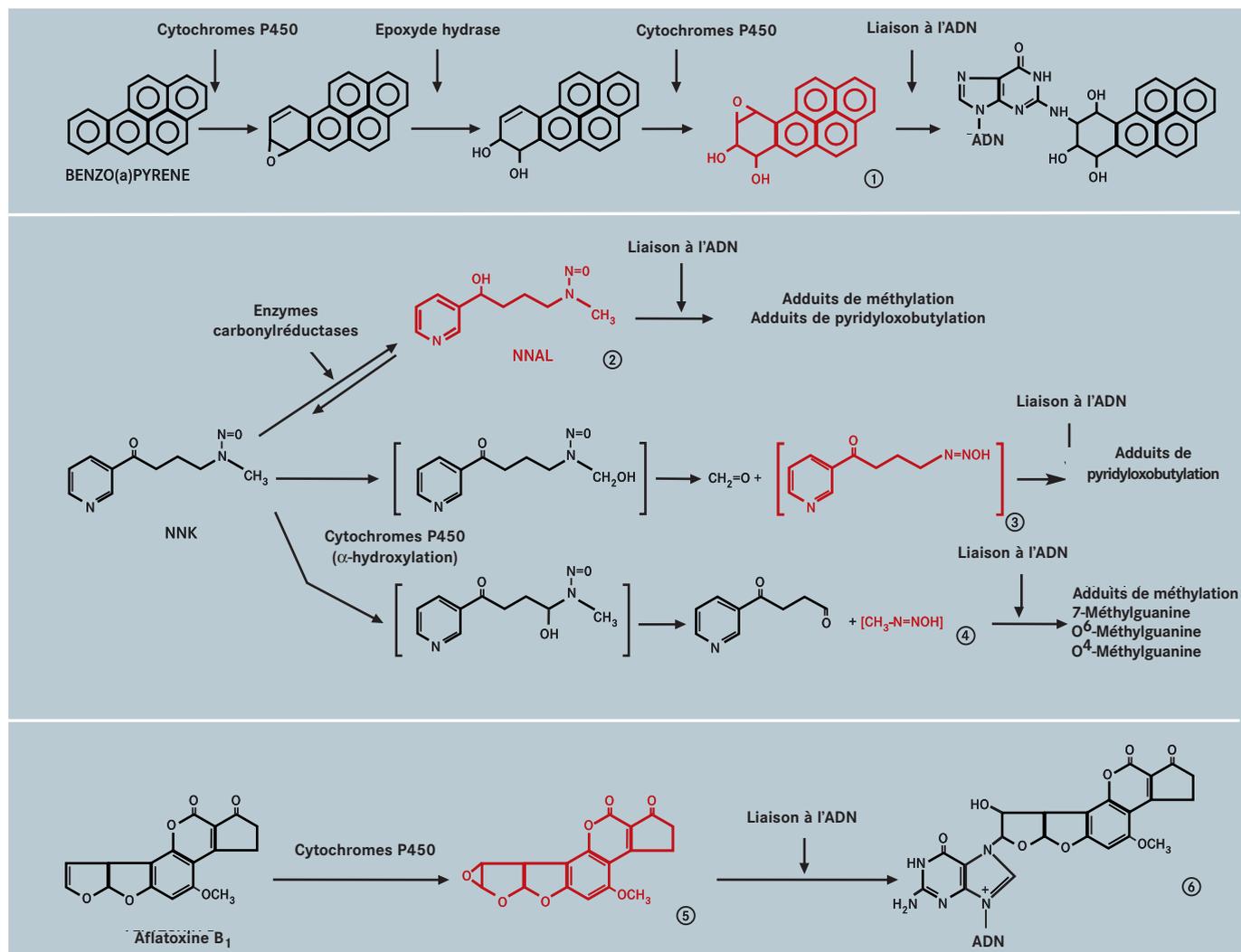


Fig. 3.7 Etapes critiques du processus d'initiation induit par des produits chimiques génotoxiques

La compréhension des interactions cancérogènes-ADN (fig. 3.9) provient largement de la mise au point de méthodes sensibles et spécifiques de détermination des adduits à l'ADN [4]. Les méthodes les plus fréquemment employées sont les dosages immunologiques utilisant des anti-sérums ou anticorps spécifiques de l'adduit, le post-marquage au  $p^{32}$ , la spectroscopie de fluorescence, la détection électrochimique et la spectrométrie de masse. La mesure des adduits cancérogènes-ADN chez les rongeurs a révélé

des corrélations entre la concentration en cancérogènes dans l'environnement, les teneurs en adduits à l'ADN dans les tissus où les tumeurs peuvent se développer, et l'incidence du cancer. On a par conséquent admis que les adduits à l'ADN pouvaient être utilisés comme des indicateurs de l'exposition biologique réelle, et par conséquent du risque cancérogène pour l'homme [5]. L'analyse des adduits à l'ADN reste toutefois difficile dans les cellules et les tissus humains en raison des taux vraiment très faibles d'adduits présents dans

l'ADN (le plus souvent un adduit pour  $10^7$  à  $10^8$  nucléotides parents). Les activités enzymatiques intervenant dans le métabolisme des cancérogènes varient beaucoup d'un individu à l'autre en raison des processus d'induction et d'inhibition ou des polymorphismes génétiques qui peuvent les modifier. Ces variations peuvent affecter la formation des adduits cancérogènes-ADN, conjointement avec d'autres déterminants génétiques qui régulent la réparation de l'ADN ou le contrôle du cycle cellulaire, par



**Fig. 3.8** Activation cancérogène par les enzymes mammaliennes : les réactions catalysées au cours du métabolisme du benzo[a]pyrène et du NNK (4-(méthyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone), tous les deux contenus dans le tabac, et de l'aflatoxine B<sub>1</sub>, produisent des intermédiaires réactifs (cancérogènes ultimes, en rouge, qui se lient à l'ADN. D'autres mécanismes de réaction conduisant à la formation de glucuronides et d'autres esters, qui sont excrétés, ne sont pas illustrés. 1. Benzo(a)pyrène-7,8-diol-9,10-époxyde; 2. 4-(Méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol; 3. Diazohydroxyde; 4. Diazohydroxyde 5. Aflatoxine B<sub>1</sub>-8,9-oxyde; 6. 2,3-Dihydro-2-(N'-guanyl)-3-hydroxyaflatoxine B<sub>1</sub>

exemple, et qui peuvent ainsi avoir un impact sur les conséquences de l'exposition à des agents endommageant l'ADN et influencer le risque de cancer chez différents individus [6]. Beaucoup d'études ont essayé de corréler les polymorphismes génétiques, les teneurs en adduits et le risque de cancer dans des populations humaines (*Les prédispositions génétiques*, p. 71). Ces études ont jusqu'à présent fourni certaines corrélations concernant la prédiction des risques au niveau de la population. Cependant, en raison du grand nombre d'enzymes et de polymorphismes impliqués, des études à grande échelle et des analyses à haut débit (basées sur des biopuces à ADN, par exemple) seront nécessaires pour élucider totalement la nature complexe de ces interactions gènes-environnement.

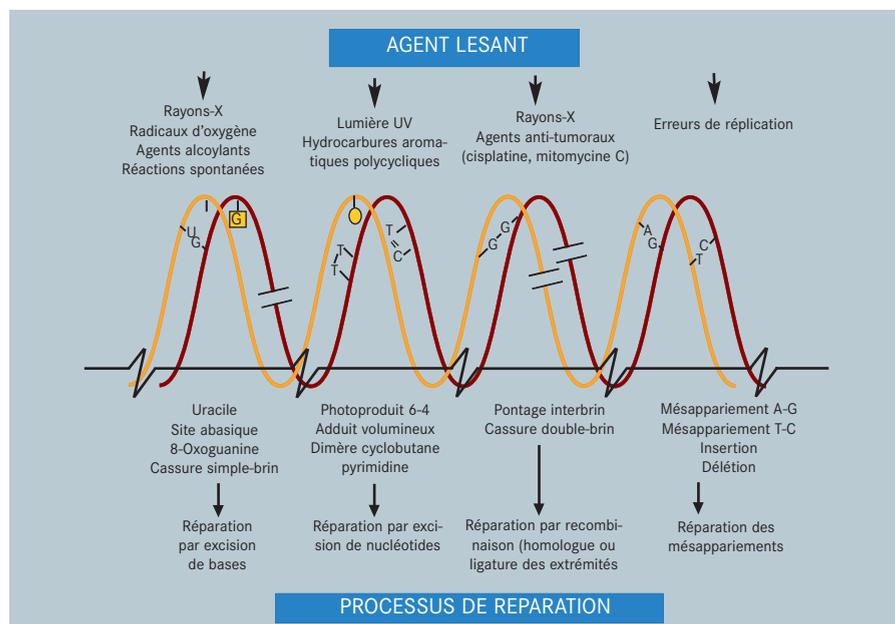
### Spectres de mutations

Comme cela a été indiqué, il est possible d'utiliser des adduits à l'ADN et aux protéines comme marqueurs précoces de l'exposition aux cancérogènes. Cependant, les adduits ne persistant que peu de temps (quelques heures à quelques jours pour les adduits à l'ADN, quelques semaines à quelques mois pour les

adduits à l'albumine ou à l'hémoglobine), leur utilité en tant que marqueurs d'exposition est limitée. Les mutations des gènes spécifiques peuvent être utilisées comme des 'biomarqueurs' à plus long terme des effets biologiques précoces ou de la maladie [7]. En effet, les spectres de mutations sont probablement le seul marqueur biologique qui puisse être caractéristique d'une exposition passée à un agent ou un mélange cancérogène. L'étude de ces mutations facilitera de plus en plus l'identification de ces agents étiologiques lors des études portant sur la prédiction du risque et la prévention du cancer. Les spectres de mutations peuvent être analysés soit dans les tissus normaux (y compris les cellules sanguines), soit dans les tissus tumoraux. L'analyse des mutations dans les tissus normaux reste difficile parce que la cellule mutante ou l'ADN mutant doit être identifié(e) au milieu d'un très grand nombre de cellules non mutantes, ou d'ADN non mutant, et une étape de sélection ou d'enrichissement est alors nécessaire. En revanche, les mutations des cellules tumorales favorisent souvent la croissance et sont amplifiées en raison de l'expansion clonale de la population de cellules tumorales.

Certains gènes sont des marqueurs adaptés ('rapporteurs) de l'induction d'une mutation chez l'animal de laboratoire et chez l'homme. Ainsi, le gène de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transférase (gène *HPRT*), lorsqu'il est inactivé par mutation, rend les cellules résistantes à l'inhibition de la croissance par la 6-thioguanine. Il est par conséquent possible d'isoler ces cellules mutantes en les cultivant en présence de cet agent. Des études chez l'homme ont associé l'augmentation de la fréquence des mutations du gène *HPRT* (mesurées dans les lymphocytes circulants) à l'exposition à des agents génotoxiques environnementaux. Cependant, contrairement aux observations faites chez les rongeurs, chez lesquels les profils des mutations reflètent souvent des lésions de l'ADN relativement extrêmes qui les ont induits, les spectres de mutations caractéristiques du gène *HPRT* (c'est-à-dire les types et les positions des modifications de bases à l'intérieur de la séquence d'ADN du gène *HPRT*) sont plus difficiles à observer chez l'homme.

L'identification des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur (*Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur*, p. 97) a permis de caractériser les mutations génétiques plus directement associées à la cancérogenèse. La famille d'oncogènes *RAS* fut l'une des premières à avoir été reconnue porteuse de mutations dans une grande variété de cancers humains. Le gène *p53* est le gène suppresseur de tumeur le plus souvent altéré dans le cancer humain, sachant qu'il est muté dans plus de 50 % de pratiquement tous les types de tumeurs. Une grande base de données de toutes les mutations de *p53* a été créée. On a identifié des spectres de mutations qui mettent en évidence l'action directe des cancérogènes environnementaux dans le développement de certains cancers (il est possible dans ce cas-là d'établir une relation causale entre le cancer et une exposition passée à un agent cancérogène précis). Ces mutations, qui pourraient en principe être utilisées pour identifier l'exposition à des agents particuliers, ont été dénommées mutations 'caractéristiques'.

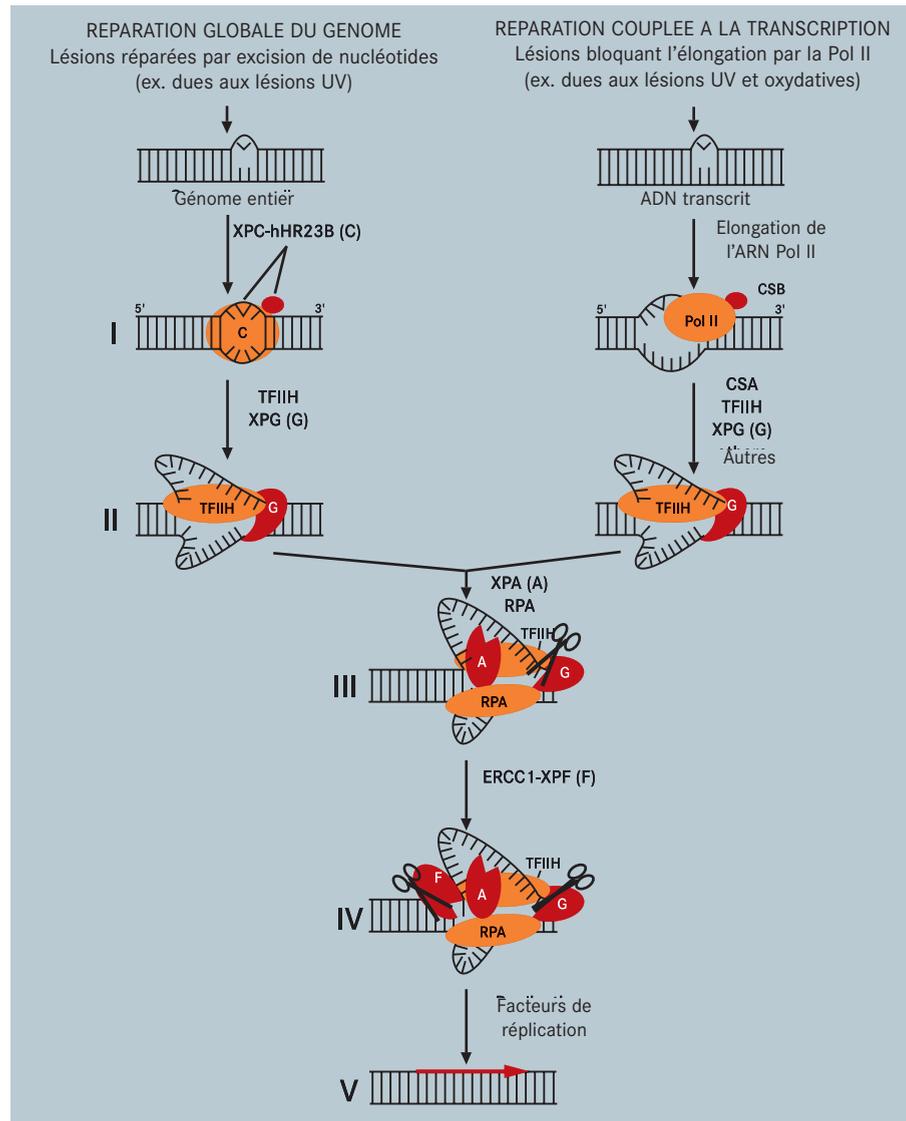


**Fig. 3.9** Agents lésant fréquemment l'ADN, exemples de lésions sur l'ADN induites par ces agents et principaux mécanismes de réparation de l'ADN, responsables de la suppression de ces lésions.

Elles résultent de la formation d'adduits à l'ADN spécifiques. Par exemple, des mutations de *p53*, caractéristiques de l'agent étiologique connu ou suspecté, apparaissent dans le cancer du poumon (peut-être attribuées au benzo[a]pyrène présent dans la fumée de tabac) et dans les carcinomes hépatocellulaires (dus à l'aflatoxine B<sub>1</sub> dans la nourriture contaminée) (encadré: *Variations géographiques des spectres de mutation*, p. 103). Il n'est cependant pas toujours pratique d'obtenir de l'ADN de tissu sain pour analyser les mutations potentiellement tumorigènes, étant donné qu'il est nécessaire d'avoir recours à des procédés d'échantillonnage invasifs. Heureusement, les produits protéiques des gènes mutés, voire l'ADN muté lui-même, peuvent être détectés et mesurés dans les liquides corporels ou les sécrétions comme le plasma sanguin, qui ont été en contact avec le tissu malin. Des mutations caractéristiques présumées ont aussi été identifiées dans des tissus 'normaux' (non pathologiques mais contenant probablement des cellules initiées) d'individus exposés. Par exemple, la mutation de *p53* associée à une exposition à l'aflatoxine B<sub>1</sub> a été découverte dans le tissu hépatique et dans l'ADN plasmatique de sujets sains (non cancéreux) qui avaient consommé de la nourriture contaminée par les aflatoxines. Par conséquent, les mutations des gènes du cancer pourraient être utilisées, dans certains cas, comme des indicateurs précoces du risque avant le diagnostic de la maladie.

### Réparation de l'ADN

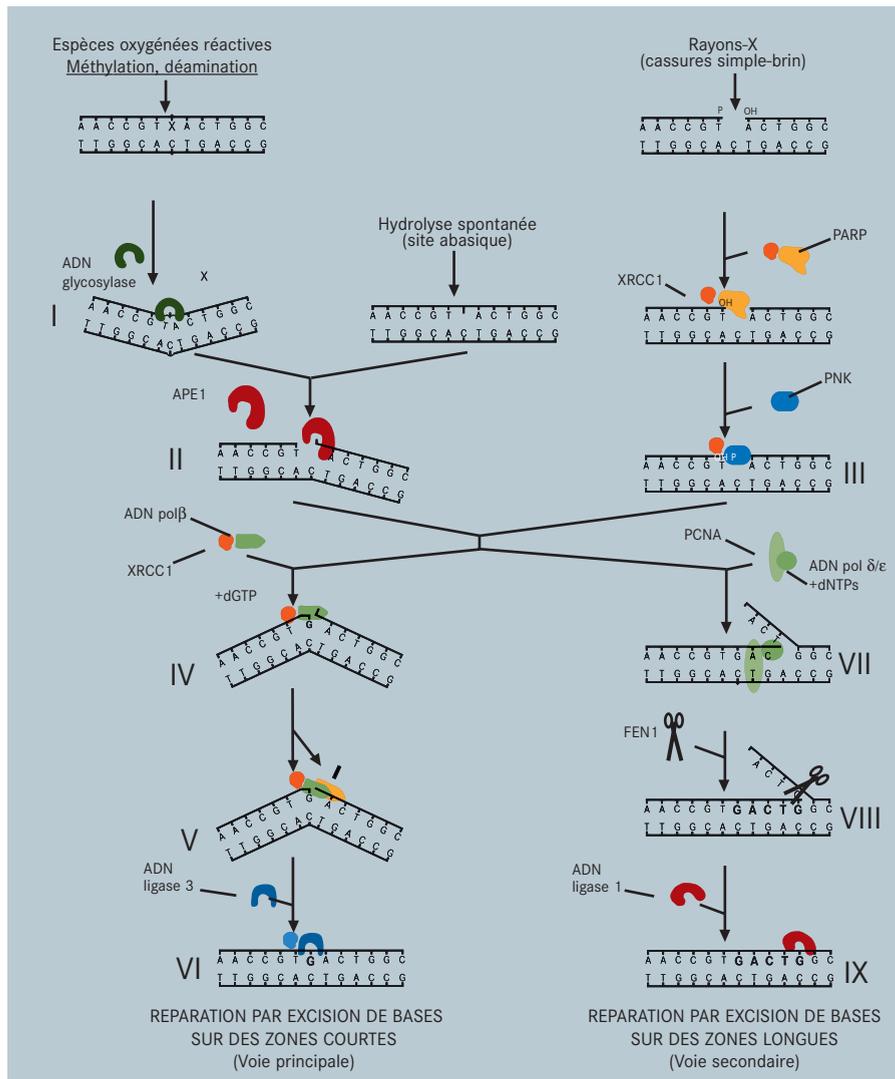
Les 3 x 10<sup>9</sup> nucléotides de l'ADN à l'intérieur de chaque cellule humaine sont constamment exposés à un ensemble d'agents lézants à la fois d'origine environnementale (exogène), comme les rayons du soleil ou la fumée de tabac, et d'origine endogène, comme l'eau ou l'oxygène [8] (Tableau 3.2). Ce scénario requiert une surveillance constante pour que les nucléotides endommagés soient éliminés et remplacés, avant que leur présence dans un brin d'ADN ne conduise à l'apparition de mutations [9]. La restauration de la structure normale de l'ADN est réalisée dans les cellules humaines



**Fig. 3.10** Réparation par excision de nucléotides (NER). Deux voies de NER sont prédominantes pour éliminer l'ADN lésé par la lumière UV et par les cancérogènes. Dans la NER globale du génome, la lésion est reconnue par les protéines XPC et hHR23B, alors que dans la NER couplée à la transcription des gènes codant pour des protéines, la lésion est reconnue lorsqu'elle bloque l'ARN polymérase II. Après la reconnaissance, les deux voies sont similaires. Les hélicases XPB et XPD du facteur de transcription à multiples sous-unités TFIIH déroulent l'ADN autour de la lésion (II). La protéine de liaison simple brin RPA stabilise la structure intermédiaire (III). XPG et ERCC1-XPF clivent les bords du brin endommagé, générant un oligonucléotide à 24-32 bases contenant la lésion (IV). Le mécanisme de réplication de l'ADN procède alors à la ligation des extrémités libres (V).

par l'une des quelques enzymes de réparation de l'ADN qui excisent les bases endommagées ou inadaptées et les remplacent par une séquence nucléotidique normale. Dans ce cas, on parle de 'réparation par excision'. Deux voies de répara-

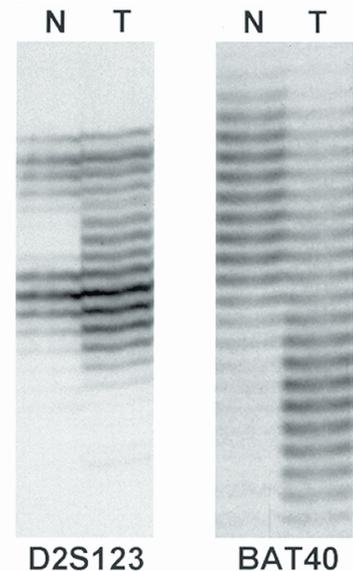
tion principales fonctionnent de cette manière: la 'réparation par excision de bases' qui opère principalement sur des modifications provoquées par des agents endogènes, et la 'réparation par excision de nucléotides' qui supprime les lésions



**Fig. 3.11** Etapes de la réparation par excision de bases. Un grand nombre de glycosylases sont impliquées, chacune d'entre elles s'occupant d'un spectre de lésions relativement étroit. La glycosylase comprime le squelette de l'ADN pour propulser la base suspecte hors de l'hélice d'ADN. La base endommagée est clivée à l'intérieur de la glycosylase, produisant un site 'abasique' (I). L'endonucléase APE 1 clive le brin d'ADN au site abasique (II). Dans la réparation de cassures simple-brin, la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) et la polynucléotide kinase (PNK) peuvent être impliquées. Dans la voie de réparation sur des zones courtes, l'ADN polymérase β remplit le vide laissé par le nucléotide unique et les extrémités de la cassure simple brin sont ligaturées par l'ADN ligase 3. La voie de réparation sur des zones longues requiert l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA), et les polymérases β, ε et δ remplissent le vide laissé par les 2 à 10 nucléotides. La flap endonucléase (FEN-1) retire le fragment d'ADN contenant la lésion et les extrémités du brin sont ligaturées par l'ADN ligase 3.

induites par des mutagènes environnementaux. La lumière ultraviolette est probablement le mutagène exogène le plus courant auquel les cellules humaines sont exposées, et l'importance de la voie de réparation par excision de nucléotides dans la pro-

tection contre la cancérogenèse induite par les UV est clairement démontrée dans la pathologie héréditaire 'xeroderma pigmentosum'. Les individus affectés par cette maladie sont dépourvus de l'une des enzymes impliquées dans la réparation par excision de



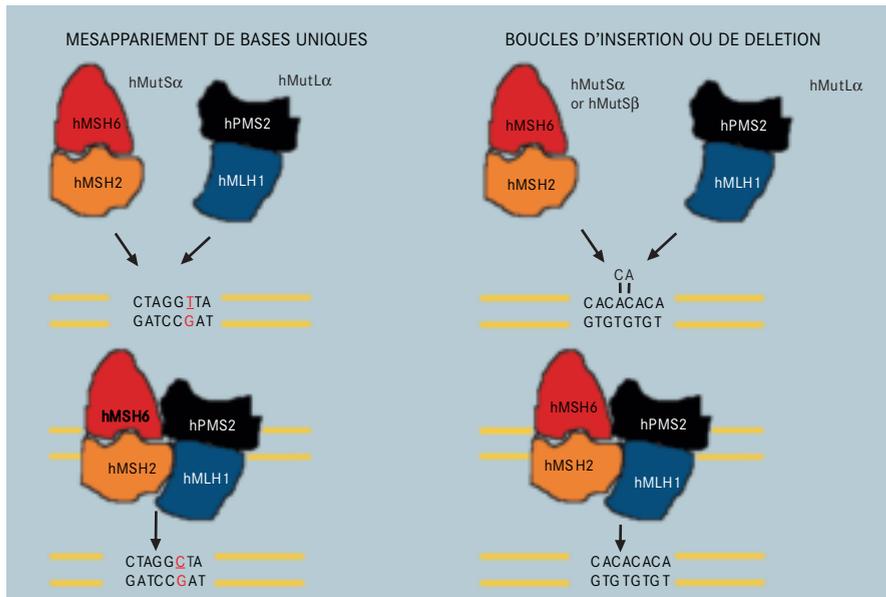
**Fig. 3.12** Dans le génome humain, de petites séquences d'ADN sont répétées plusieurs fois à différents endroits. Elles sont appelées 'microsatellites'. Dans l'ADN d'un patient présentant un cancer colorectal héréditaire sans polypose, le nombre de ces répétitions des microsatellites est modifié. Remarquez la différence entre le motif des microsatellites dans un tissu normal (N) et dans un tissu tumoral (T) du même patient. Cette instabilité des microsatellites est due à des erreurs post-réplcatives de réparation des mésappariements de l'ADN.

nucléotides et présentent un risque 1000 fois supérieur de développer un cancer de la peau après une exposition solaire par rapport aux individus normaux. Les gènes en question ont été appelés *XPA*, *XPB*, etc. [10].

L'un des plus grands exploits des dernières décennies a été l'isolation et la caractérisation des gènes et de leurs produits protéiques, impliqués dans la réparation par excision de bases et dans la réparation par excision de nucléotides. Il est devenu évident que certaines protéines ainsi identifiées n'étaient pas exclusivement impliquées dans la réparation de l'ADN, mais jouaient aussi un rôle à part entière dans d'autres processus cellulaires tels que la réplication et la recombinaison de l'ADN.

#### Réparation par excision

La première étape dans la réparation par excision de bases et dans la réparation par excision de nucléotides est la



**Fig. 3.13** Voies de réparation des mésappariements: après la synthèse de l'ADN, les erreurs d'appariement des bases qui ont échappé à la fonction de correction de l'ADN polymérase sont reconnues par les protéines de réparation des mésappariements.

reconnaissance d'une modification dans l'ADN par des enzymes qui détectent soit des formes spécifiques de lésions, soit une distorsion dans l'hélice d'ADN. La reconnaissance d'une lésion est suivie d'une étape d'excision au cours de laquelle l'ADN contenant le nucléotide modifié est supprimé. La fermeture du brin d'ADN par synthèse et ligation des extrémités libres

termine le processus de réparation de l'ADN.

La réparation par excision de nucléotides peut avoir lieu dans les régions non transcrites (ne codant pas pour des protéines) de l'ADN (fig. 3.10, étapes I à V). Une distorsion de l'ADN est reconnue, probablement par la protéine XPC-hHR23B (I). Une structure de bulle ouverte

se forme alors autour de la lésion lors d'une réaction qui fait appel aux activités hélicases ATP-dépendantes de XPB et de XPD (deux des sous-unités de TFIIH) et qui recrute aussi XPA et RPA (II-III). Les nucléases XPG et ERCC1-XPF excisent et libèrent un oligonucléotide de 24 à 32 résidus (IV), la fermeture du brin d'ADN est réalisée par des polymérases (POL)  $\epsilon$  et  $\delta$  PCNA-dépendantes et les extrémités libres sont ligaturées par une ADN-ligase, que l'on présume être *LIG1* (V). La réparation par excision de nucléotides dans des régions qui sont transcrites (et qui, par conséquent, codent pour des protéines) requiert l'action de TFIIH [11].

La réparation par excision de bases (fig. 3.11, étapes I à VI ou étapes III à IX) implique le retrait d'une seule base grâce au clivage de la liaison sucre-base par une ADN-glycosylase spécifique de la lésion (par exemple, hNth1 ou l'uracile ADN-glycosylase) et l'incision par une nucléase apurinique/aprimidinique (AP1 humain) [12]. La fermeture du brin d'ADN peut se faire par remplacement d'une seule base ou par re-synthèse de plusieurs bases dans le brin lésé, selon la voie utilisée.

Des formes plus complexes et moins habituelles des lésions de l'ADN, telles que des cassures d'ADN double-brin, des sites groupés de lésions de bases et des lésions non codantes qui bloquent le processus de réplication normal, sont

Agent	Région hypersensible aux mutations	Type de mutation (> = changement en)	Tumeurs associées
Benzo[a]pyrène (fumée de tabac)	Codons 157, 158, 248, 273	Transversions G>T	Poumon, larynx
Amino-4 biphényl (colorants aromatiques, fumée de tabac)	Codons 280, 285	Transversions G>C Transitions G>A	Vessie
Aflatoxine B <sub>1</sub>	Codon 249	AGG>AGT (arginine > sérine)	Carcinome hépatocellulaire
Ultraviolet (UV)	Codons 177-179, 278	Transitions C>T Transitions CC>TT	Cancer de la peau (pas le mélanome)
Chlorure de vinyle	Plusieurs codons	Transversions A>T	Angiosarcome du foie
Mécanisme endogène (favorisé par NO)	Codons 175, 248, 273, 282	Transitions C>T aux dinucléotides CpG	Cancers du colon, de l'estomac, du cerveau

**Tableau 3.2** Spectres de mutations *p53* provoquées par des cancérogènes environnementaux ou des mécanismes endogènes

prises en charge par d'autres mécanismes. Les pathologies humaines héréditaires dans lesquelles les patients présentent une sensibilité extrême aux rayonnements ionisants et une réaction modifiée aux cassures de brins, comme l'ataxie télangiectasie et le syndrome de Nimègue, constituent des modèles utiles pour l'étude des enzymes réparatrices impliquées dans ces processus. En effet, si l'élucidation de la réparation par excision de bases et de la réparation par excision de nucléotides fut l'avancée la plus importante de la fin des années 1990, alors la compréhension de la réparation des cassures de brins sera probablement l'avancée la plus décisive de la décennie à venir. Ceci aura des conséquences considérables. Certains cancers sont souvent traités par radiothérapie (*Radiothérapie*, p. 284), mais un petit pourcentage de patients font preuve d'une sensibilité considérable à ce traitement, ce qui oblige à limiter le protocole de traitement pour éviter les réactions indésirables. Une meilleure compréhension des raisons de cette radiosensibilité, et notamment la caractérisation des enzymes impliquées dans la réparation des lésions de l'ADN produites par les rayonnements ionisants, peut déboucher sur une meilleure personnalisation des doses de radiothérapie pour les patients.

#### Autres voies de réparation

Les cellules humaines, comme les cellules eucaryotes et procaryotes, peuvent aussi réaliser une forme très spécifique de réparation des lésions, la conversion de l'adduit méthylé O<sup>6</sup>-méthylguanine en une base normale de l'ADN (fig. 3.14). L'O<sup>6</sup>-méthylguanine est une lésion due à une erreur de lecture: ni l'ARN-polymérase ni l'ADN-polymérase ne la 'lisent' correctement lorsqu'elles transcrivent ou répliquent une matrice d'ADN la contenant. Etant donné que cette base modifiée peut s'apparier à la fois avec la cyto-

sine (sa partenaire normale) et la thymine (une partenaire erronée), sa présence dans l'ADN peut donner lieu à des mutations de transition par un mésappariement des bases concernées. Une protéine spécifique, l'O<sup>6</sup>-alkylguanine-ADN-alkyltransférase, catalyse le transfert du groupe méthyle de la guanine vers un résidu d'acide aminé cystéine situé au site actif de la protéine [13]. Ce processus fidèle restaure l'ADN dans son état original, mais provoque l'inactivation des protéines réparatrices. Par conséquent, la réparation peut être saturée lorsque les cellules sont exposées à de hautes doses d'agents alcoylants, et la synthèse de la protéine transférase est nécessaire pour que la réparation puisse se poursuivre.

Les mésappariements de bases dans l'ADN provenant d'erreurs au cours de la réplication de l'ADN, par exemple l'appariement de la guanine à la thymine plutôt qu'à la cytosine, sont réparés par plusieurs voies impliquant soit des glycosylases spécifiques qui suppriment les bases mésappariées, soit la réparation de mésappariements sur de larges zones qui a recours à des homologues des gènes bactériens *MUTS* et *MUTL* (fig. 3.13). Les boucles de délétion ou d'insertion aux séquences microsatellites peuvent être reconnues par hMutS $\alpha$  (un hétérodimère de hMSH2 et de hMSH6) ou par hMutS $\beta$  (un hétérodimère de hMSH2 et de hMSH3). Le recrutement ultérieur de hMutL $\alpha$  (un hétérodimère de hMLH1 et de hMLH2) sur l'ADN altéré cible la zone à réparer qui nécessite l'excision, la resynthèse, et la ligation. La reconnaissance d'événements de mésappariement d'un seul nucléotide requiert la fonction de hMutS $\alpha$ . Il est important que ces processus de réparation soient capables de différencier une base correcte d'une base incorrecte dans le mésappariement. Etant donné que les deux bases sont des constituants normaux de l'ADN, cette différenciation ne peut pas être réalisée par

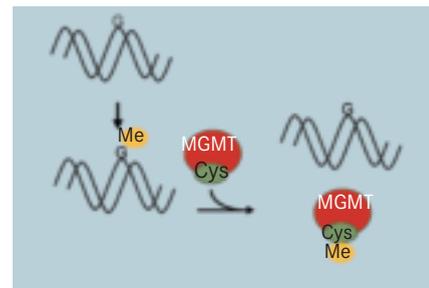


Fig. 3.14 Réparation de la O<sup>6</sup>-méthylguanine par la O<sup>6</sup>-alkylguanine-ADN-alkyltransférase.

une enzyme qui cherche dans l'ADN une lésion ou une structure qui n'est pas un constituant normal de l'ADN. Des défauts dans au moins quatre des gènes dont les produits sont impliqués dans la réparation du mésappariement, à savoir hMSH2, hMLH1, hPMS1 et hPMS2, ont été associés au cancer colorectal héréditaire non polyposique. Il s'agit de l'une des pathologies génétiques les plus courantes, qui affecte jusqu'à 1 individu sur 200 et peut représenter 4 à 13 % de tous les cancers colorectaux (*Cancer colorectal*, p. 200). Les individus atteints développent aussi des tumeurs de l'endomètre, des ovaires et d'autres organes. L'ADN des tumeurs cancéreuses colorectales héréditaires sans polyposé se caractérise par des instabilités au niveau des répétitions mono-, di-, et trinuécléotidiques qui sont courantes dans le génome humain (fig. 3.12). Cette instabilité peut aussi s'observer dans certaines cellules tumorales colorectales sporadiques. Elle est la conséquence directe d'altérations des protéines impliquées dans la réparation des mésappariements [14]. D'une manière générale, l'instabilité génomique est considérée comme un indicateur de la croissance des cellules malignes, et comme un déterminant fondamental de la nature de celle-ci.

## REFERENCES

1. Miller EC, Miller JA (1979) Milestones in chemical carcinogenesis. *Semin Oncol*, 6: 445-460.
2. Miller JA, Miller EC (1977) Ultimate chemical carcinogens as reactive mutagenic electrophiles. In: Hiatt HH, Watson, JD, Winsten, JA eds, *Origins of Human Cancer* (Book B), Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 605-627.
3. Guengerich FP (2000) Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, 21: 345-351.
4. Hemminki K, Dipple A, Shuker DEG, Kadlubar FF, Segerbäck D, Bartsch H, eds (1994) *DNA Adducts. Identification and Biological Significance* (IARC Scientific Publications No. 125), Lyon, IARC Press.
5. Toniolo P, Boffetta P, Shuker DEG, Rothman N, Hulka B, Pearce N, eds (1997) *Application of Biomarkers in Cancer Epidemiology* (IARC Scientific Publications No. 142), Lyon, IARC Press.
6. Vineis P, Malats N, Lang M, d'Errico A, Caporaso N, Cuzick J, Boffetta P, eds (1999) *Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer* (IARC Scientific Publications No. 148), Lyon, IARC Press.
7. McGregor DB, Rice JM, Venitt S, eds (1999) *The Use of Short- and Medium-Term Tests for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation* (IARC

*Scientific Publications No. 146*), Lyon, IARC Press.

8. Friedberg EC, Walker GC, Siede W, eds (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*, Washington DC, ASM Press.
9. Lindahl T (2000) Suppression of spontaneous mutagenesis in human cells by DNA base excision-repair. *Mutat Res*, 462: 129-135.
10. de Boer J, Hoeijmakers JH (2000) Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, 21: 453-460.
11. Benhamou S, Sarasin A (2000) Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. *Mutat Res*, 462: 149-158.
12. Cadet J, Bourdat AG, D'Ham C, Duarte V, Gasparutto D, Romieu A, Ravanat JL (2000) Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. *Mutat Res*, 462: 121-128.
13. Pegg AE (2000) Repair of O<sup>6</sup>-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res*, 462: 83-100.
14. Pedroni M, Sala E, Scarselli A, Borghi F, Menigatti M, Benatti P, Percesepe A, Rossi G, Foroni M, Losi L, Di Gregorio C, De Pol A, Nascimbeni R, Di Betta E, Salerni B, de Leon MP, Roncucci L (2001) Microsatellite instability and mismatch-repair protein expression in hereditary and sporadic colorectal carcinogenesis. *Cancer Res*, 61: 896-899.

## SITES INTERNET

Liste exhaustive des gènes de réparation de l'ADN humain:  
<http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/291/5507/1284>

DNA Repair Interest Group (NCI):  
<http://www.nih.gov:80/sigs/dna-rep/>

# ONCOGENES ET GENES SUPPRESSEURS DE TUMEUR

## RESUME

- > Les cellules humaines deviennent malignes suite à l'activation des oncogènes et à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs. L'éventail des gènes impliqués varie de manière remarquable selon différentes localisations organiques.
- > Les oncogènes stimulent la prolifération cellulaire et peuvent être surexprimés par amplification génique (par exemple, *MYC*). En outre, les oncogènes peuvent être activés par des mutations (par exemple, la famille des gènes *RAS*).
- > Les gènes suppresseurs de tumeur sont le plus souvent inactivés par mutations génétiques d'un allèle (copie de gène), suivies d'une perte de l'allèle intact au cours de la réplication cellulaire (mécanisme dit de "double-frappe"). Ceci conduit à une perte de l'expression et à l'abolition de la fonction de suppression, particulièrement importante dans le contrôle du cycle cellulaire.
- > L'inactivation par mutation des gènes suppresseurs dans les cellules germinales est la cause sous-jacente de la plupart des syndromes tumoraux héréditaires. Le même type de mutation peut avoir lieu lors des mutations survenant tout au long de la vie d'un individu.

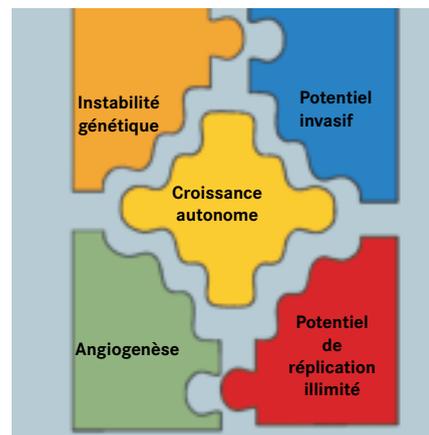
## Définitions

La nature multi-étapes de la cancérogenèse est admise depuis longtemps (*Cancérogenèse multi-étapes*, p. 84). Ces 20 dernières années, des études expérimentales sur des animaux et des études pathologiques moléculaires ont convergé pour établir la notion selon laquelle chaque étape dans la transformation maligne est déterminée par un nombre limité de modifications dans un petit sous-ensemble de plusieurs milliers de gènes cellulaires [1]. Les termes 'oncogène' et 'gène suppresseur de tumeur' sont couramment utilisés pour identifier les

ensembles de gènes impliqués dans ces séquences d'événements [2]. Ces deux groupes de gènes sont extrêmement différents en termes de nature et de fonction. Un oncogène est un gène dont la fonction est activée dans le cancer. Un certain nombre de mécanismes cellulaires simples aboutissent à cette activation, dont les mutations ponctuelles qui activent une enzyme de manière constitutive, les délétions qui suppriment les régions régulatrices négatives des protéines, ou l'augmentation de l'expression qui résulte de la dérégulation du promoteur ou de la multiplication du nombre de copies du gène (phénomène dénommé 'amplification' [3]). L'activation d'un oncogène est un mécanisme dominant, étant donné que la modification d'un seul allèle est suffisante pour conférer un gain de fonction pour l'initiation ou la progression d'un cancer. L'homologue non activé d'un oncogène est parfois appelé 'proto-oncogène'. Un proto-oncogène est en fait un gène 'normal à tous égards, ayant souvent d'importantes fonctions dans le contrôle de la signalisation de la prolifération, de la différenciation, de la motilité et de la survie cellulaires.

Un gène suppresseur de tumeur est un gène dont la modification au cours de la cancérogenèse se traduit par la perte d'une propriété fonctionnelle essentielle pour le maintien de la prolifération cellulaire normale. La perte de fonction d'un gène suppresseur de tumeur est le plus souvent un mécanisme récessif. En effet, dans la plupart des cas, les deux copies du gène doivent être inactivées pour désactiver la fonction correspondante. L'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur se produit par la perte d'allèles (la plupart du temps par la perte de sections chromosomiques entières englobant plusieurs dizaines de gènes), par de petites délétions ou insertions qui brouillent le cadre de lecture du gène, par l'atténuation transcriptionnelle consécutive à l'altération de la région promotrice, ou par des mutations ponctuelles qui changent la nature de résidus essentiels à

l'activité de la protéine correspondante. On a récemment découvert que les gènes suppresseurs de tumeur pouvaient être sous-divisés en deux groupes principaux. Les gènes du premier groupe sont surnommés 'garde-barrières'. Leurs produits contrôlent les barrières qui se trouvent sur les voies signalétiques de la prolifération cellulaire. Essentiellement, les gènes garde-barrières sont des régulateurs négatifs du cycle cellulaire, agissant comme des 'freins' sur le contrôle de la division cellulaire. Les gènes du second groupe sont dénommés 'concierges', étant donné que leur principale fonction n'est pas de contrôler la vitesse ni la durée de la division cellulaire, mais plutôt sa précision. Les gènes concierges sont généralement impliqués dans la réparation de l'ADN et dans le contrôle de la stabilité génomique. Leur inactivation ne stimule pas la division cellulaire en soi, mais sensibilise la cellule pour qu'elle acquière rapidement d'autres modifications génétiques [4]. La combinaison de l'activation d'oncogènes et de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur régit l'évolution du cancer. Les conséquences biologiques les plus évidentes de ces altérations sont la prolifération cellulaire autonome, l'augmentation de la capacité à acquérir des modifications génétiques dues à une

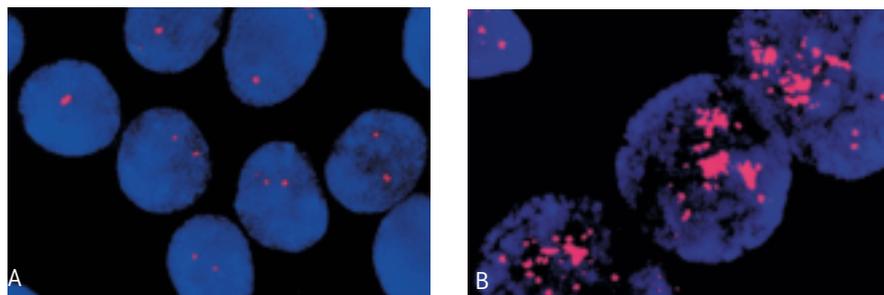


**Fig. 3.15** Puzzle du cancer: une multitude de fonctions doivent être altérées pour que la tumorigenèse ait lieu.

dérégulation de la réparation de l'ADN, la capacité de croissance dans des conditions hostiles en raison d'une diminution de l'apoptose (*Apoptose*, p. 115), la capacité d'invasion locale des tissus et de formation de métastases à distance, la capacité d'activer la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse). Ensemble, ces cinq phénomènes biologiques peuvent être caricaturés comme des pièces du 'puzzle du cancer' [5] (fig. 3.15). Aucun n'est suffisant à lui seul, mais le cancer survient lorsqu'ils interagissent dans une chaîne d'événements coordonnés, qui modifie profondément le schéma cellulaire normal de croissance et de développement.

### Oncogènes humains courants

Plusieurs proto-oncogènes courants codent pour des composants des cascades moléculaires qui régulent la réponse cellulaire aux signaux mitogènes [6], à savoir les facteurs de croissance (par exemple, *TGFA*), les récepteurs des facteurs de croissance (par exemple, les récepteurs du facteur de croissance épidermique, *EGF* et son homologue proche, *ERBB2*), les molécules de transduction du signal couplées à des récepteurs (notamment, plusieurs petites protéines liant la guanosine triphosphate (GTP) situées sur la face interne de la membrane cellulaire, comme les différents membres de la famille *RAS*), les kinases (*SRC*, *ABL*, *RAF1*), les sous-unités régulatrices des kinases du cycle cellulaire (*CCND1* et *CCNA*), les phosphatases (*CDC25B*), les molécules anti-apoptotiques (*BCL2*) et les facteurs de transcription (*MYC*, *MYB*, *FOS*, *JUN*). La nomenclature peu pratique de ces gènes (encadré : *Dénomination des gènes et des protéines*, p. 102) s'inspire grandement de la manière dont ils ont été découverts et identifiés. Le gène *SRC*, par exemple, fut le premier oncogène identifié, en 1976, comme étant une version modifiée d'un gène cellulaire incorporé dans le génome d'un rétrovirus aviaire à fort pouvoir transformant, le virus du sarcome de Rous. Le gène *MYC* fut aussi initialement identifié dans le génome d'un rétrovirus aviaire responsable de la leucémie promyélocytaire. Les gènes *RAS* furent d'abord identifiés comme des gènes activés capables d'induire la formation de



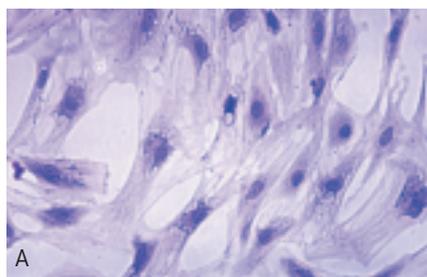
**Fig. 3.16** Analyse du statut de l'oncogène *ERBB2* par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) avec une sonde *ERBB2* marquée à la rhodamine (rose). Dans les cellules de cancer du sein qui ne présentent pas d'amplification du gène, chaque noyau possède deux copies de *ERBB2* (A). Dans les cellules tumorales présentant une amplification importante du gène, on observe de nombreux signaux dans chaque noyau (B).

sarcomes du rat, et différents membres de la famille furent découverts dans différents rétrovirus murins, tels que le virus du sarcome de Harvey (*HRAS*) et le virus du sarcome de Kirsten (*KRAS*).

Les oncogènes les plus couramment activés dans les cancers humains sont *ERBB2* (dans les cancers du sein et des ovaires), les membres de la famille *RAS* (notamment *KRAS* dans le cancer du poumon, les cancers colorectaux et pancréatiques, et *MYC* dans une grande variété de tumeurs telles que les cancers du sein et de l'œsophage, ainsi que dans certaines formes de leucémie aiguë et chronique). Ces trois exemples fournissent une excellente illustration de la diversité des mécanismes d'activation des oncogènes et de leurs conséquences sur la croissance et la division cellulaires.

### *ERBB2*

Dans le cas de *ERBB2*, l'activation oncogène est pratiquement toujours le résultat de l'amplification du gène normal [7] (fig. 3.16).

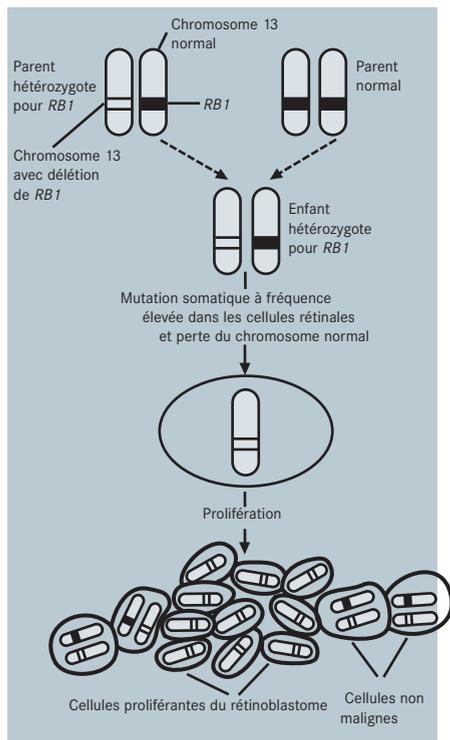


**Fig. 3.17** Dans les cultures cellulaires, l'activation d'un seul oncogène peut se traduire par une modification de la morphologie, de "normale" (A), à "transformée" (B), et ceci correspond souvent à une modification des propriétés de croissance. La transformation maligne semble requérir la coopération d'au moins trois gènes.

Ce gène se situe à l'intérieur d'une région du génome qui est amplifiée dans environ 27 % des cancers du sein avancés, conduisant à une augmentation spectaculaire de la densité de la molécule à la surface cellulaire. *ERBB2* code pour une protéine transmembranaire ayant la structure d'un récepteur de la surface cellulaire, dont la partie intracellulaire a une activité tyrosine kinase. La surexpression de *ERBB2* entraîne l'activation constitutive du signal de phosphorylation de la tyrosine favorisant la croissance. L'élucidation de ce mécanisme a conduit à la mise au point d'anticorps neutralisants et d'inhibiteurs chimiques spécifiques de l'activité tyrosine kinase pour bloquer l'action de *ERBB2* dans un cadre thérapeutique.

### *RAS*

Les gènes *RAS* se situent une étape en aval de *ERBB2* dans la cascade de signalisation de la croissance. Les produits protéiques des gènes *RAS* sont de petites protéines ancrées au côté cytoplasmique



**Fig. 3.18** Le gène du rétinoblastome est un paradigme pour les gènes suppresseurs de tumeur : si un enfant hérite d'une mutation ou d'une délétion d'une copie ('allèle') du gène du rétinoblastome, la copie normale restante a fréquemment tendance à perdre au milieu des cellules de la rétine, ce qui se traduit par la perte de fonction et la formation de tumeurs. Le diagramme illustre la perte de la totalité du chromosome normal, mais l'allèle normal peut aussi être perdu par mutation, délétion, conversion de gène ou recombinaison mitotique.

de la membrane plasmique par un fragment lipidique. Ils interagissent indirectement avec les tyrosines kinases activées et agissent comme des 'amplificateurs' pour augmenter la force du signal généré par l'activation des récepteurs de la surface cellulaire [8]. Dans leur forme active, les protéines ras lient la guanosine triphosphate (GTP) et catalysent son hydrolyse en guanosine diphosphate (GDP) en retournant à leur forme inactive. Les formes oncogènes des gènes *RAS* activés portent souvent des mutations faux-sens sur un nombre limité de codons dans le site de liaison à la GTP de l'enzyme, les rendant incapables d'hydrolyser la GTP et les piégeant ainsi sous leur forme active. L'activation des gènes *RAS* conduit la cellule à se comporter comme si les récepteurs couplés aux Ras, en amont, étaient constamment stimulés.

### MYC

L'oncogène *MYC* peut être considéré comme un prototype de la famille de molécules qui se trouve à l'extrémité réceptrice des cascades de transduction du signal. *MYC* code pour un facteur de transduction qui est rapidement activé après la stimulation de la croissance et qui est nécessaire pour que la cellule entre dans le cycle [9]. Myc transactive un certain nombre d'autres gènes cellulaires et a une large gamme d'effets moléculaires (un phénomène qui peut expliquer l'activation de Myc dans différents types

de cellules cancéreuses). L'activation de Myc passe souvent par l'amplification de la région contenant le gène sur le chromosome 8, mais Myc est aussi couramment activé par translocation chromosomique dans certaines formes de leucémie B (*Leucémie*, p. 248).

### BCL2

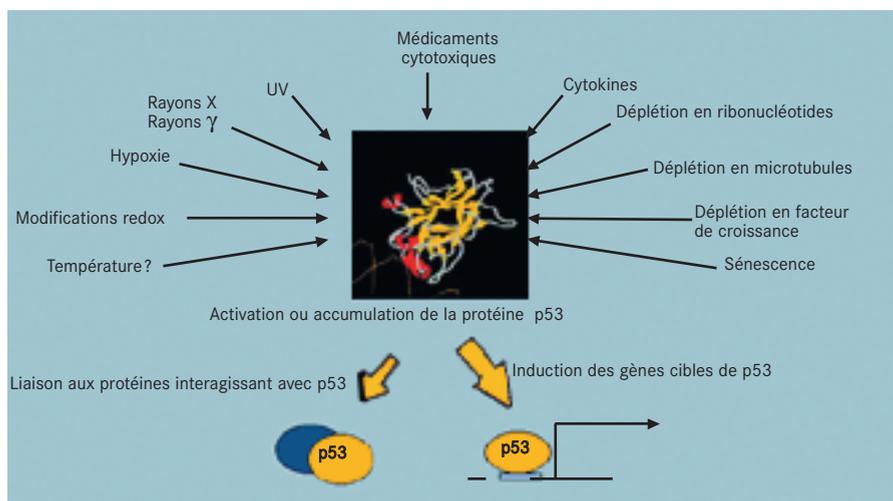
Le gène *BCL2* (activé dans les lymphomes B) représente un autre type d'oncogène. Initialement identifié comme un gène situé dans un point de cassure chromosomique dans certaines formes de leucémies, *BCL2* s'est avéré coder pour une protéine capable de rallonger la durée de vie d'une cellule en empêchant le déclenchement de la mort cellulaire programmée, ou apoptose [10] (*Apoptose*, p. 115). Des études biochimiques ont révélé que *BCL2* codait pour un régulateur de la perméabilité de la membrane mitochondriale. Les lésions mitochondriales et l'écoulement des composants mitochondriaux dans le cytoplasme représentent l'un des principaux signaux qui conduisent une cellule à l'apoptose. En aidant à maintenir fermés les mégacanaux mitochondriaux, la protéine Bcl-2 empêche cet écoulement et permet ainsi la survie des cellules qui auraient été autrement éliminées par un processus physiologique.

### Gènes suppresseurs de tumeur : histoire d'un concept

Alors que l'étude des rétrovirus et des expériences de transfection de gènes furent les clés de la découverte des oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur ont été identifiés par l'étude des grands virus à ADN et par l'analyse de syndromes tumoraux familiaux.

### Rétinoblastome

En 1971, Knudsen a proposé l'hypothèse, aujourd'hui populaire, dite de 'double-frappe' pour expliquer le caractère héréditaire du rétinoblastome, type rare de tumeur de l'enfant [11, 12] (*Les prédispositions génétiques*, p. 71). Il a posé le postulat que, dans un milieu familial, les individus pouvaient n'hériter que d'une seule copie normale du gène (localisée par des études de liaison au chromosome 13q14), l'autre



**Fig. 3.19** Plusieurs types de stress biologiques entraînent une réponse déclenchée par p53.

étant soit perdue, soit partiellement effacée, soit inactivée d'une façon ou d'une autre. En conséquence, ces individus n'auraient besoin que d'une étape mutagène supplémentaire pour désactiver la copie restante du gène, perdant ainsi totalement la fonction correspondante (fig. 3.18). Il est possible aussi que ce même type de cancer survienne de manière sporadique. Cependant, dans ce cas, deux 'frappes' consécutives seraient nécessaires (événements mutagènes) pour inactiver les deux copies du gène dans la même cellule. Cette théorie a ouvert la voie au concept moderne de gènes suppresseurs de tumeur récessifs. Le gène responsable du rétinoblastome familial a été identifié en 1988 [13]. Le gène *RB1* code pour une protéine qui se lie aux facteurs de transcription et les inactive. Ces facteurs de transcription sont essentiels pour la progression du cycle cellulaire, remplissant ainsi les fonctions de 'frein' moléculaire sur la division cellulaire.

#### Grands virus à ADN

Parallèlement aux événements mis en évidence plus haut, il est devenu évident que beaucoup de virus à ADN associés au cancer codaient pour des protéines virales complexes qui sont capables de séquestrer et d'inactiver les protéines cellulaires [14]. C'est le cas d'un virus simien tumorigène, de plusieurs adénovirus et polyomavirus, et des formes oncogènes du virus du papillome humain (VPH). Dans le cas du SV40, le virus code pour une grande protéine (l'antigène grand T) qui se lie à deux protéines cellulaires, le produit du gène *RB1* (pRb) et une protéine ubiquitaire qui fut dénommée p53 sans grande imagination. Les VPH oncogènes, quant à eux, codent pour deux protéines distinctes, E7 (qui neutralise pRb) et E6 (qui neutralise p53). Il a ainsi été suggéré que pRb et p53 pouvaient avoir des fonctions similaires et complémentaires, opérant conjointement pour lutter contre la division cellulaire.

Le 'lien manquant' dans cet édifice conceptuel était la découverte de modifications du gène codant pour p53. Celle-ci a eu lieu en 1989, lorsqu'il est apparu que le gène *p53* était souvent muté et/ou délété dans un grand nombre de formes de can-

cers [15]. Il a été découvert, en 1991, que la perte héréditaire de *p53* était associée à un syndrome familial rare de cancers multiples, le syndrome de Li-Fraumeni, dans lequel les membres atteints de la famille souffrent d'une augmentation considérable de l'incidence de nombreux types de tumeurs [16]. A l'heure actuelle, environ 215 familles dans le monde touchées par ce syndrome ont été décrites et les mutations de p53 qu'elles présentent sont recensées dans une base de données gérée par le CIRC.

#### Gènes suppresseurs de tumeurs et syndromes cancéreux familiaux

La plupart des syndromes cancéreux familiaux sont hérités comme un caractère récessif, et correspondent à l'inactivation constitutive d'un important gène suppresseur de tumeur, comme décrit ci-dessus dans le cas du rétinoblastome familial. Au cours des 15 dernières années, un grand nombre de locus contenant des gènes suppresseurs de tumeur ont été identifiés par des études de liaison dans des familles prédisposées au cancer.

#### Cancer colorectal

On a découvert, dans les cancers colorectaux, deux différents syndromes cancéreux familiaux, associés à la modification constitutive de deux ensembles distincts de gènes suppresseurs de tumeur (*Cancer colorectal*, p. 200). Les patients souffrant d'une polypose adénomateuse familiale, une maladie qui prédispose à la survenue précoce du cancer du côlon, sont souvent porteurs de modifications sur une copie du gène *APC* (pour adenomatous

polyposis coli) [17]. Ce gène joue un rôle central dans la cascade de signalisation qui couple les récepteurs de la surface cellulaire, les molécules d'adhérence calcium-dépendantes, et les facteurs de transcription qui régulent la prolifération cellulaire. La perte de fonction du gène *APC* libère ces facteurs de transcription, un événement qui favorise non seulement la formation de polypes mais aussi leur transformation en adénomes et en carcinomes.

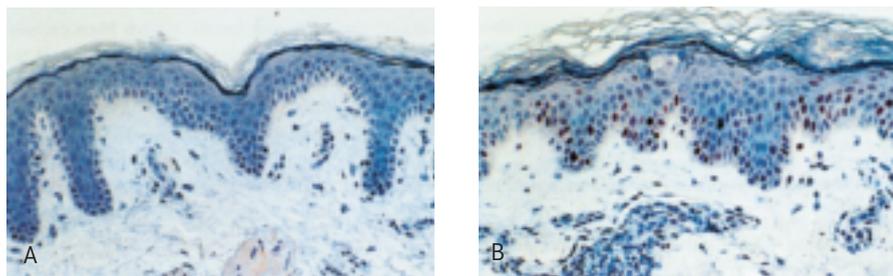
#### Cancer du sein

Deux gènes ont été identifiés comme étant impliqués dans le risque de cancer du sein familial, *BRCA1* et *BRCA2* [18]. Ces gènes codent pour de grandes protéines ayant des fonctions complexes dans plusieurs aspects de la régulation cellulaire, comme le contrôle du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Cependant, la manière dont leur inactivation contribue au déclenchement ou à l'évolution du cancer du sein reste en grande partie inconnue.

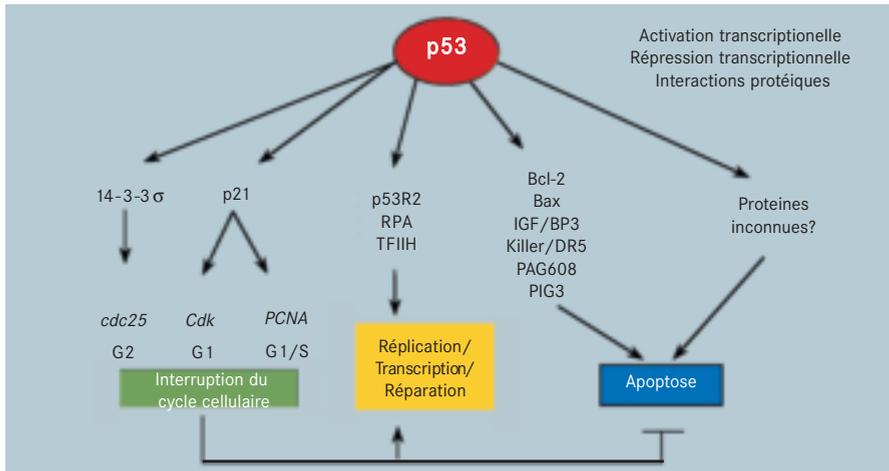
#### Autres

Dans le cas de tumeurs de Wilms héréditaires, un type de cancer rare, le gène identifié code pour une protéine essentielle à la différenciation correcte du néphron. Ce rôle vraiment spécifique peut expliquer pourquoi la perte héréditaire de ce gène ne semble pas être associée à des cancers en d'autres sites.

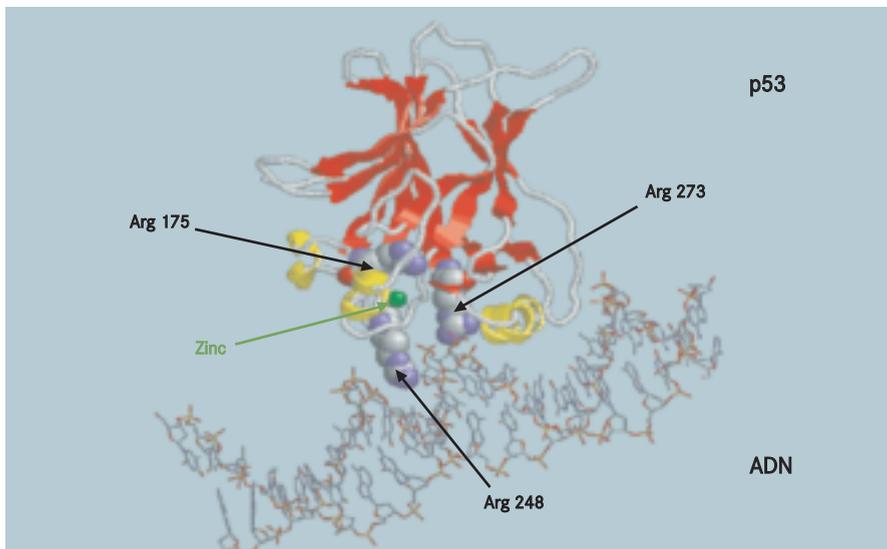
Cette brève vue d'ensemble n'offre que quelques exemples de la diversité des gènes suppresseurs de tumeur, et il ne fait aucun doute qu'un grand nombre d'entre



**Fig. 3.20** Accumulation de p53 dans l'épiderme humain après exposition aux rayons du soleil. La peau non exposée ne présente pas d'immunocoloration de la protéine p53 (A). La peau exposée (B) présente une coloration nucléaire sombre et dense des cellules épidermiques en raison de l'immunocoloration positive de p53.



**Fig. 3.21** Les voies signalétiques de réponses multiples sont déclenchées par l'accumulation de p53 dans le noyau cellulaire.



**Fig. 3.22** Modélisation moléculaire d'une partie de la protéine p53 (domaine de liaison à l'ADN), illustrant ses interactions avec l'ADN. Les acides aminés marqués (arginine 175, 248, 273) sont importants dans le maintien de l'activité biologique et représentent des 'régions hypersensibles' pour les mutations impliquées dans le cancer. L'atome de zinc est nécessaire à la stabilisation de la structure tridimensionnelle complexe de l'oligomère de p53.

eux n'ont toujours pas été identifiés. Etant donné l'ampleur du concept de 'suppresseurs de tumeur', beaucoup de gènes codant pour des composants des voies signalétiques de réponse au stress sont capables de se comporter de cette manière (puisque leur altération peut empêcher les cellules de déclencher une réponse adéquate à des formes de stress génotox-

iques, potentiellement oncogènes). Les gènes responsables de maladies héréditaires complexes telles que l'ataxie télangiectasie ou xeroderma pigmentosum (*Activation des agents cancérigènes et réparation de l'ADN*, p. 89) appartiennent à cette catégorie [19]. Une modification de ces gènes se traduit par plusieurs défauts, y compris l'hypersensibilité aux rayonnements, et par conséquent, le

développement de cancers tels que les tumeurs cutanées.

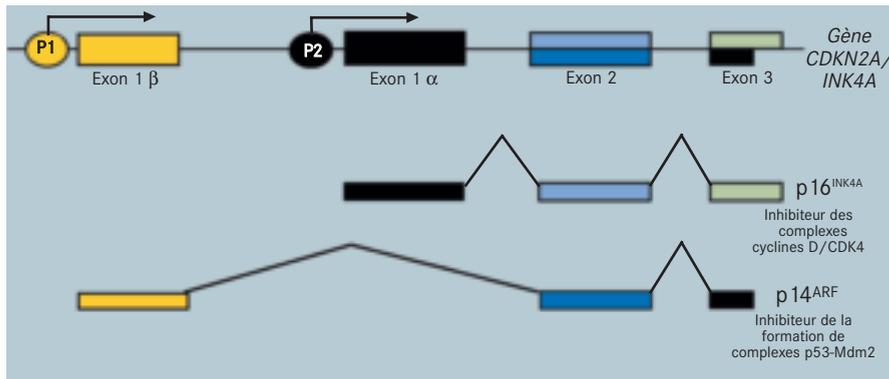
### Gènes suppresseurs de tumeurs et cancers sporadiques

Un grand nombre des gènes suppresseurs de tumeur associés à des syndromes cancéreux familiaux sont aussi mutés à des degrés variables dans plusieurs formes de cancers sporadiques. Cependant, deux d'entre eux, p53 et CDKN2A, sont généralement modifiés dans la plupart des types de cancer.

#### p53, gardien du génome

Le gène p53 code pour une phosphoprotéine de poids moléculaire de 53 000 daltons, qui s'accumule dans le noyau en réponse à différentes formes de stress, notamment aux lésions de l'ADN (fig. 3.20). Dans ce contexte, p53 agit comme un régulateur transcriptionnel, faisant augmenter ou diminuer l'expression de plusieurs dizaines de gènes intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire, dans l'induction de l'apoptose, dans la réparation de l'ADN et dans le contrôle de la différenciation. Ensemble, ces gènes exercent des effets complexes et anti-prolifératifs (fig. 3.21). Fondamentalement, lorsque des cellules sont soumises à des niveaux tolérables d'agents lésant l'ADN, l'activation de p53 se traduit par l'arrêt du cycle cellulaire, retirant temporairement les cellules du compartiment prolifératif ou induisant la différenciation. Cependant, lorsqu'il se trouve confronté à des niveaux fortement nuisibles de stress génotoxique, p53 induit l'apoptose, une forme de suicide programmé qui élimine les cellules présentant des altérations potentiellement oncogènes. Ce rôle complexe dans la protection des cellules contre les lésions de l'ADN a permis de décrire p53 comme le 'gardien du génome' [20]. La perte de cette fonction par mutation, un événement fréquent de la cancérogenèse, permettra aux cellules dont l'ADN est lésé de rester dans la population proliférative, une situation qui est indispensable à l'expansion d'un clone de cellules cancéreuses.

Le gène p53 diffère de la plupart des autres suppresseurs de tumeur par son



**Fig. 3.23** Généralement, un seul segment d'ADN code pour une seule protéine. Cependant, les protéines p16 et p14<sup>ARF</sup> sont toutes deux codées par une seule région d'ADN. P = promoteur

mode d'inactivation dans les cancers humains. Alors que la plupart des suppresseurs de tumeur sont modifiés par la perte d'allèles ou par des altérations ou insertions par délétion, *p53* est généralement la cible de mutations ponctuelles dans la partie du gène qui code pour le domaine de liaison de la protéine p53 à l'ADN (fig. 3.22). Ces mutations empêchent le pliage correct de ce domaine protéique, et par conséquent perturbent les interactions de p53 avec ses cibles d'ADN spécifiques. Cependant, les protéines mutantes sont souvent extrêmement stables et s'accumulent par conséquent à des taux élevés dans le noyau des cellules cancéreuses. Il est souvent possible de détecter l'accumulation de cette protéine par immunohistochimie dans les tumeurs primi-

tives ainsi que dans les métastases distantes. Même si toutes les mutations n'entraînent pas l'accumulation de la protéine, l'accumulation de p53 offre aux pathologistes un outil commode pour l'évaluation d'un éventuel dysfonctionnement de p53 dans les échantillons tumoraux [21]. La mutation n'est pas la seule manière d'altérer la protéine p53 lors du cancer. Dans les cancers du col de l'utérus, les mutations du gène *p53* ne sont pas fréquentes, mais la protéine est inactivée par liaison avec la protéine virale E6 produite par le VPH. Cette protéine crée un pont moléculaire entre p53 et le mécanisme de dégradation protéique, résultant en une dégradation rapide et en une élimination efficace de la protéine p53. Cette interaction joue un rôle important dans les

cancers du col de l'utérus (*Cancers de l'appareil génital féminin*, p. 218). Dans les cellules normales, la dégradation de p53 est régulée par la protéine Mdm2. Mdm2 ('murine double minute gene 2') fut identifiée à l'origine chez la souris comme le produit d'un gène amplifié dans des fragments de chromosomes aberrants dénommés 'chromosomes minuscules doubles'. L'amplification de *MDM2* est courante dans les ostéosarcomes et parfois détectée dans d'autres cancers, tels que les carcinomes ou les tumeurs cérébrales. *MDM2* se comporte aussi comme un oncogène, étant donné que son amplification entraîne l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur [22].

Le gène *p53* (et son produit) est un des gènes les plus étudiés en cancérologie humaine. Au cours des 20 années qui ont suivi sa découverte en 1979, plus de 15000 publications ont été consacrées à sa structure, sa fonction et son altération dans les cancers. Plusieurs tentatives visant à exploiter ces connaissances dans la mise au point de nouvelles thérapies basées sur le contrôle de l'activité de p53 dans les cellules cancéreuses ont été faites. La thérapie génique expérimentale a révélé qu'il était possible de restaurer la fonction de p53 dans les cellules qui avaient perdu le gène. Plus récemment, des médicaments destinés à cibler spécifiquement et à restaurer la fonction de p53 mutant ont permis d'obtenir des résultats prometteurs dans des systèmes expérimentaux. Alors

## DENOMINATION DES GENES ET DES PROTEINES

Un gène (c'est-à-dire un segment spécifique d'ADN) est conventionnellement identifié par un nom unique, en majuscules et en italique (par exemple, l'oncogène *RAS*), qui indique le caractère ou la fonction de la protéine codée, laquelle est désignée par le même nom, en minuscules (ras dans le cas du présent exemple). Les protéines sont aussi nommées par référence à leur poids moléculaire, avec le gène correspondant en exposant (par exemple, p21<sup>WAF1</sup>). Les noms des gènes sont souvent des sigles. Ils sont généralement baptisés par leur

découvreur. L'identification d'un nouveau gène est souvent suivie de la découverte de gènes structurellement apparentés ou 'homologues' (et des protéines correspondantes) et il est possible de leur donner des noms proches de celui du premier membre de la "famille" identifiée. Une telle approche de la nomenclature peut ne pas être adéquate, par exemple, dans les cas où un seul segment d'ADN code pour de multiples protéines par épissage alternatif de l'ARN messager. Il est possible que les mêmes gènes ou les mêmes protéines reçoivent une multitude de noms, en raison de leur découverte simultanée et indépendante par différents chercheurs. Ainsi, l'inhibiteur de la

kinase cycline-dépendante WAF1 est aussi connu comme *CDKN1A*, *CAP20*, *MDA-6*, *PIC-1* et *SDI-1*. Dans la littérature scientifique, tous les noms sont donnés à la première apparition, puis un seul nom est utilisé de manière cohérente dans le reste du document. Les dernières estimations du projet du Génome Humain suggèrent qu'il y aurait environ 30 000 gènes chez l'homme.

Les conventions de dénomination des gènes et des protéines font l'objet d'accords internationaux et sont continuellement soumises à des révisions (HUGO Gene Nomenclature Committee, <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>).

## VARIATION GEOGRAPHIQUE DES SPECTRES DE MUTATIONS

Les mutations des gènes du cancer sont la conséquence directe de l'attaque de l'ADN par des agents exogènes ou endogènes, ou d'erreurs dans les systèmes de réparation de l'ADN. En analysant le type et le contexte séquentiel de ces mutations, il est possible de formuler des hypothèses concernant la nature du mécanisme mutagène impliqué. Les gènes les plus intéressants à cet égard sont ceux qui sont altérés par des mutations ponctuelles faux-sens, tels que les membres de la famille *RAS*, *CDKN2A/INK4A*, et particulièrement le gène *p53*.

Le gène *p53* est le gène le plus fréquemment muté dans le cancer humain, plus de 16000 mutations étant recensées et compilées dans une base de données conservée au CIRC (<http://www.iarc.fr/p53>). La diversité de ces mutations permet l'identification de schémas qui varient selon le type de tumeur, l'origine géographique et les facteurs de risque impliqués. Ceux-ci sont souvent spécifiques des agents particuliers qui ont provoqué ces mutations. Ainsi, les mutations du gène *p53* dans les cancers peuvent être considérées comme les 'empreintes digitales' laissées par les cancérogènes dans le génome humain, et qui peuvent aider à identifier le cancérogène particulier impliqué.

Un exemple typique de ces 'empreintes digitales' est la mutation au codon 249 observée dans les cancers du foie de patients d'Afrique sub-saharienne et d'Asie de l'Est. Dans ces régions, le cancer du foie est une conséquence de l'infection chronique par les virus de l'hépatite et de l'intoxication alimentaire par

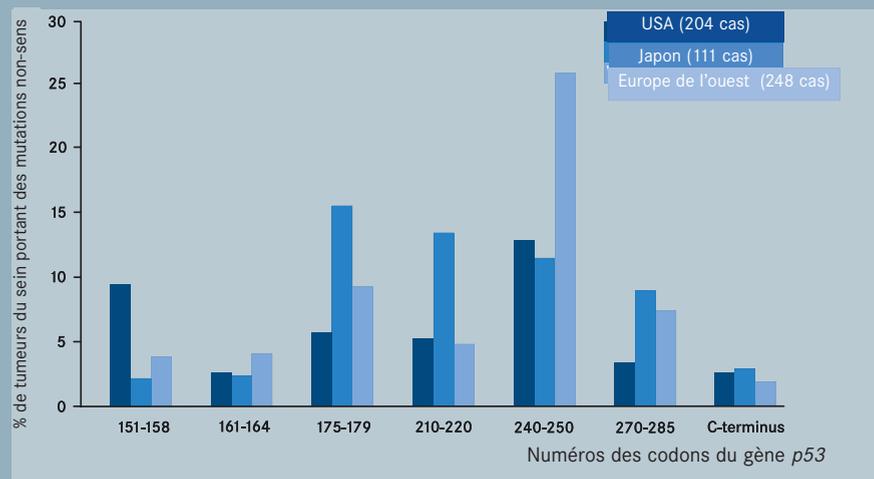


Fig. 3.24 Variations géographiques de la prévalence des mutations du gène *p53* dans les cancers du sein.

les aflatoxines, une classe de mycotoxines qui contamine les aliments traditionnels (arachides) (*Les contaminants alimentaires*, p. 43). Des expériences sur les animaux et les cultures cellulaires ont révélé que les aflatoxines pouvaient directement induire la mutation au codon 249. On ne rencontre pas cette mutation particulière des cancers du foie dans les régions du monde où l'exposition aux aflatoxines est faible, par exemple aux Etats-Unis.

Des mutations spécifiques ont aussi été observées dans les cancers du poumon des fumeurs (dues aux cancérogènes du tabac). Dans les cancers de la peau, les mutations portent les signatures chimiques typiques des lésions infligées à l'ADN par l'exposition aux rayons ultraviolets du soleil. Dans d'autres cas, illustrés par les schémas mutationnels du cancer du sein, des différences prononcées ont été observées entre les

régions, différences qui peuvent fournir des informations sur la nature des facteurs de risque impliqués.

Dans beaucoup d'autres cancers, les schémas mutationnels varient aussi d'une région du monde à l'autre. Cette variabilité peut offrir des indices concernant l'hétérogénéité génétique des populations, ainsi que la diversité des agents impliqués dans le déclenchement du cancer. Par exemple, dans les cancers de l'œsophage, les types de mutation diffèrent grandement entre les régions où l'incidence est élevée et les régions où l'incidence est faible, laissant penser que des mutagènes spécifiques sont responsables de l'incidence excessive observée dans certaines parties du monde, par exemple dans le nord de l'Iran et dans le centre de la Chine.

que les connaissances concernant les voies de *p53* s'approfondissent, on s'attend à ce que cet événement moléculaire central dans le cancer humain serve de base pour la mise au point de nouvelles thérapies.

*CDKN2A* : un locus, deux gènes  
*CDKN2*, ou 'inhibiteur de la kinase cycline-dépendante 2', est connu sous plusieurs noms, dont *INK4A* (inhibiteur de la kinase 4A), et *MTS1* (suppresseur de tumeurs

multiples 1). Le locus de *CDKN2A* se situe à l'extrémité du bras court du chromosome 9, la lettre A servant à le différencier du gène *CDKN2B*, qui n'est éloigné que de 20 kilobases.

Ce gène est unique parce qu'il contient deux cadres de lecture distincts, avec deux promoteurs différents, le même ADN étant utilisé pour synthétiser deux protéines qui n'ont pas une seule séquence d'acides aminés en commun [23] (fig. 3.23). Le premier cadre de lec-

ture qui a été découvert code pour p16, un inhibiteur des kinases cycline-dépendantes 4 et 6, qui s'associe à la cycline D1 dans la phase G1 du cycle cellulaire (*Le cycle cellulaire*, p. 105). La protéine p16 est donc un archétype de 'frein' du cycle cellulaire, sa perte conduisant à un allongement de la prolifération cellulaire et, de manière plus spécifique, à échapper à la sénescence répliative et à un allongement de la durée de vie cellulaire. L'autre cadre de lecture, dénommé p14<sup>ARF</sup> pour

'alternative reading frame' (cadre de lecture alternatif) (souvent dénommé de la même manière que son homologue murin, p19<sup>ARF</sup>), est synthétisé depuis une partie différente du locus de *CDKN2A*, mais partage un exon (l'exon 2) avec p16. Cependant, bien que la séquence d'ADN codant pour les deux produits soit identique, p16 et p14<sup>ARF</sup> utilisent des cadres de lecture différents de l'exon 2, de sorte que leurs séquences d'acides aminés sont complètement différentes. p14<sup>ARF</sup> est une protéine qui contrôle Mdm2, qui à son tour régule la stabilité de la protéine p53. L'activation de p14<sup>ARF</sup> bloque Mdm2 et résulte par conséquent en une accumulation et une activation de p53. Ainsi, le locus de *CDKN2A* se comporte comme deux gènes indépendants bien qu'ils se recouvrent partiellement. Le premier gène, codant pour p16, contrôle directement la progression du cycle cellulaire et la sénescence. Le second, codant pour p14<sup>ARF</sup>, contrôle *p53* et toutes ses fonctions anti-prolifératrices en aval. Le locus de *CDKN2A* est souvent altéré par la perte d'allèles (qui supprime à la fois p16 et p14<sup>ARF</sup>), par des mutations (plus fréquemment dans l'exon 2, commun aux

deux produits géniques), et par hyperméthylation. L'augmentation de la méthylation de régions spécifiques de l'ADN dans les promoteurs et certaines des régions codantes empêche une transcription adéquate et entraîne une diminution des taux de protéine synthétisée. Il est possible que la déficience de l'expression due à l'hyperméthylation soit la manière la plus fréquente d'altérer le locus de *CDKN2A* dans différentes formes de cancers, notamment dans les carcinomes. Les lésions des voies de p16<sup>INK4A</sup>-cycline D, CDK4-pRb et p14<sup>ARF</sup>-Mdm2-p53 sont tellement fréquentes dans le cancer, indépendamment de l'âge du patient ou du type de tumeur, qu'elles semblent être fondamentales à la cancérisation.

### Perspectives pour l'analyse moléculaire du cancer

Plus de 200 gènes altérés à des degrés variables dans différents types de cancers humains ont été caractérisés. La plupart d'entre eux ont un impact puissant sur la croissance tumorale. Cependant, il est très probable qu'un grand nombre de gènes critiques ayant des phénotypes moins manifestes n'aient pas encore été

identifiés. En particulier, les gènes impliqués dans les réponses au stress, dans le contrôle du métabolisme de l'oxygène et dans la détoxification des xénobiotiques sont tous des candidats au rôle de cofacteurs dans le processus du cancer. En outre, beaucoup d'altérations biologiques conduisant à un cancer ne peuvent pas être décelées au niveau de l'ADN. Les changements à l'origine d'un cancer peuvent résulter de la modification des niveaux d'ARN ou de la transformation de l'ARN, ainsi que de la modification de la structure et de la fonction protéiques, par un grand nombre de phénomènes épigénétiques. Le profilage systématique de l'expression des gènes dans les cellules cancéreuses révélera probablement un nouvel ensemble de gènes du cancer potentiels, altérés par des mécanismes moins évidents. Outre des études d'expression, la totalité du territoire de la structure, de la dynamique et des interactions protéiques, reste en grande partie inexplorée. La compréhension de ces processus offrira une base au développement de nouveaux moyens thérapeutiques et diagnostiques.

## REFERENCES

1. Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61: 759-767.
2. Weinberg RA (1995) The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. *Ann N Y Acad Sci*, 758: 331-338.
3. Savelyeva L, Schwab M (2001) Amplification of oncogenes revisited: from expression profiling to clinical application. *Cancer Lett*, 167: 115-123.
4. Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*, 386: 761, 763.
5. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70.
6. Hunter T (1991) Cooperation between oncogenes. *Cell*, 64: 249-270.
7. Hung MC, Lau YK (1999) Basic science of HER-2/neu: a review. *Semin Oncol*, 26: 51-59.
8. Wiesmuller L, Wittinghofer F (1994) Signal transduction pathways involving Ras. Mini review. *Cell Signal*, 6: 247-267.
9. Henriksson M, Luscher B (1996) Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res*, 68: 109-182.
10. Antonsson B, Martinou JC (2000) The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res*, 256: 50-57.
11. Knudson AG (1996) Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol*, 122: 135-140.
12. Knudson AG, Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68: 820-823.

13. Bartek J, Bartkova J, Lukas J (1997) The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. *Exp Cell Res*, 237: 1-6.
14. Lukas J, Muller H, Bartkova J, Spitkovsky D, Kjerulf AA, Jansen-Durr P, Strauss M, Bartek J (1994) DNA tumor virus oncoproteins and retinoblastoma gene mutations share the ability to relieve the cell's requirement for cyclin D1 function in G1. *J Cell Biol*, 125: 625-638.
15. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y (1989) Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, 244: 217-221.
16. Birch JM (1994) Li-Fraumeni syndrome. *Eur J Cancer*, 30A: 1935-1941.
17. Bresalier RS (1997) The gatekeeper has many keys: dissecting the function of the APC gene. *Gastroenterology*, 113: 2009-2010.
18. Zheng L, Li S, Boyer TG, Lee WH (2000) Lessons learned from BRCA1 and BRCA2. *Oncogene*, 19: 6159-6175.
19. Shiloh Y, Rotman G (1996) Ataxia-telangiectasia and the ATM gene: linking neurodegeneration, immunodeficiency, and cancer to cell cycle checkpoints. *J Clin Immunol*, 16: 254-260.
20. Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358: 15-16.
21. Hainaut P, Hollstein M (2000) p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res*, 77: 81-137.

22. Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J (1998) The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res*, 26: 3453-3459.
23. Chin L, Pomerantz J, DePinho RA (1998) The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene—two products—two pathways. *Trends Biochem Sci*, 23: 291-296.
24. Sherr CJ (2000) The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res*, 60: 3689-3695.

## SITES INTERNET

American Tissue Type Collection:  
<http://www.atcc.org/>

Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta:  
<http://www.cdc.gov/>

Cancer Genome Anatomy Project  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncicgap/>

European Bioinformatics Institute:  
<http://www.ebi.ac.uk/>

CIRC, Banque de données p53:  
<http://www.iarc.fr/p53/>

Kyoto encyclopedia of genes and genomes:  
<http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg.html>

OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man):  
<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

Protein Data Bank (une banque de données sur la structure des protéines):  
<http://www.rcsb.org/pdb/>

# LE CYCLE CELLULAIRE

## RESUME

- > Le contrôle de la division cellulaire est critique pour la structure et le fonctionnement des tissus normaux. Elle est régulée par une interaction complexe d'un grand nombre de gènes qui contrôlent le cycle cellulaire, la répliation de l'ADN (phase S) et la mitose représentant des points de contrôle majeurs.
- > Le cycle cellulaire est étroitement régulé pour minimiser la transmission de lésions génétiques aux générations de cellules suivantes.
- > La progression dans le cycle cellulaire est principalement contrôlée par les cyclines, les kinases associées et leurs inhibiteurs. Le rétinoblastome (*RB*) et le *p53* sont des gènes suppresseurs importants impliqués dans les points de contrôle en G1/S.
- > Le cancer peut être perçu comme la conséquence de la perte de contrôle du cycle cellulaire et d'une instabilité génétique progressive.

Classiquement, le 'cycle cellulaire' fait référence à un ensemble de processus moléculaires et cellulaires ordonnés au cours desquels le matériel génétique est répliqué et séparé en deux cellules filles nouvellement générées via le processus de mitose. Le cycle cellulaire peut être divisé en deux phases de modifications morphologiques et biochimiques majeures : la phase M ('mitose'), au cours de laquelle la division est évidente d'un point de vue morphologique, et la phase S ('synthèse'), au cours de laquelle a lieu la répliation de l'ADN. Ces deux phases sont séparées par des phases dites G ('gap' (interphase)). G1 précède la phase S et G2 précède la phase M.

Au cours de la progression de ce cycle de division, la cellule doit relever un certain nombre de défis très importants: s'assurer que suffisamment de ribonucléotides sont disponibles pour réaliser la synthèse de

l'ADN, par vérification, édition et correction de l'ADN nouvellement synthétisé ; que le matériel génétique ne se réplique qu'une seule fois; que l'organisation spatiale du fuseau mitotique est opérationnelle; que la compaction et la condensation des chromosomes sont optimales ; et que la distribution du matériel cellulaire est équitable entre les cellules filles. En outre, immédiatement avant ou après le cycle cellulaire, différents facteurs interagissent pour déterminer si la cellule doit subir une autre division ou si elle s'engage dans un programme de différenciation ou de mort cellulaire. Par conséquent, le terme 'cycle cellulaire' est souvent utilisé au sens large pour faire référence, non seulement au processus cellulaire d'autorépliation de base, mais aussi à un certain nombre de processus connexes qui déterminent les obligations post-mitotiques. Celles-ci peuvent comprendre l'obligation d'arrêter de se diviser pour entrer dans un état de quiescence, de subir la sénescence ou la différenciation, ou de quitter l'état de quiescence pour entrer de nouveau en mitose.

## Architecture moléculaire du cycle cellulaire

Les commandes moléculaires du cycle cellulaire consistent en un processus biologique complexe dépendant de l'activation et de l'inactivation séquentielles d'effecteurs à des points spécifiques du cycle. La plus grande partie des connaissances actuelles de ces processus est le fruit d'expériences réalisées sur l'ovocyte de la grenouille *Xenopus laevis* ou sur la levure, soit *Saccharomyces cerevisiae* (levure bourgeonnante) soit *Schizosaccharomyces pombe* (levure de fission). L'ovocyte de *Xenopus* est, pour un grand nombre de critères, l'une des cellules les plus faciles à manipuler en laboratoire. Sa grande taille (plus d'un millimètre de diamètre) permet de surveiller visuellement la progression du cycle cellulaire dans des cellules uniques. Il est possible de réaliser des micro-injections afin

d'interférer avec des fonctions spécifiques de la machinerie biochimique du cycle cellulaire. L'ovocyte de *Xenopus* s'est avéré un outil inestimable dans l'étude de la biochimie du cycle cellulaire, permettant, entre autres découvertes, l'élucidation de la composition et de la régulation du facteur favorisant la maturation (MPF), enzyme complexe comprenant

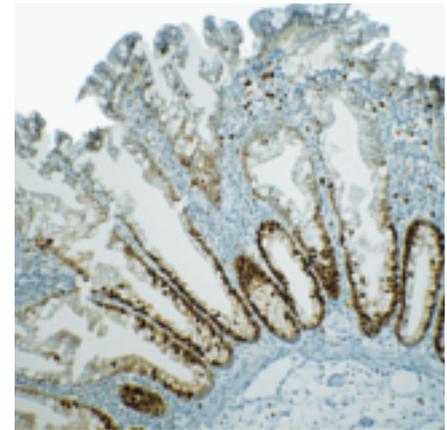


Fig. 3.25 Cellules proliférantes dans les parties basales des cryptes du côlon, visualisées par immunohistochimie (colorées en marron).

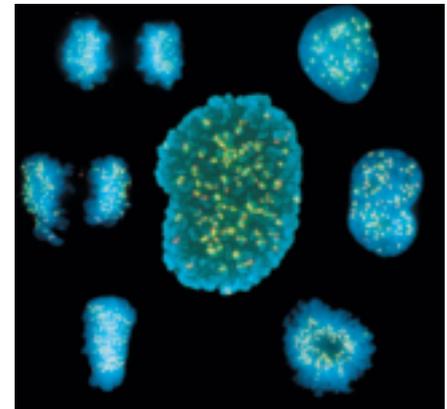


Fig. 3.26 Noyau d'une cellule d'ostéosarcome humain au cours de la mitose. La division cellulaire se déroule dans le sens des aiguilles d'une montre, en commençant en haut à droite, par l'interphase, la prophase (centre), la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. Au cours du cycle, les chromosomes sont répliqués, ségrégués, et distribués de manière équitable entre les deux cellules-filles.

une kinase (p34cdc2) et une sous-unité de régulation (cycline B), qui dirige la progression de la phase G2 à la phase M [1]. En revanche, la plasticité génétique exceptionnelle de la levure a permis l'identification de dizaines de mutants présentant des défauts dans la progression du cycle cellulaire: dans les cellules de mammifères, ces mutations auraient été mortelles et il aurait par conséquent été impossible de les caractériser. Ces mutants ont été dénommés 'cdc', pour mutants du cycle de la division cellulaire, et la plupart d'entre eux se sont vu accorder une plus grande reconnaissance par l'application de leur nom aux homologues mammifères correspondants aux gènes de la levure.

*Cdc2* fut l'un des premiers gènes à avoir été identifiés de cette manière. On a ainsi pu constater que *cdc2*, isolé chez *S. pombe*, était capable de corriger un défaut d'arrêt du cycle cellulaire en G2. Le produit de ce gène, une sérine thréonine kinase de poids moléculaire de 32 000 à 34 000 daltons, s'est ensuite avéré être l'homologue chez la levure de la kinase contenue dans le facteur MPF de *Xenopus*. Cette enzyme est devenue le paradigme d'une classe d'enzymes maintenant dénommées kinases cycline-

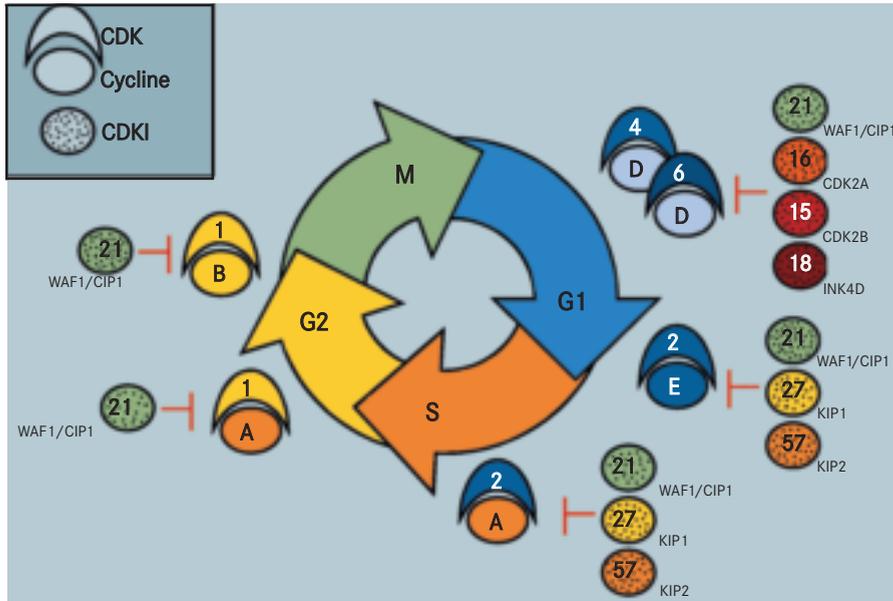
dépendantes, ou CDK. Sous leur forme active, les CDK forment des hétérodimères avec les cyclines, une classe de molécules synthétisées de manière chronodépendante au cours du cycle cellulaire. La progression du cycle cellulaire dépend de l'activation et de l'inactivation séquentielles des complexes cycline/CDK [2], un processus qui nécessite la synthèse des cyclines, la formation d'un complexe entre une cycline spécifique et une CDK, et une modification post-traductionnelle de la CDK pour convertir l'enzyme en une forme active (fig. 3.27).

La progression dans le cycle cellulaire telle qu'elle est induite par les cyclines est, à son tour, déterminée par des facteurs catégorisés comme ayant des rôles régulateurs (en amont) ou effecteurs (en aval). En amont des complexes cycline/CDK se trouvent des facteurs régulateurs appelés inhibiteurs des kinases cycline-dépendantes (CKI), qui régulent l'assemblage et l'activité des complexes cycline/CDK. En aval des complexes cycline/CDK se trouvent des molécules, facteurs de transcription principalement, qui contrôlent la synthèse des protéines responsables des modifications moléculaires et cellulaires survenant au cours de chaque phase.

Les CKI sont de petites protéines qui forment des complexes avec les CDK et les cyclines [3]. Leur rôle consiste principalement à inhiber les activités des complexes cycline/CDK et à réguler négativement la progression du cycle cellulaire. Ils constituent l'extrémité réceptrice d'un grand nombre de cascades moléculaires, signalant la promotion de la croissance ou la suppression de la croissance. Ainsi, les CKI peuvent être considérés comme l'interface entre le mécanisme du cycle cellulaire et le réseau de voies moléculaires qui signalent la prolifération, la mort ou la réponse au stress. Cependant, en raison de leurs propriétés complexantes, certains CKI jouent aussi un rôle positif dans la progression du cycle cellulaire en facilitant l'assemblage des complexes cycline/CDK. Par exemple, p21, produit du gène *CDKN1A* (aussi connu comme WAF1/CIP1), favorise l'assemblage des complexes cycline D/cdk2 en G1 dans un rapport stœchiométrique de 1/1, mais inhibe les activités de ces complexes lorsqu'ils sont exprimés à des niveaux supérieurs. Il existe trois principales familles de CKI, présentant chacune des propriétés structurales et fonctionnelles différentes: la famille WAF1/CIP1 (p21), la famille KIP (p27, p57) et la famille INK4 (p16, p15, p18) (fig. 3.27).

Gène (chromosome)	Produit	Type d'altération	Rôle dans le cycle cellulaire	Implication dans le cancer
<b>p53 (17p13)</b>	p53	Mutations, délétions	Contrôle de p21, 14-3-3σ, etc.	Altéré dans plus de 50% des cancers
<b>CDKN2A (9p22)</b>	p16 et p19 <sup>ARF</sup>	Mutations, délétions, hyperméthylation	Inhibition de CDK4 et 6	Altéré dans 30 à 60% des cancers
<b>RB1 (13q14)</b>	pRb	Délétions	Inhibition des E2Fs	Disparition dans le rétinoblastome, altéré dans 5 à 10% des autres cancers.
<b>CCND1</b>	Cycline D1	Amplification	Progression en G1	10 à 40% de nombreux carcinomes
<b>CDC25A, CDC25B</b>	cdc25	Surexpression	Progression en G1, G2	10 à 50% de nombreux carcinomes
<b>KIP1</b>	p27	Régulation négative	Progression en G1/S	Cancers du sein, du colon et de la prostate

**Tableau 3.3** Gènes de régulation du cycle cellulaire fréquemment altérés dans les cancers humains



**Fig. 3.27** La progression du cycle cellulaire dépend de l'activation et de l'inactivation séquentielles des complexes cycline/CDK. Ce processus requiert la synthèse des cyclines, la formation d'un complexe entre une cycline spécifique et une CDK, et la modification de la CDK pour convertir cette enzyme en une forme active. L'activité enzymatique peut être perturbée par un inhibiteur spécifique, une CDKI.

Les effecteurs en aval des complexes cycline/CDK comprennent des protéines divisées en trois principales catégories fonctionnelles: 1) celles impliquées dans le contrôle des enzymes responsables de la réplication, de la vérification et de la réparation de l'ADN, 2) celles impliquées dans le remodelage des chromosomes et de la chromatine et dans le contrôle de l'intégrité génomique et 3) celles impliquées dans le mécanisme de la division cellulaire (comprenant la formation du centrosome et du fuseau mitotique, et la résorption de la membrane nucléaire). Ces processus nécessitent la synthèse coordonnée de centaines de protéines cellulaires. Les facteurs de transcription de la famille E2F jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la transcription des gènes au cours de la progression du cycle cellulaire (fig. 3.28). En phase G1, les facteurs de la famille E2F sont liés à leurs cibles ADN mais sont maintenus dans un état inactif sur le plan transcriptionnel par la liaison des protéines de la famille protéique du rétinoblastome (pRb). Lors de la transition G1/S, la phosphorylation séquentielle de pRb par plusieurs

complexes cycline/CDK dissocie les pRb des complexes, permettant aux E2F d'interagir avec les co-activateurs de transcription et de lancer la synthèse de l'ARNm [4]. Par ce mécanisme, les E2F exercent une double fonction à la fois de répresseurs transcriptionnels en G1, lorsqu'ils sont liés à pRb, et d'activateurs transcriptionnels en G1/S et en phase S, après la dissociation de pRb du complexe. Des observations récentes laissent penser que la répression transcriptionnelle par les E2F est essentielle à la prévention de l'activation prématurée des effecteurs du cycle cellulaire, qui brouilleraient la séquence chronologique des événements moléculaires et empêcheraient la progression du cycle cellulaire.

#### Points de contrôle du cycle cellulaire

La notion de 'point de contrôle du cycle cellulaire' provient aussi d'études sur des ovocytes de *Xenopus* et sur des mutants de levure. Dans *S. cerevisiae*, l'engagement dans le cycle mitotique nécessite de passer un 'point de restriction' appelé transition de *départ*. Si les cellules n'arrivent pas à

passer cette transition, elles se retrouvent bloquées en phase G1 du cycle. Un autre point de contrôle a été clairement identifié après la phase S, à la transition entre les phases G2 et M. Les cellules incapables de passer ce point de contrôle restent bloquées dans un état tétraploïde, pré-mitotique. Physiologiquement, ce point de contrôle est actif dans les cellules germinales durant la seconde division de la méiose : les cellules qui ont subi la première division asymétrique du cycle méiotique s'arrêtent en G2 jusqu'à ce que la seconde division, qui est stimulée par la fécondation, soit terminée. Ce concept de 'point de contrôle du cycle cellulaire' a ensuite été étendu à toutes les cellules mammaliennes [5]. Il est maintenant courant de considérer le cycle cellulaire mammalien comme une succession de points de contrôle qui doivent être franchis pour que la division puisse s'achever. Il n'y a pas d'accord clair concernant le nombre de points de contrôle qui existent dans le cycle cellulaire mammalien, ni leur position exacte.

#### Contrôle de *cdk1* à la transition G2/M

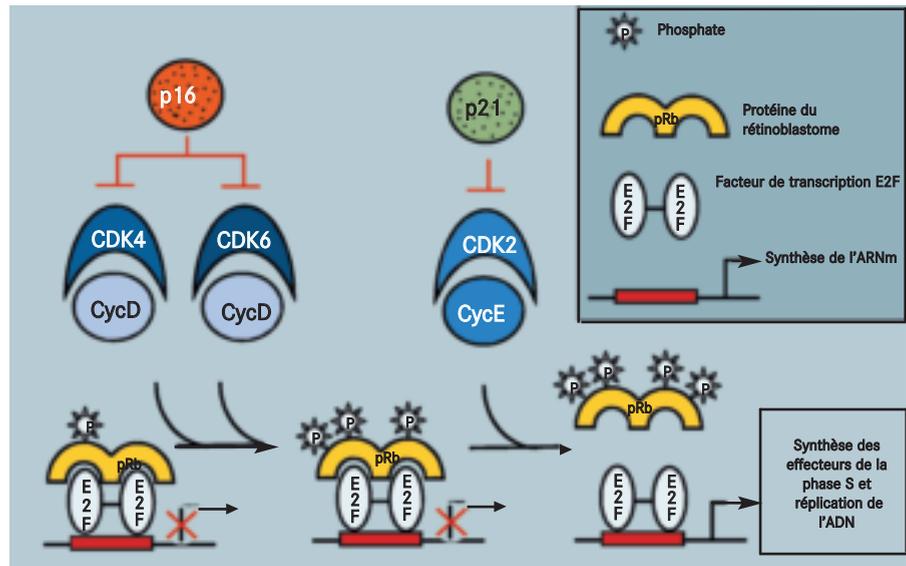
La régulation du complexe entre *cdk1* (aussi dénommé p34cdc2) et la cycline B illustre la manière dont différents facteurs coopèrent pour contrôler l'activation des complexes cycline/CDK en un point de contrôle du cycle cellulaire. Ce processus d'activation nécessite une coopération entre trois niveaux de régulation : association entre les deux partenaires du complexe, modifications post-traductionnelles de la kinase et de la cycline, échappement à la régulation négative exercée par les CDKI. Au début de la phase G2, *cdk1* se trouve sous sa forme inactive. Son activation requiert une première association avec la cycline B, suivie de la modification post-traductionnelle de la kinase elle-même. La modification comprend la phosphorylation d'un résidu thréonine conservé (Thr161) par un complexe kinase dénommé CAK (kinase activant les CDK), ainsi que la déphosphorylation de deux résidus se trouvant à l'intérieur du site actif de l'enzyme, une thréonine (Thr14) et une tyrosine (Tyr15). La suppression de ces groupes phosphates est réalisée par les phosphatases à double spécificité du groupe

cdc25, comprenant trois isoformes chez l'homme (A, B et C). L'activation de ces phosphatases est par conséquent cruciale pour l'activation des complexes cycline B/cdk1. La phosphatase est directement contrôlée par un certain nombre de régulateurs, comprenant plk1 (kinase 'polo-like'), une kinase activatrice, pp2A (protéine phosphatase 2A), une phosphatase inhibitrice et 14-3-3s, une molécule de transduction du signal qui se complexe avec cdc25, le séquestre dans le cytoplasme et l'empêche ainsi de déphosphoryler ses cibles nucléaires. Bien sûr, l'action des phosphatases cdc25 est contrebalancée par les kinases qui restaurent la phosphorylation de Thr14 et de Thr15, dénommées wee1 et mik1 [6].

Après le processus d'activation exposé ci-dessus, le complexe cycline B/cdk1 est potentiellement capable de catalyser le transfert des phosphates vers les protéines du substrat. Cependant, pour y parvenir, il doit échapper au contrôle exercé par les CDKI, tels que p21. La fonction de ce CDKI est elle-même contrôlée par plusieurs activateurs, y compris BRCA1, produit d'un gène de prédisposition au cancer du sein (*Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur*, p. 97). La protéine p21 est retirée de ce complexe par un processus de phosphorylation encore partiellement incompris, qui dirige aussi la dégradation rapide de la protéine par le protéasome. Ceci laisse le complexe cycline B/cdk1 prêt à fonctionner, après une étape finale d'autophosphorylation, au cours de laquelle cdk1 phosphoryle la cycline B. Le complexe est maintenant totalement actif et prêt à phosphoryler différents substrats, tels que les lamines nucléaires, pendant l'entrée en mitose.

### Régulation du cycle cellulaire et contrôle de la stabilité génétique

Au cours du cycle cellulaire, un certain nombre de problèmes potentiels peuvent aboutir à des lésions du génome. Ces problèmes peuvent survenir à trois étapes différentes : 1) durant la réplication de l'ADN, notamment si la cellule se trouve dans des conditions de stress qui favorisent la formation de lésions de l'ADN (irradiation, exposition à des cancérogènes, etc.), 2) après la terminaison de la réplication de l'ADN,



**Fig. 3.28** Régulation de la progression de G1 en S par phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb), en l'absence de laquelle la réplication de l'ADN ne peut avoir lieu.

lorsque la cellule 'désactive' effectivement son mécanisme de synthèse de l'ADN et 3) durant la phase M, lorsque la cellule doit accomplir la tâche délicate consistant à séparer équitablement les chromatides. Un couplage étroit entre ces processus et la régulation du cycle cellulaire est donc crucial pour permettre à la cellule de marquer en temps d'arrêt pendant le cycle cellulaire, de manière à laisser le temps nécessaire à la réussite de la réalisation de toutes les opérations d'entretien de l'ADN et des chromosomes. Si ceci échouait, des instabilités génétiques et génomiques, qui sont les empreintes du cancer, pourraient survenir. L'instabilité génétique se caractérise par une augmentation de la vitesse de mutation, de délétion ou de recombinaison des gènes (principalement en raison de défauts dans la réparation de l'ADN). L'instabilité génétique se traduit par des translocations chromosomiques, la perte ou la duplication de grands fragments de chromosomes et un nombre de chromosomes aberrant (aneuploïdie). Des dizaines de molécules ont été identifiées comme étant les composants des cascades de signalisation qui couplent la détection des lésions de l'ADN et la régulation du cycle cellulaire. L'une d'entre elles est le produit du gène suppresseur de tumeur *p53* (*Oncogènes et gènes sup-*

*presseurs de tumeur*, p. 97). *p53* est spécifiquement activé après différentes formes de lésions directes de l'ADN (comme des cassures double-brin ou simple-brin de l'ADN) et régule la transcription de plusieurs inhibiteurs de la progression du cycle cellulaire, particulièrement aux transitions G1/S et G2/M [7]. D'autres molécules importantes dans ce processus de couplage comprennent les kinases point de contrôle chk1 et chk2. Chk1 est activée après le blocage de la réplication en phase S. Chk1 active à son tour wee1 et mik1, deux kinases qui contrebalancent l'activité de cdc25 et maintiennent cdk1 sous une forme active. Ainsi, par l'activation de chk1, la cellule déclenche un mécanisme d'urgence qui veille à ce que les cellules dont l'ADN n'est pas totalement répliqué, ne puissent pas entrer en mitose.

### Cycle cellulaire et cancer

Parmi les gènes sujets à des altérations génétiques qui donnent lieu à un cancer, ceux impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire sont importants [8]. Cependant, la prolifération des cellules cancéreuses requiert un maintien du fonctionnement des processus du cycle cellulaire. Les altérations du cycle cellulaire observées dans le cancer se limitent principalement à deux grands ensembles de régulateurs: ceux

## TELOMERES ET TELOMERASE

On appelle télomères les extrémités des chromosomes eucaryotes. Ils contiennent plusieurs copies d'une séquence d'ADN répétitive qui, chez les vertébrés, est l'hexanucléotide TTAGGG. Les télomères des cellules somatiques humaines normales se raccourcissent de 50 à 150 paires de base chaque fois que la division cellulaire a lieu. Ceci semble agir comme un mécanisme de comptage de la division cellulaire : lorsque les télomères d'une cellule se raccourcissent en dessous d'une longueur critique, la cellule sort de manière permanente du cycle cellulaire. Les cellules normales ont donc une capacité de prolifération limitée, et ceci agit comme une barrière essentielle contre la cancérogenèse. Les cellules qui ont accumulé des modifications cancérogènes sont incapables de former des cancers qui se manifestent cliniquement, à moins que cette barrière à la prolifération ne soit rompue. La barrière est rompue dans plus de 85 % de tous les cancers par l'expression d'une enzyme, la télomérase, qui synthétise un nouvel ADN télomérique pour remplacer les séquences perdues au cours de la division cellulaire (Shay JW, Bacchetti, S, *Eur J Cancer*, 33A : 787-791, 1997).

Les dosages de la télomérase ne font pas encore partie de la pratique clinique de routine, mais leur utilisation potentielle dans le diagnostic et le pronostic du cancer représente un intérêt considérable. Les dosages de télomérase dans les sédiments urinaires, par exemple, peuvent être utiles pour le diagnostic du cancer des voies urinaires (Kinoshita H et coll., *J Natl Cancer Inst.*, 89:724-730, 1997), et les taux d'activité télomérase peuvent être prédictifs de l'issue du neuroblastome (Hiyama E et coll., *Nature Medicine*, 1:249-255, 1995).

La sous-unité catalytique de la télomérase humaine, hTERT, a été clonée en 1997 (Lingner J, Cech TR, *Curr Opin Genet Dev*, 8:226-232, 1998). Il a ensuite été démontré que les manipulations génétiques de hTERT qui résultaient en l'inhibition de l'activité télomérase dans les cellules tumorales, limitaient leur prolifération et entraînaient souvent la mort cellulaire. Ceci laisse apparaître la possibilité d'une forme de thérapie très utile pour la plupart des cancers grâce aux inhibiteurs de la télomérase. Cependant, dans les tumeurs avec de longs télomères, plusieurs divisions cellulaires peuvent être nécessaires avant que les inhibiteurs de la télomérase n'exercent un effet anti-tumoral. Lorsque de tels médicaments seront mis au point, il sera donc nécessaire de les intégrer prudemment à d'autres traitements anti-cancer.

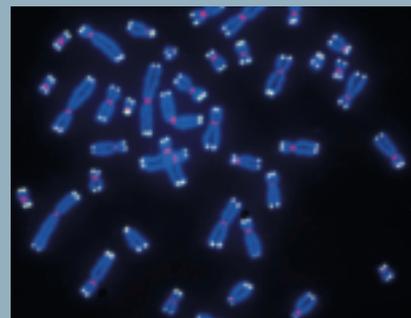


Fig. 3.29 Les télomères contiennent des séquences d'ADN répétitives qui coiffent les extrémités des chromosomes. L'analyse de fluorescence quantitative par hybridation *in situ* de chromosomes métaphasiques humains est représentée, en utilisant des sondes oligonucléotidiques pour les séquences d'ADN des télomères (blanc) et des centromères (rouge), et le colorant DAPI pour l'ADN (bleu).

Permission du laboratoire des Docteurs J.W. Shay et W.E. Bright

Un défi potentiel auquel est confrontée la recherche sur la télomérase est la découverte dans certains cancers d'une conservation des télomères par un mécanisme qui n'implique pas la télomérase, et qui est décrit comme un allongement alternatif des télomères, ALT (Bryan TM et coll., *Nature Medicine*, 3:1271-1274, 1997; Reddel, RR, *J Clin Invest*, 108:665-667, 2001).

impliqués dans le contrôle négatif de la progression du cycle cellulaire (dont l'inactivation conduit à une prolifération cellulaire plus rapide et non contrôlée), et ceux impliqués dans le couplage du maintien de l'intégrité génomique au cycle cellulaire [dont l'inactivation se traduit par la présence dans les cellules d'altérations géniques qui s'accumulent progressivement au cours de la cancérogenèse (Tableau 3.3)] [9]. La plupart des gènes correspondant à ces deux catégories appartiennent au groupe des gènes suppresseurs de tumeur, et beaucoup d'entre eux participent aussi directement aux processus de réparation de l'ADN.

Il a été établi que le gène qui code pour p16 (*CDKN2A/INK4A*) était un gène

suppresseur de tumeur [10], et l'on observe fréquemment des mutations et des délétions sur ce site dans les tumeurs primitives humaines, notamment dans le mélanome (bien que la contribution à l'activité suppressive d'une autre protéine codée par le même locus sur le chromosome 9p, p14<sup>ARF</sup>, ne soit pas encore déterminée). Contrairement au gène *CDKN2A/INK4A*, le gène *CDKN1A* (codant pour p21) subit rarement des perturbations lors d'un cancer. Etant donné que p21 joue plusieurs rôles dans la régulation négative de presque toutes les phases du cycle cellulaire, on pourrait penser que la perte de cette fonction provoquerait une division cellulaire non contrôlée. Ceci ne semble pourtant pas être le cas, puisque aucune augmentation de la

fréquence des cancers n'est observée chez des souris dépourvues du gène *CDKN1A*. Cette observation illustre l'une des plus importantes caractéristiques des mécanismes de la régulation du cycle cellulaire: il existe une part de double-emploi et de recouvrement important dans la fonction de tout effecteur particulier. Par conséquent, pour qu'un dérèglement du cycle cellulaire provoque un cancer, il est nécessaire d'avoir une combinaison de plusieurs altérations des gènes codant pour des protéines qui, soit seules soit ensemble, sont critiques pour le contrôle de la division cellulaire.

Outre l'inactivation des régulateurs négatifs, quelques gènes du cycle cellulaire peuvent être activés comme le sont les

oncogènes, dans la mesure où leur altération se traduit par une augmentation de l'activité entraînant une accélération de la prolifération cellulaire. Le meilleur exemple d'un tel oncogène du cycle cellulaire est *CCND1*, le gène codant pour la cycline D1, une cycline spécifique de la phase G1 [11]. Ce gène se situe sur le chromosome 11p13, dans une grande région qui est amplifiée

dans près de 20 % des différents carcinomes (par exemple des cancers du sein, de la tête et du cou, de l'œsophage et du poumon). Il existe aussi des indications limitées de l'activation transcriptionnelle de la cycline A (une cycline de la phase S) et des activations par mutations de CDK4 (un des partenaires de la cycline D1) dans certains cancers. Effectivement, la grande complex-

ité des effecteurs du cycle cellulaire fournit toute une gamme de possibilités extrêmement variées d'altérations associées au cancer. A cet égard, le cancer peut être considéré d'un point de vue fondamental comme une maladie du cycle cellulaire.

## REFERENCES

1. Hunt T (1989) Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Curr Opin Cell Biol*, 1: 268-274.
2. Pines J (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J*, 308 (Pt 3): 697-711.
3. Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, 13: 1501-1512.
4. Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81: 323-330.
5. Hartwell LH, Weinert TA (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 246: 629-634.
6. Zeng Y, Forbes KC, Wu Z, Moreno S, Piwnica-Worms H, Enoch T (1998) Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. *Nature*, 395: 507-510.
7. Hainaut P, Hollstein M (2000) p53 and human cancer:

- the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res*, 77: 81-137.
8. Hartwell LH, Kastan MB (1994) Cell cycle control and cancer. *Science*, 266: 1821-1828.
  9. Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Cancer-susceptibility genes. Gate-keepers and caretakers. *Nature*, 386: 761, 763.
  10. Strohmaier H, Spruck CH, Kaiser P, Won KA, Sangfelt O, Reed SI (2001) Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature*, 413: 316-322.
  11. Schuurin E (1995) The involvement of the chromosome 11q13 region in human malignancies: cyclin D1 and EMS1 are two new candidate oncogenes—a review. *Gene*, 159: 83-96.

## SITES INTERNET

- Animation of the phases of the cell cycle and of mitosis: <http://www.cellsalive.com/cell-cycle.htm>
- Nature Reviews*, "Focus on cell division": <http://www.nature.com/ncb/celldivision/>
- Manuel sur le cycle cellulaire et la réplication de l'ADN dans *S. pombe*: <http://www-rcf.usc.edu/~forsburg/index.html>

# COMMUNICATION INTERCELLULAIRE

## RESUME

- > Les cellules communiquent grâce à des molécules sécrétées qui agissent sur les cellules voisines portant des récepteurs adaptés, ainsi que par contact cellulaire direct, grâce notamment aux jonctions gap.
- > La communication médiée par contact cellulaire via les jonctions gap est contrôlée par les gènes de la connexine, et elle est souvent perturbée dans le cancer. Ceci peut contribuer à une croissance autonome non contrôlée.
- > Des interventions visant à restaurer la communication par les jonctions gap pourraient servir de base thérapeutique.

Dans les organismes complexes, les cellules voisines se comportent et fonctionnent en harmonie via la communication intercellulaire pour le bénéfice de l'organisme entier. Au cours de l'évolution, différents types de communication intercellulaire se sont développés, qui, chez les mammifères, prennent deux formes : 1) la communication humorale et 2) la communication médiée par le contact cellulaire (fig. 3.30). La communication humorale est le plus souvent médiée par des molécules, telles que les facteurs de croissance et les hormones excrétés par certaines cellules et se fixant sur les récepteurs d'autres cellules. La communication intercellulaire basée sur le contact intercellulaire direct est médiée par différentes jonctions, englobant les jonctions par adhérence, les desmosomes et les jonctions gap.

Au cours de la cancérogenèse multi-étapes, les gènes impliqués de manière fondamentale dans la croissance cellulaire sont altérés [1]. On sait que la plupart de ces gènes sont directement ou indirectement impliqués dans le contrôle de la réplication cellulaire (*Le cycle cellulaire*, p. 105) ou dans la mort des cellules

individuelles [2] (*Apoptose*, p. 115). Les gènes impliqués dans la communication intercellulaire contrôlent la croissance cellulaire à un autre niveau. Ces gènes fonctionnent de manière à maintenir la croissance cellulaire en harmonie avec celle des tissus environnants. Etant donné que la plupart des cellules cancéreuses ne prolifèrent pas en harmonie avec les cellules voisines normales, il n'est pas surprenant que la fonction des gènes impliqués dans les mécanismes de communication intercellulaire soit perturbée dans un grand nombre de tumeurs. Ainsi, plusieurs oncogènes (*Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs*, p. 97) codent pour des produits impliqués dans la communication intercellulaire humorale: c-erb, c-erbB2 et c-SIS [3]. Il est aussi apparu clairement que la communication intercellulaire médiée par le contact cellulaire joue un rôle crucial dans le contrôle de la croissance cellulaire [4] et les gènes impliqués sont souvent classés comme des gènes suppresseurs de tumeur [5]. Les molécules d'adhérence cellulaire sont aussi impliquées dans la reconnaissance intercellulaire. Plusieurs faisceaux de preuves suggèrent que des fonctions

aberrantes de l'adhérence cellulaire pourraient être impliquées dans l'invasion tumorale et les métastases [6].

## Communication intercellulaire par les jonctions gap et cancer

La communication intercellulaire par les jonctions gap est le seul moyen par lequel les cellules échangent des signaux directement de l'intérieur d'une cellule à l'intérieur des cellules voisines [7]. Sachant que le degré de différence entre les cellules tumorales et les cellules qui présentent une homéostasie tissulaire est un déterminant fondamental de la nature de la malignité, on a depuis longtemps posé le postulat que la communication intercellulaire par les jonctions gap devait être dérégulée dans le cancer. La première confirmation fut l'observation d'une restriction de la communication intercellulaire au niveau des jonctions gap dans un certain type de tumeur [8]. Ce phénomène a maintenant été observé dans presque tous les types de tumeurs [4]. Les lignées cellulaires établies à partir des tumeurs, ainsi que les cellules transformées *in vitro*, présentent généralement une détérioration de leur

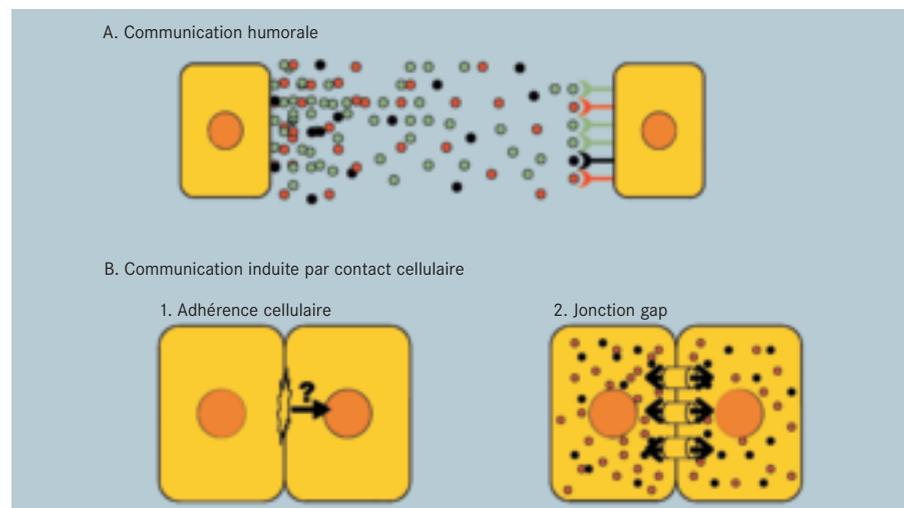
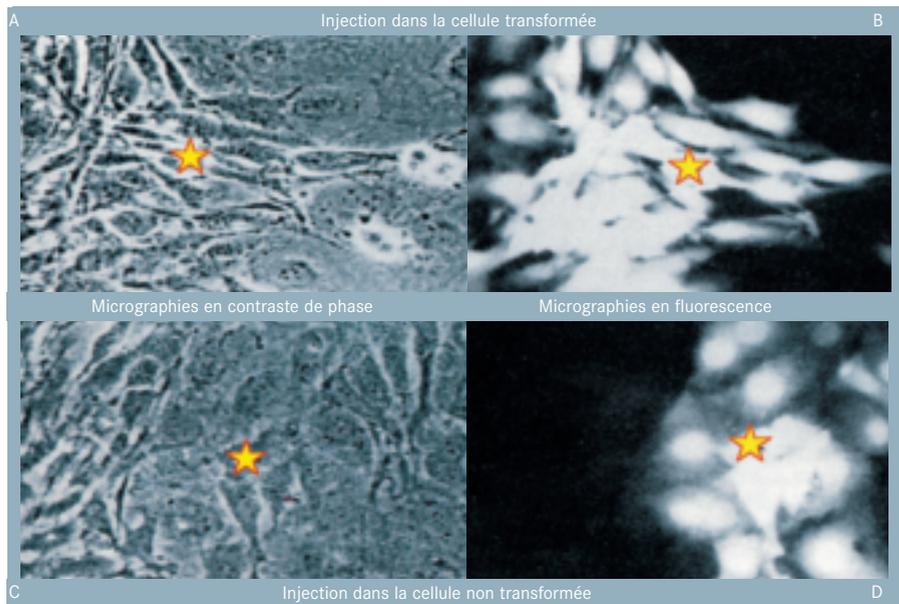
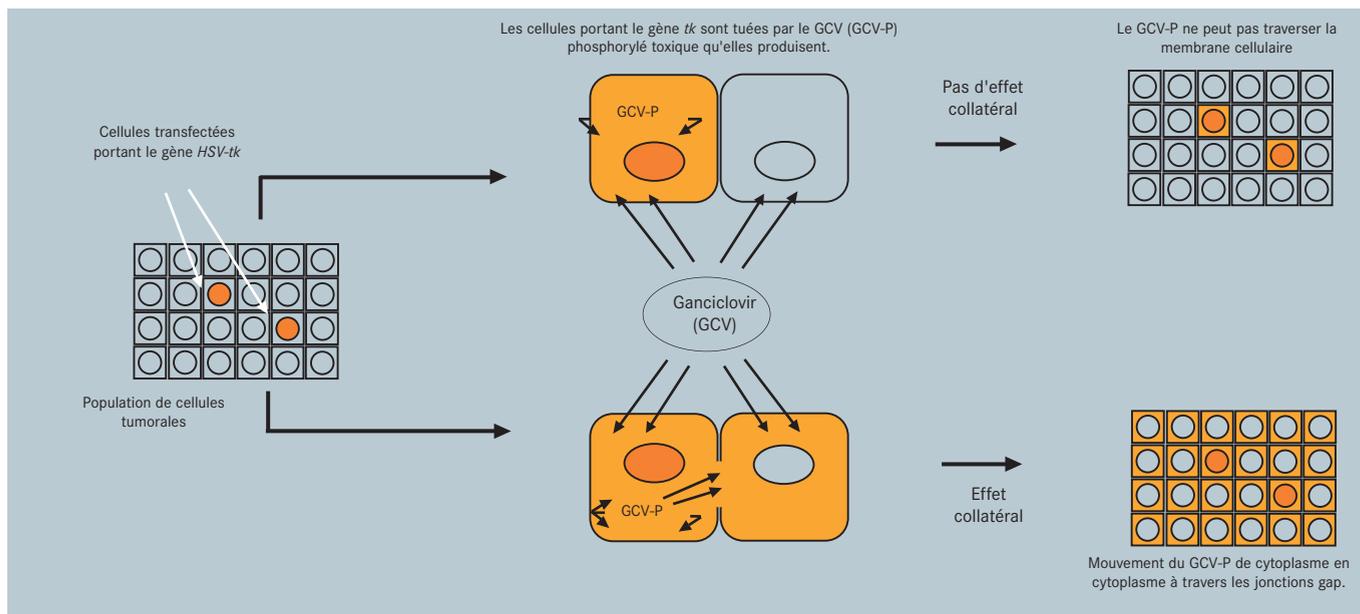


Fig. 3.30 Les relations entre cellules sont assurées par différents types de communication intercellulaire, qui peuvent nécessiter (B) ou non (A) le contact cellulaire.



**Fig. 3.31** Communication sélective par les jonctions gap : les cellules transformées par un cancérogène chimique (fusiformes et entrecroisées) communiquent entre elles, mais pas avec leurs homologues non transformés. Lorsqu'un colorant fluorescent pouvant se diffuser via les jonctions gap est micro-injecté dans une seule cellule (marquée par une étoile) d'un foyer transformé, on observe une communication entre les cellules transformées mais pas avec les cellules voisines non transformées (A, B). L'injection d'un colorant dans une cellule non transformée qui se situe près d'un foyer transformé permet d'observer une communication entre les cellules non transformées, mais pas avec les cellules transformées (C, D).

fonction de communication intercellulaire au niveau des jonctions gap. La communication intercellulaire via les jonctions gap entre les cellules transformées et leurs homologues voisines normales est sélectivement déficiente dans les cellules murines embryonnaires BALB/c3T3 (fig. 3.31). Une absence de communication intercellulaire hétérologue par les jonctions gap entre des cellules transformées et normales a été observée en utilisant des lignées cellulaires épithéliales de foie de rat et des tumeurs de foie de rat *in vivo*. Il semble qu'une réduction de ce type de communication intercellulaire soit commune à plusieurs cellules tumorales. D'autres études utilisant des modèles multi-étapes de cancérogenèse de foie de rat et de peau de souris ont révélé qu'il y avait, en général, une diminution progressive de la communication intercellulaire par les jonctions gap au cours de la cancérogenèse et de la progression tumorale. Un autre faisceau de preuves, qui implique un rôle causal du blocage de la communication intracellulaire dans la cancérogenèse, est l'observation d'une



**Fig. 3.32** Rôle de l'interaction intercellulaire dans la thérapie génique. Dans une population de cellules tumorales, seules quelques cellules peuvent être atteintes par les vecteurs portant le gène *HSV-tk*. L'expression du gène *HSV-tk* (orange) rend ces cellules sensibles au ganciclovir: elles produisent du ganciclovir phosphorylé qui est toxique. Etant donné que le ganciclovir phosphorylé ne peut pas traverser la membrane cellulaire, théoriquement seules les cellules exprimant le gène *tk* seront éliminées par le traitement au ganciclovir. La diffusion transmembranaire du ganciclovir phosphorylé de cytoplasme en cytoplasme peut induire un effet collatéral suffisant pour éradiquer une population de cellules tumorales, même si seulement un petit nombre de cellules expriment le gène *tk* [13].

modulation de la communication cellulaire au niveau des jonctions gap par les agents ou les gènes impliqués dans la cancérogenèse. L'agent favorisant la tumeur cutanée chez la souris, 12-*O*-tétradécanoylphorbol 13-acétate (TPA) inhibe la communication intercellulaire par les jonctions gap. Beaucoup d'autres agents favorisant les tumeurs inhibent la communication intercellulaire par les jonctions gap [9]. Outre ces produits chimiques, il a été démontré que d'autres stimuli promoteurs de tumeurs, comme une hépatectomie partielle et les blessures cutanées, inhibaient la communication intercellulaire au niveau des jonctions gap. L'activation de différents oncogènes, y compris ceux codant pour src, l'antigène SV-40 T, c-erbB2/neu, raf, fps et ras, entraîne aussi l'inhibition de la communication intercellulaire par les jonctions gap. A l'inverse, certains agents chimiopréventifs favorisent cette communication intercellulaire [10].

### Gènes de la connexine et suppression tumorale

Les travaux de Stoker et coll. [11] furent les premiers à montrer que les cellules normales pouvaient bloquer la croissance des cellules malignes avec lesquelles elles étaient en contact. Des indications plus récentes d'un rôle aussi direct de la communication intercellulaire par les jonctions

gap dans la suppression des tumeurs ont émergé d'expériences dans lesquelles les gènes de la connexine étaient transfectés dans des lignées cellulaires malignes dont la communication intercellulaire par les jonctions gap était défectueuse. Dans beaucoup de cas, l'expression des gènes de la connexine réduisait ou supprimait la tumorigénicité des cellules réceptrices [10]. Bien que les gènes suppresseurs de tumeur, et plus particulièrement *p53*, soient mutés dans une grande partie des tumeurs, peu de mutations des gènes de la connexine ont été découvertes dans des tumeurs chez les rongeurs, et aucune n'a été rapportée dans le cancer chez l'homme. Alors que ceci laisse supposer que les mutations des gènes de la connexine sont rares dans la cancérogenèse, seules quelques études (toutes du même laboratoire) portant sur un nombre limité de gènes de la connexine (*Cx32*, *Cx37*[ $\alpha 4$ ] et *Cx43*) ont été réalisées : plusieurs polymorphismes entre les gènes de la connexine chez l'homme et chez les rats ont été décrits; il n'y avait cependant pas de corrélation apparente entre ces polymorphismes et les sites de cancer étudiés [10].

### Amélioration de la thérapie du cancer grâce à la communication intercellulaire

Il a été démontré, il y a environ 10 ans, que la communication intercellulaire par

les jonctions gap pouvait être exploitée pour délivrer des agents thérapeutiques au milieu des cellules cancéreuses et ainsi améliorer la thérapie du cancer [12]. Un principe de la thérapie génique est la médiation de la cytotoxicité sélective par l'introduction, dans les cellules malignes, d'un gène qui active un médicament autrement inoffensif. Dans la pratique, seule une fraction du nombre total de cellules tumorales que l'on cherche à éliminer sont transfectées avec succès avec le gène en question. Cependant, au moins dans le cas de la thérapie d'une tumeur cérébrale à base du gène de la thymidine kinase du virus herpes simplex (*HSV-tk*), non seulement les cellules sont transfectées avec le gène affecté par le traitement au ganciclovir, mais les cellules voisines sont elles aussi éliminées en présence de ganciclovir. Plusieurs études ont offert des preuves manifestes selon lesquelles ce phénomène, dit 'effet collatéral' (fig. 3.32) est dû à la communication intercellulaire par les jonctions gap médiée par la connexine. En d'autres termes, le ganciclovir phosphorylé par HSV-tk peut diffuser via les jonctions gap, si bien que même les cellules ne portant pas le gène *HSV-tk* peuvent être éliminées. Le rôle des gènes de la connexine dans cet effet a été confirmé [13].

Gène	Site de cancer/cancer	Modifications observées
<b>Intégrine</b>	Peau, foie, poumon, ostéosarcome	Expression réduite
<b>E-cadhérine</b>	Estomac, côlon, sein, prostate	Mutations: expression réduite
<b><math>\alpha</math>-caténine</b>	Estomac, côlon, sein, prostate, oesophage, reins, vessie, etc	Expression réduite
<b><math>\beta</math>-caténine</b>	Mélanome, côlon	Mutations: expression réduite
<b><math>\gamma</math>-caténine</b>	Sein, côlon	Perte de l'expression, translocation dans les noyaux
<b>Connexines</b>	Foie, peau, etc	Expression réduite, localisation aberrante

Tableau 3.4 Exemples de gènes responsables des interactions intercellulaires impliqués dans la cancérogenèse [10].

## Transduction du signal à partir du réseau intercellulaire

La principale fonction physiologique de la communication intercellulaire via les jonctions gap consiste probablement à maintenir l'homéostasie en conservant entre les cellules liées par les jonctions gap, l'équilibre du niveau des signaux médiés par les agents de faible poids moléculaire. Ceci implique que la communication intercellulaire puisse contrôler indirectement la croissance cellulaire. Comme cela a déjà été remarqué plus haut, une telle activité est différente de celle médiée par les gènes directement impliqués dans la croissance et la mort cellulaires. Une voie particulièrement importante liant l'interaction cellulaire à la transduction du signal implique la  $\beta$ -caténine, molécule

d'adhérence cellulaire. Si le taux de  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme et dans le noyau augmente, il active les facteurs de transcription de la famille TCF (facteur de transcription)/LEF et augmente l'activité des gènes comprenant *C-MYC*, la cycline D1 et la connexine 43. Normalement, les taux de  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme et dans le noyau sont maintenus très bas parce qu'un complexe de protéines comportant le produit du gène *APC* (adenoma-tous polyposis coli, *Le cancer colorectal*, p. 200), l'axine et la glycogène synthétase kinase 3 $\beta$ , se lie à la  $\beta$ -caténine libre et place un groupe phosphate sur celle-ci, qui la signale comme devant être détruite [14].

Dans les cellules normales, le taux de  $\beta$ -caténine libre est régulé par le signal

Wnt ('homologue de wingless') depuis l'extérieur de la cellule, qui en fait augmenter le taux en réduisant temporairement l'activité kinase. Cependant, les mutations dans le gène *APC* ou dans la région du gène de la  $\beta$ -caténine (*CTNNB1*) qui code pour la partie de la molécule qui accepte le phosphate, permettent l'augmentation des taux de  $\beta$ -caténine. Les gènes contrôlés par TCF/LEF sont alors activés de manière permanente. Le fait que les mutations des gènes *CTNNB1*, *AXIN1*, *AXIN2* et *APC* aient lieu dans un grand nombre de cancers, y compris dans les cancers du côlon, du sein et de l'endomètre, illustre l'importance de cette voie et accentue la relation entre le contact intercellulaire et la transduction du signal.

## REFERENCES

1. Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61: 759-767.
2. Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*, 386: 761, 763.
3. Heldin CH (1996) Protein tyrosine kinase receptors. *Cancer Surv*, 27: 7-24.
4. Krutovskikh V, Yamasaki H (1997) The role of gap junctional intercellular communication (GJIC) disorders in experimental and human carcinogenesis. *Histol Histopathol*, 12: 761-768.
5. Hirohashi S (1998) Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol*, 153: 333-339.
6. Birchmeier EJ, Behrens J (1994) Cadherin expression in carcinoma: Role in the formation of cell junctions and prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta*, 1198: 11-26.
7. Bruzzone R, White TW, Paul DL (1996) Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem*, 238: 1-27.
8. Loewenstein WR, Kanno Y (1966) Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. *Nature*, 209: 1248-1249.
9. Trosko JE, Chang CC, Madhukar BV, Klaunig JE (1990) Chemical, oncogene and growth factor inhibition gap junctional intercellular communication: an integrative hypothesis of carcinogenesis. *Pathobiology*, 58: 265-278.
10. Yamasaki H, Omori Y, Zaidan-Dagli ML, Mironov N, Mesnil M, Krutovskikh V (1999) Genetic and epigenetic changes of intercellular communication genes during multistage carcinogenesis. *Cancer Detect Prev*, 23: 273-279.
11. Stoker MG (1967) Transfer of growth inhibition between normal and virus-transformed cells: autoradiographic studies using marked cells. *J Cell Sci*, 2: 293-304.
12. Yamasaki H, Katoh F (1988) Novel method for selective killing of transformed rodent cells through intercellular communication, with possible therapeutic applications. *Cancer Res*, 48: 3203-3207.
13. Mesnil M, Yamasaki H (2000) Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication. *Cancer Res*, 60: 3989-3999.
14. Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D, Birchmeier W (1998) Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science*, 280: 596-599.

# APOPTOSE

## RESUME

- > Le terme apoptose fait référence à un type de mort cellulaire qui a lieu à la fois physiologiquement et en réponse à des stimuli externes, dont font partie les rayons X et les médicaments anti-cancéreux.
- > La mort cellulaire par apoptose se caractérise par des modifications morphologiques distinctes, différentes de celles survenant au cours de la nécrose.
- > L'apoptose est régulée par plusieurs voies de signalisation différentes. La dérégulation de l'apoptose peut se traduire par une croissance cellulaire désordonnée et ainsi contribuer à la cancérogenèse.
- > L'induction sélective de l'apoptose dans les cellules tumorales compte parmi les stratégies actuelles de développement de nouvelles thérapies contre le cancer.

L'apoptose est un mode de mort cellulaire qui facilite les processus fondamentaux tels que le développement (par exemple, en supprimant les tissus non souhaités au cours de l'embryogenèse) et la réponse immunitaire (par exemple, en éliminant des cellules T auto-réactives). Ce type de mort cellulaire se différencie morphologiquement (fig. 3.33) et fonctionnellement de la nécrose. Précisément, l'apoptose implique des cellules uniques plutôt que des zones de tissus et ne provoque pas d'inflammation. L'homéostasie tissulaire dépend de l'élimination contrôlée des cellules non désirées, souvent dans le contexte d'un continuum dans lequel la spécialisation et la maturation sont finalement suivies de la mort cellulaire au cours de ce qui peut être considéré comme la phase finale de la différenciation. Outre l'élimination dans un contexte physiologique, les cellules qui ont été létalement exposées à des

médicaments cytotoxiques ou à des radiations peuvent subir l'apoptose.

Le processus d'apoptose peut être décrit en faisant référence à des phases distinctes, nommées phase 'régulatrice', 'effectrice' et 'de digestion', respectivement [1]. La phase régulatrice comprend toutes les voies de signalisation qui engagent une cellule dans le processus de mort cellulaire. Certaines de ces voies ne régulent que la mort cellulaire, mais un grand nombre d'entre elles ont des rôles se chevauchant dans le contrôle de la prolifération cellulaire, de la différenciation, de la réponse au stress et de l'homéostasie. Les caspases 'initiatrices' (comprenant la caspase-8, la caspase-9 et la caspase-10) sont fondamentales dans la signalisation de l'apoptose. Leur rôle consiste à activer les caspases 'effectrices' (comprenant la caspase-3 et la

caspase-7) qui sont plus abondantes et qui, à leur tour, provoquent les modifications morphologiques indiquant l'apoptose. Finalement, le processus de digestion implique la reconnaissance des 'restes' cellulaires et leur élimination par l'activité de digestion des cellules voisines.

La définition de la famille de gènes *ced* chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, dont les membres sont, à des degrés divers, des homologues des gènes humains *BCL2* (qui supprime l'apoptose), d'*APAF-1* (qui provoque l'activation des caspases) et des caspases elles-mêmes (protéases qui induisent la mort cellulaire), a profondément conditionné l'identification des gènes qui induisent l'apoptose dans les cellules humaines. Le caractère central de l'apoptose dans la biologie du cancer est indiqué par une tumorigenèse excessive

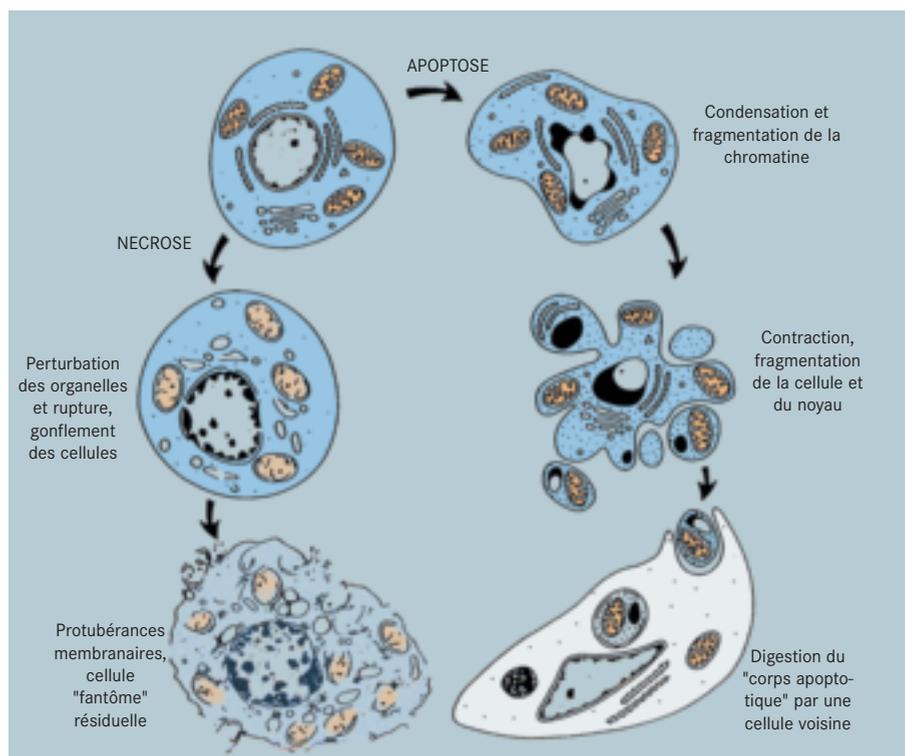


Fig. 3.33 L'apoptose et la nécrose se différencient par des modifications morphologiques caractéristiques.

chez les souris transgéniques pour *BCL-2* et les souris déficientes pour *p53*. La prise en considération de l'apoptose fournit une base pour la mise au point de thérapies nouvelles et conventionnelles contre le cancer.

### Rôle de la mort cellulaire dans la croissance tumorale

L'apoptose, ou l'absence d'apoptose, peut être critique pour la tumorigenèse [2]. *BCL2*, un gène qui induit une résistance aux stimuli apoptotiques, a été découvert à la translocation chromosomique t(14:18) dans le lymphome non hodgkinien à cellules B de bas grade. Il est ainsi apparu que l'expansion des cellules néoplasiques pouvait être attribuée à une diminution de la mort cellulaire plutôt qu'à une prolifération rapide. Les défauts de l'apoptose permettent aux cellules néoplasiques de survivre au-delà de la sénescence, fournissant ainsi une protection contre l'hypoxie et le stress oxydatif lors de l'expansion de la masse tumorale. La croissance des tumeurs, notamment en réponse à des cancérogènes chimiques, a été corrélée à des modifications des vitesses de l'apoptose dans les tissus affectés, alors que des populations cellulaires présentant une altération de l'activité proliférative émergent. De manière paradoxale, la croissance de certains cancers, et notamment le cancer du sein, a été positivement corrélée à une augmentation de l'apoptose [3].

### Interrelation entre les voies mitogènes et apoptotiques

Il est possible de démontrer une relation dynamique entre la régulation de la croissance/la mitose et de l'apoptose en utilisant une variété de voies de signalisation pertinentes. On a découvert que différents promoteurs de la prolifération cellulaire possédaient une activité pro-apoptotique [4]. Ainsi, l'expression ectopique de l'oncogène *C-MYC* (normalement associé à l'activité proliférative) induit l'apoptose dans des cellules en culture privées de sérum (ce qui autrement empêche la prolifération). Les oncogènes qui stimulent la mitogenèse peuvent aussi activer l'apoptose. Ceux-ci

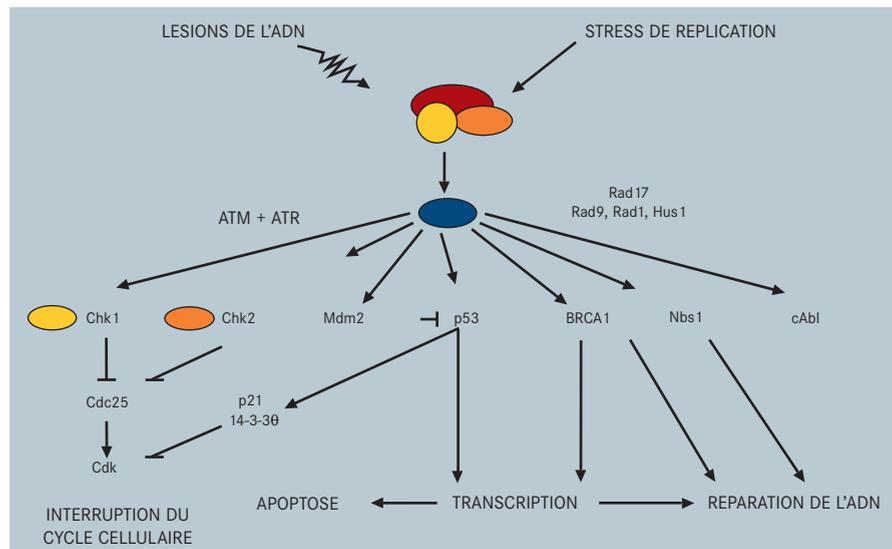


Fig. 3.34 La réponse aux lésions de l'ADN est induite par plusieurs voies de signalisation et peut comprendre l'apoptose

comprennent les oncogènes *RAS*, *MYC* et *E2F*. Les mutations de *E2F* qui empêchent son interaction avec la protéine du rétinoblastome (pRb) accélèrent l'entrée en phase S et l'apoptose. Une fonction de pRb consiste à supprimer l'apoptose : les cellules déficientes en pRb semblent plus susceptibles à l'apoptose induite par p53. Des agents comme les rayonnements ou les médicaments cytotoxiques provoquent une interruption du cycle cellulaire et/ou la mort cellulaire [5]. Les lésions de l'ADN provoquées par les radiations ou les médicaments sont détectées par différents moyens (fig. 3.34). La protéine kinase dépendante de l'ADN et le gène muté de l'ataxie télangiectasie (*ATM*) (ainsi que la protéine *ATR* apparentée) se lient à l'ADN endommagé et initient des cascades de phosphorylation pour transmettre les signaux des lésions. La protéine kinase dépendante de l'ADN jouerait un rôle clé dans la réponse aux cassures de l'ADN double-brin. L'*ATM* joue un rôle important dans la réponse aux lésions de l'ADN provoquées par les rayonnements ionisants, en contrôlant la phosphorylation initiale des protéines telles que p53, Mdm2, BRCA1, Chk2 et Nbs1. D'autres détecteurs des lésions de l'ADN comprennent les homologues mammaliens des protéines de levure de

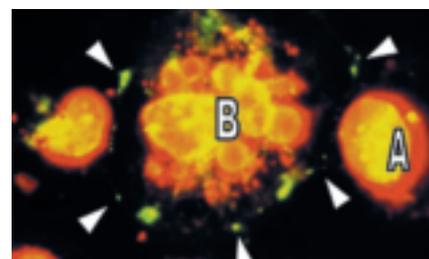


Fig. 3.35 La mort cellulaire par apoptose requiert une communication intracellulaire via les jonctions gap. Expression et position intracellulaire de la connexine 43 dans des cellules de carcinome de la vessie chez le rat, saines (A) et apoptotiques (B). Les flèches indiquent l'emplacement de la connexine 43 dans des zones de contact intercellulaire entre des cellules apoptotiques (B) et non apoptotiques (A). La contre-coloration de l'ADN avec de l'iodure de propidium révèle la fragmentation du noyau, typique de l'apoptose (B).

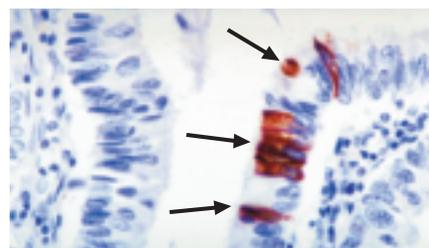
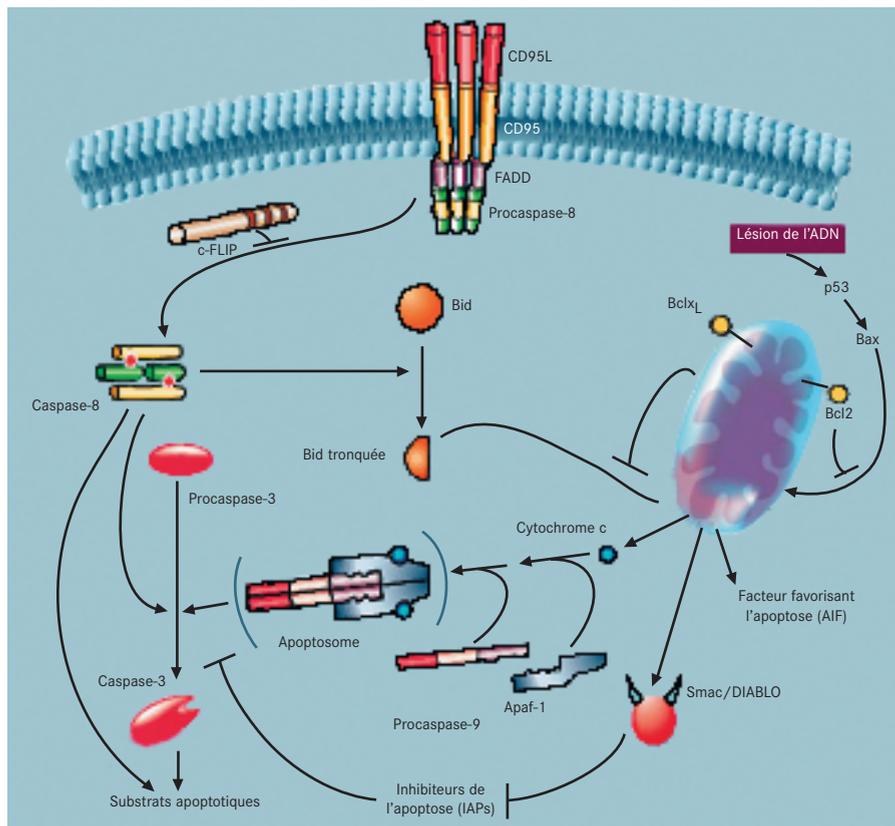


Fig. 3.36 Cellules apoptotiques dans un adénome, visualisées par immunohistochimie (rouge). L'apoptose se limite à des cellules uniques, contrairement à la nécrose, qui implique typiquement des groupes de cellules. L'apoptose n'entraîne pas de réponse inflammatoire



**Fig. 3.37** L'apoptose a lieu lorsque des protéases spécifiques (caspases) digèrent des protéines critiques dans la cellule. Les caspases sont normalement présentes sous la forme de procaspases inactives. Deux voies entraînent leur activation. La voie des récepteurs de mort (en haut à gauche de la figure) est stimulée lorsque des ligands se lient à des récepteurs de mort, comme CD95/Fas. La voie mitochondriale est stimulée par des agressions internes, telles que des lésions de l'ADN, ainsi que par des signaux extracellulaires. Dans les deux voies, les procaspases sont mises en contact. Elles se clivent alors les unes les autres pour libérer la caspase active. La liaison du ligand (FasL ou CD95L) à CD95 rassemble les molécules des procaspases 8 ; la libération des composants mitochondriaux rassemble les procaspases 9. Les caspases 8 et 9 actives activent alors d'autres procaspases comme la procaspase 3. Les caspases 8 et 9 actives activent alors d'autres procaspases comme la procaspase 3.

type PCNA, Rad1, Rad9 et Hus 1, ainsi que l'homologue du facteur de réplication C de levure, Rad17. Les molécules spécifiques détectent le mésappariement ou la méthylation non appropriée des nucléotides. Après l'exposition de cellules mammaliennes à des agents lésant l'ADN, p53 est activé et, parmi plusieurs 'cibles' ayant par conséquent subi une régulation positive, se trouve l'inhibiteur des kinases cycline-dépendantes p21 (qui provoque l'interruption en G1) et Bax (qui induit l'apoptose). Ainsi, le gène suppresseur de tumeur p53 induit deux réponses aux lésions de l'ADN dues à des rayonnements ou à des médicaments cytotoxiques: l'interruption

du cycle cellulaire en phase G1 et l'apoptose (*Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur*, p. 97). La sérine/thréonine kinase Chk2 est aussi capable d'interagir positivement avec p53 et BRCA1. Chk2 et la kinase fonctionnellement apparentée Chk1 semblent jouer un rôle dans l'inhibition de l'entrée en mitose via l'inhibition de la phosphatase Cdc25 (*Le cycle cellulaire*, p. 105).

#### Phase de régulation

Deux voies principales de signalisation apoptotiques ont été identifiées dans les cellules mammaliennes (fig. 3.37). La voie 'extrinsèque' dépend des modifications conformationnelles de certains récep-

teurs de la surface cellulaire, après liaison des ligands respectifs. La voie 'intrinsèque' fait intervenir la fonction mitochondriale. Elle est initiée par une carence en facteur de croissance, des corticostéroïdes ou des lésions de l'ADN dues à une irradiation ou à des médicaments cytotoxiques.

#### Récepteurs de la surface cellulaire

L'apoptose peut être induite par des molécules de signalisation, généralement des polypeptides tels que des facteurs de croissance ou des molécules apparentées, qui se lient aux récepteurs de 'mort' sur la surface cellulaire [6]. Cette mort cellulaire a été étudiée à l'origine par rapport à la réponse immunitaire, mais elle présente des ramifications bien plus vastes. Les récepteurs les mieux caractérisés appartiennent à la superfamille des gènes des récepteurs du facteur de nécrose des tumeurs (*TNF*). Outre un domaine de liaison au ligand, les récepteurs de mort contiennent une séquence cytoplasmique homologue dite 'domaine de mort'. Les membres de cette famille comprennent le récepteur Fas/APO-1/CD95 et le récepteur TNF-1 (qui se lie au TNF $\alpha$ ). L'activation du récepteur Fas (ou CD95) par son ligand spécifique (FasL ou CD95L) se traduit par une modification conformationnelle de sorte que le 'domaine de mort' interagit avec la molécule adaptatrice FADD qui se lie alors à la procaspase 8. Dans certains types de cellules, l'apoptose induite par les médicaments est associée à l'activation de Fas. L'irradiation ultraviolette active le récepteur Fas en l'absence du ligand. Vingt-huit pour cent des acides aminés de TRAIL (ligand inducteur de l'apoptose lié au facteur de nécrose des tumeurs, Apo-2L) sont identiques à ceux de FasL. TRAIL n'induit la mort cellulaire que dans les cellules tumorigènes ou transformées, pas dans les cellules normales [8].

#### Régulation de l'apoptose par les gènes de la famille BCL2

Si les membres de la famille des 'récepteurs de mort' et leurs ligands partagent des éléments structurels, les agents et les stimuli initiant la voie mitochondriale vers

l'apoptose sont divers. Une modification de la fonction mitochondriale souvent médiée par les membres de la famille *BCL2* est toutefois commune à ces stimuli [9]. Chez l'homme, au moins 16 homologues de *BCL2* ont été identifiés. Plusieurs membres de la famille (comprenant Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-W) suppriment l'apoptose, alors que d'autres l'induisent, et peuvent être subdivisés en se basant sur leur capacité à se dimériser avec la protéine Bcl-2 (Bad, Bik, Bid) ou non (Bax, Bak). La phosphorylation de la protéine Bad par une kinase spécifique (Akt/PKB) et par d'autres kinases empêche la dimérisation avec Bcl-2 et favorise la survie cellulaire. Au moins deux mécanismes d'action distincts sont reconnus : la liaison de Bcl-2 (ou autres membres de la famille) avec des membres pro- ou anti-

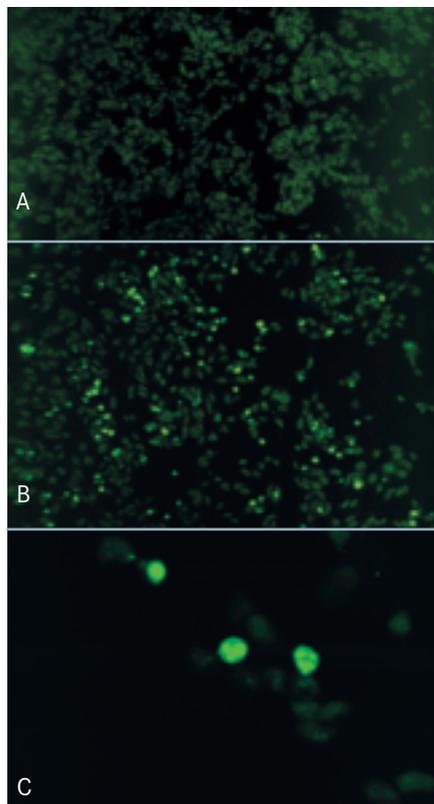
apoptotiques de la famille Bcl-2 ou la formation de pores dans les membranes mitochondriales. Bcl-x<sub>L</sub> est un puissant suppresseur de la mort qui subit une régulation positive dans certains types de tumeurs. Bax est un promoteur de la mort qui est inactivé dans certains types de cancers du côlon, de cancer de l'estomac et dans les malignités hématopoïétiques. Grâce à des sites de liaison pertinents, Bax se trouve sous le contrôle transcriptionnel direct de p53.

#### *Implication des mitochondries*

L'apoptose induite par des médicaments cytotoxiques s'accompagne de modifications critiques dans les mitochondries. De tels stimuli apoptotiques induisent la translocation de Bax du cytosol aux mitochondries, ce qui entraîne la libération du cytochrome c. La perte du potentiel transmembranaire suit la libération du cytochrome c et dépend de l'activation des caspases (voir ci-après), contrairement à la libération du cytochrome c. Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> se trouvent principalement dans la membrane mitochondriale externe. Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> et Bax peuvent former des canaux ioniques lorsqu'ils sont ajoutés à des membranes synthétiques, et ceci permet peut-être d'expliquer leur impact sur la biologie des mitochondries [10]. Dans le cytosol, après avoir été libéré des mitochondries, le cytochrome c active les caspases en formant un complexe ('apoptosome') avec Apaf-1 (facteur activant la protéase apoptotique 1), la procaspase 9 et l'ATP. Il semble possible que Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> puisse supprimer l'apoptose, soit en empêchant la libération du cytochrome c, soit en interférant avec l'activation des caspases par le cytochrome c et Apaf-1. La production soutenue de monoxyde d'azote (NO) peut entraîner la libération du cytochrome c mitochondrial dans le cytoplasme et ainsi contribuer à l'activation des caspases. Cependant, NO est impliqué dans plusieurs aspects de l'apoptose et peut agir à la fois comme un promoteur et comme un inhibiteur, selon les cas [11].

**Phase effectrice et phase de digestion**  
Chez les mammifères, au moins 13

protéases qui induisent la décomposition de la structure cellulaire au cours de l'apoptose ont été identifiées et sont désignées comme les caspases 1 à 13 [12]. Elles possèdent toutes un site actif cystéine et clivent les substrats après les résidus d'acide aspartique. Elles existent sous la forme de zymogènes inactifs, mais sont activées par différents processus qui impliquent le plus souvent le clivage de leurs proformes (désignées procaspases 8, etc.) à des sites particuliers, générant ainsi des sous-unités qui forment des protéases actives se composant de deux grandes et de deux petites sous-unités. Des cascades protéolytiques peuvent avoir lieu avec certaines caspases fonctionnant comme des initiatrices en amont (qui possèdent de grands prodomaines N-terminaux et qui sont activées par des interactions interprotéiques) et d'autres étant des effectrices en aval (activées par le clivage des protéases). Comme on l'a noté plus haut, au moins deux voies d'activation des caspases peuvent être distinguées: l'une impliquant des complexes FADD ou protéine-protéine similaires et l'autre induite par la libération du cytochrome c. Dans la première, le marquage de l'affinité suppose que la caspase 8 active les caspases 3 et 7 et que la caspase 3, à son tour, puisse activer la caspase 6. D'un autre côté, la libération du cytochrome c dans le cytoplasme se traduit par l'activation de la caspase 9, qui à son tour active la caspase 3. Alors que la voie intrinsèque vers l'activation de la caspase 3 peut être différenciée de la voie extrinsèque (c'est-à-dire l'activation par Fas, etc.), il est possible de démontrer certaines interactions. Ainsi, la caspase 9 est capable d'activer la caspase 8. Néanmoins, les voies sont distinctes au point que les animaux dépourvus de caspase 8 sont résistants à l'apoptose induite par Fas ou le TNF tout en étant susceptibles aux médicaments chimiothérapeutiques ; les cellules présentant une déficience en caspase 9 sont sensibles à l'élimination par Fas/TNF mais présentent une résistance aux médicaments et à la dexaméthasone. Finalement, la mort de certaines cellules peut avoir lieu indépendamment de la caspase 3. Les



**Fig. 3.38** Les cellules de neuroblastome traitées par rayonnements ionisants subissent l'apoptose. Le test TUNEL a été utilisé pour visualiser les cellules apoptotiques (vertes) avant (A) et 24 heures après (B) le traitement aux rayons X (5 Gray). Les gros plans montrent une fragmentation des noyaux des cellules apoptotiques (C).

caspases 3, 7 et 9 sont inactivées par des protéines de la famille des inhibiteurs de l'apoptose (IAP) qui sont des suppresseurs présents pendant l'évolution. La protéine IAP 'survivine' est surexprimée dans une grande partie des cancers humains. On sait peu de choses du rôle des mutations des caspases dans le cancer.

### Substrats des caspases et étapes tardives de l'apoptose

A l'origine, l'apoptose avait été définie par référence à une modification morphologique spécifique. En fait, la mitose et

l'apoptose se caractérisent par la perte de la liaison au substrat, la condensation de la chromatine, la phosphorylation et la séparation des lamines nucléaires. Ces modifications peuvent maintenant être attribuées à l'activation des caspases et à ses conséquences.

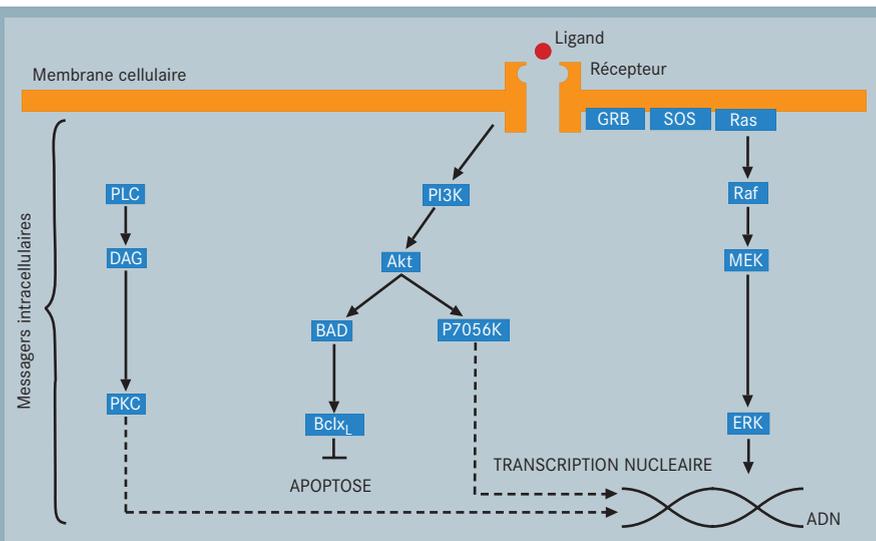
On connaît plus de 60 substrats des caspases, et la majorité d'entre eux sont spécifiquement clivés par la caspase 3 qui peut aussi traiter les procaspases 2, 6, 7 et 9 [13]. En dépit de la multiplicité des substrats, l'activité protéase médiée par les caspases est spécifique et il est prob-

able qu'elle représente la plus grande partie des modifications morphologiques associées à l'apoptose. Les caspases clivent les composants clés du cytosquelette, comprenant l'actine ainsi que les lamines nucléaires et d'autres protéines structurales. Les classes d'enzymes clivées par les caspases englobent les protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN dont un exemple est la poly(ADP-ribose)-polymérase et la protéine kinase dépendante de l'ADN. D'autres classes de substrats comprennent différentes kinases, des protéines

## MEDICAMENTS CIBLANT LES VOIES DE TRANSDUCTION DU SIGNAL

Dans les organismes multicellulaires complexes, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires sont régulées par un certain nombre d'hormones extracellulaires, de facteurs de croissance et de cytokines. Ces molécules se lient aux récepteurs cellulaires et communiquent avec le noyau de la cellule par un réseau de voies de signalisation intracellulaire. Dans les cellules cancéreuses, les proto-oncogènes peuvent perturber les composants clés de ces voies de transduction du signal par leur surexpression ou leur mutation, aboutissant à une signalisation cellulaire et à une prolifération cellulaire non contrôlées. Sachant qu'un grand nombre de ces composants peuvent être surexprimés ou mutés dans le cancer humain, la cascade de signalisation cellulaire offre toute une variété de cibles pour la thérapie contre le cancer (Adjei AA, *Current Pharmaceutical Design*, 6: 471-488, 2000).

Différentes approches ont été utilisées pour attaquer ces cibles. Elles comprennent des agents cytotoxiques classiques ainsi que des médicaments inhibiteurs de petites molécules. Par ailleurs, des oligonucléotides anti-sens, des vaccins, des anticorps, des ribozymes et des approches de thérapie génique ont été utilisées. Le diagramme illustre les voies de signalisation cellulaire qui sont la cible des agents anticancéreux actuellement en phase d'essais cliniques. Le médicament Gleevec est déjà utilisé en pratique clinique (*La leucémie*, p. 248). On



**Fig. 3.39** Voies de signalisation ciblées par les agents anticancéreux. PI3K = phosphoinositide-3-kinase ; PLC = phospholipase C ; PKC = protéine kinase C ; MEK = protéine kinase kinase activée par un mitogène ; ERK = kinase régulée par un signal extracellulaire ; Akt = protéine kinase B (PKB) ; BAD = protéine de la mort associée au Bcl - XL/Bcl-2 ; VEGF = facteur de croissance vasculaire endothélial ; HER = famille des récepteurs du facteur de croissance épidermique humain ; PDGF = facteur de croissance dérivé des plaquettes ; FGF = facteur de croissance fibroblastique ; SOS = protéine d'échange du nucléotide guanine "son of sevenless" ; GRB = protéine liée au récepteur du facteur de croissance.

espère qu'à l'avenir, une combinaison des agents ciblant les voies parallèles, ainsi que des combinaisons avec des agents cytotoxiques classiques amélioreront le devenir des patients cancéreux.

Les classes d'agents et leurs cibles potentielles comprennent :

> Les inhibiteurs des ligands, comme l'anticorps humain recombinant anti-VEGF (rHu mAbVEGF)

> Les récepteurs, anticorps anti-récepteurs et inhibiteurs des récepteurs de la tyrosine kinase

> Les inhibiteurs de la RAS farnesyltransférase

> Les inhibiteurs de RAF

> Les inhibiteurs de MEK

> Les analogues de la rapamycine

> Les inhibiteurs de la protéine kinase C (PKC)

> Les inhibiteurs de la dégradation protéique

> Les inhibiteurs du transport des protéines

des voies de transduction du signal et des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, illustrées par pRb. Le clivage de certains substrats est spécifique du type cellulaire. L'activité des caspases représente le clivage internucléosomique de l'ADN, un des premiers indicateurs biochimiques caractérisés de l'apoptose. ICAD/DFF-45 est un partenaire de liaison et un inhibiteur de l'endonucléase CAD (ADNase activée par les caspases), et le clivage de ICAD par la caspase 3 atténue l'inhibition et favorise l'activité endonucléase de CAD.

### Implications thérapeutiques

En théorie, la connaissance des voies critiques de signalisation ou des voies effectrices qui déclenchent l'apoptose fournit une base pour l'intervention thérapeutique, y compris pour le développement de nouveaux médicaments destinés à activer des voies particulières. Plusieurs options sont à l'étude [14]. Des tentatives visant à exploiter les connaissances des processus apoptotiques pour augmenter l'efficacité ou la spécificité des thérapies actuellement disponibles sont

en cours. Aucune réponse simple n'a émergé. Ainsi, par exemple, une augmentation relative de l'expression de Bcl-2 (qui, dans beaucoup de situations expérimentales inhibe l'apoptose) n'est pas nécessairement le signe d'un pronostic réservé et l'inverse semble vrai pour certains types de tumeurs. Dans des systèmes expérimentaux, les cellules acquérant des défauts apoptotiques (par exemples, les mutations de p53) survivent plus facilement au stress hypoxique et aux effets des médicaments cytotoxiques [15]. Cependant, les études cliniques n'ont pas permis d'établir de manière fiable que la mutation de p53 était associée à une faible réponse à la chimiothérapie [16].

Il est possible que de petites molécules interfèrent avec la fonction des membres de la famille Bcl-2 [17]. Dans des modèles animaux précliniques, la suppression de Bcl-2 par un oligonucléotide anti-sens s'est avérée retarder la croissance tumorale et cette approche fait actuellement l'objet d'essais cliniques. De la même manière, des nucléotides anti-sens dirigés contre la 'survivine' sont en cours d'évaluation. La possibilité d'utiliser le TRAIL recombinant

pour induire l'apoptose dans les cellules malignes est à l'étude. TRAIL forme la base du traitement de la leucémie promyélocytaire par l'acide *tout-trans* rétinolique [18]. Le développement d'inhibiteurs des caspases pour le traitement de certaines pathologies dégénératives (non cancéreuses) caractérisées par une apoptose excessive est aussi digne d'intérêt.

Les médicaments qui se sont avérés induire spécifiquement l'apoptose comprennent les agents chimiopréventifs (*Chimioprévention*, p. 153), illustrés par la 4-hydroxyphénylerétinamide. Le butyrate, un acide gras à chaîne courte produit par fermentation bactérienne de fibres alimentaires, inhibe la croissance cellulaire *in vitro* et favorise la différenciation. Il induit aussi l'apoptose. Ces deux rôles peuvent contribuer à son action de prévention du cancer colorectal. En outre, l'expression de l'enzyme cyclo-oxygénase (COX-2) peut moduler l'apoptose intestinale via des modifications de l'expression de Bcl-2. L'aspirine et les médicaments similaires, qui inhibent COX-2, peuvent promouvoir l'apoptose et empêcher la formation de tumeurs.

## REFERENCES

1. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*, 69: 217-245.
2. Kaufmann SH, Gores GJ (2000) Apoptosis in cancer: cause and cure. *Bioessays*, 22: 1007-1017.
3. Parton M, Dowsett M, Smith I (2001) Studies of apoptosis in breast cancer. *BMJ*, 322: 1528-1532.
4. Choisy-Rossi C, Yonish-Rouach E (1998) Apoptosis and the cell cycle: the p53 connection. *Cell Death Differ*, 5: 129-131.
5. Rich T, Allen RL, Wyllie AH (2000) Defying death after DNA damage. *Nature*, 407: 777-783.
6. Peter ME, Krammer PH (1998) Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol*, 10: 545-551.
7. Yeh WC, Hakem R, Woo M, Mak TW (1999) Gene targeting in the analysis of mammalian apoptosis and TNF receptor superfamily signaling. *Immunol Rev*, 169: 283-302.
8. Griffith TS, Lynch DH (1998) TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr Opin*

*Immunol*, 10: 559-563.

9. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 13: 1899-1911.
10. Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC (2000) Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol*, 2: 318-325.
11. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM (2001) Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 282: 1075-1079.
12. Kumar S (1999) Regulation of caspase activation in apoptosis: implications in pathogenesis and treatment of disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 26: 295-303.
13. Porter AG, Janicic RU (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*, 6: 99-104.
14. Nicholson DW (2000) From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*, 407: 810-816.
15. Zhou BB, Elledge SJ (2000) The DNA damage

response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408: 433-439.

16. Brown JM, Wouters BG (1999) Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res*, 59: 1391-1399.
17. Zheng TS (2001) Death by design: the big debut of small molecules. *Nat Cell Biol*, 3: E43-E46.
18. Altucci L, Rossin A, Raffelsberger W, Reitmair A, Chomienne C, Gronemeyer H (2001) Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. *Nat Med*, 7: 680-686.

## SITE INTERNET

The European Cell Death Organization:  
<http://www.ecdo.dote.hu/>

# INVASION ET METASTASE

## RESUME

> La capacité des cellules tumorales à envahir et à coloniser des sites distants est une caractéristique majeure différenciant les tumeurs bénignes des cancers malins.

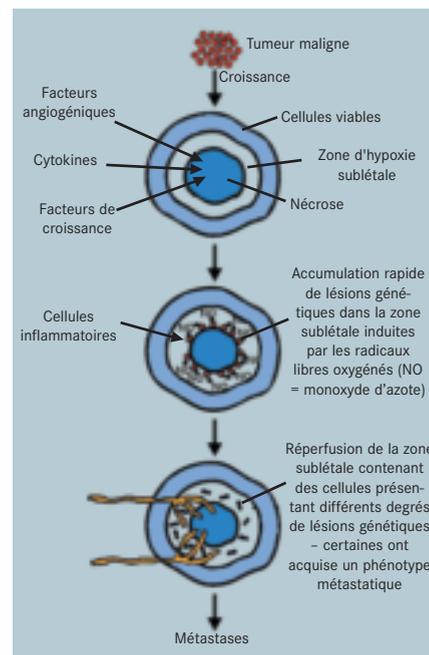
> La plupart des tumeurs humaines conduisent au décès en raison de l'invasion métastatique plutôt que des effets locaux indésirables du néoplasme primitif.

> La dissémination métastatique débute généralement par un envahissement des ganglions lymphatiques régionaux, suivi d'une diffusion hématogène dans tout le corps. Les métastases peuvent apparaître cliniquement plusieurs années après la résection de la tumeur primaire.

> Les procédés actuels ne permettent pas de détecter les micrométastases en routine, et la recherche de thérapies efficaces et sélectives contre la croissance métastatique reste un défi majeur.

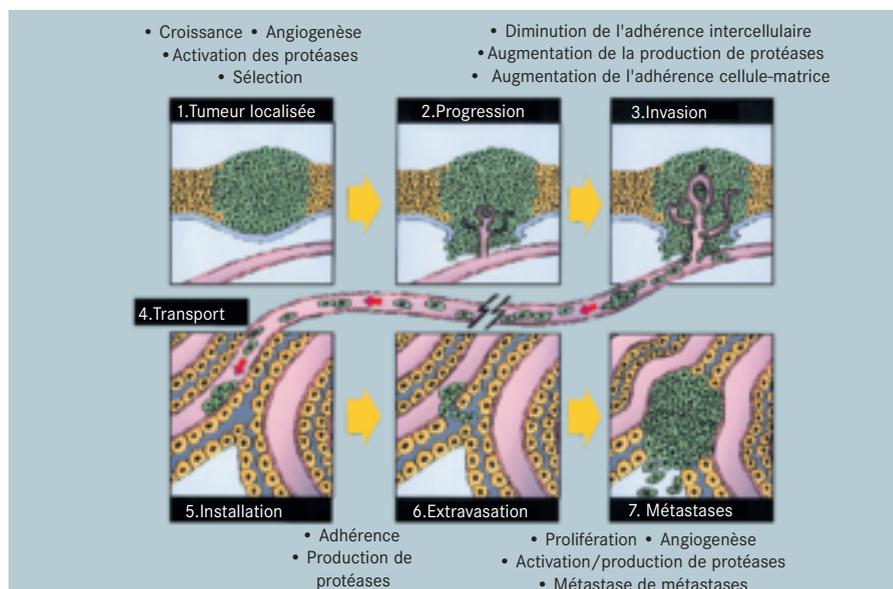
(Encadré : *Classification TNM des Tumeurs Malignes*, p. 126).

Il est absolument nécessaire d'identifier des indicateurs fiables du potentiel métastatique, étant donné que la détection clinique de la dissémination métastatique est souvent synonyme d'un mauvais pronostic. Les méthodes actuelles de détection de nouvelles tumeurs, comprenant la tomodensitométrie (CT scan) ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM), les ultrasons ou la mesure des marqueurs circulants comme l'antigène carcinoembryonnaire (CEA), l'antigène spécifique de la prostate (PSA) ou l'antigène du cancer 125 (CA 125) ne sont pas suffisamment sensibles pour détecter des micrométastases. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires des métastases est nécessaire. Il est évident que la croissance métastatique reflète à la fois une perte et un gain de fonction et, en effet, la recherche de gènes 'suppresseurs des métastases' s'est avérée plus fructueuse que l'identification de gènes dont on est sûr qu'ils



**Fig. 3.40** L'hypothèse de l'hypoxie suggère que la progression des tumeurs malignes vers un phénotype métastatique est induite par une déficience en oxygène et par la nécrose tumorale qui en résulte.

Le terme métastase (du grec signifiant 'changement de place') fait référence à la croissance de tumeurs secondaires en des sites distants d'un néoplasme primitif. Ce terme différencie donc les lésions bénignes des lésions malignes, et caractérise la dernière étape du processus multi-étape de la progression tumorale. La croissance métastatique est la principale cause d'échec des traitements et de décès des patients cancéreux. Bien que les tumeurs secondaires puissent provenir de l'essaimage de cellules dans des cavités corporelles, le terme métastase est généralement réservé à la dissémination des cellules tumorales via le sang ou le système lymphatique. La propagation dans le fluide cérébrospinal et le passage transcoelomique est aussi possible. La plupart des patients cancéreux (60 à 70 %) présentent des métastases manifestes ou occultes lors du diagnostic, et le pronostic pour la majorité de ces patients est sombre



**Fig. 3.41** Etapes du processus métastatique, illustrées par rapport à la dissémination d'une tumeur primaire d'un épithélium superficiel au foie.

Gène	Type(s) de cancer	Mécanisme
Famille nm23 (H 1-6) des nucléosides diphosphates kinases	Sein (foie, ovaire, mélanome)	Migration cellulaire ? Signalisation via les protéines G, assemblage des microtubules
<i>PTEN/MMAC1</i>	Prostate, gliome, sein	Migration, adhérences focales
<i>KAI1/CD82/C33</i>	Prostate, estomac, côlon, sein, pancréas, poumon	Adhérence intercellulaire, motilité
<i>CAD1/E-cadhérine</i>	Différents adénocarcinomes	Adhérence intercellulaire, organisation épithéliale
<i>MKK4/SEK1</i>	Prostate	Réponse cellulaire au stress ?
<i>KISS-1</i>	Mélanome, cancer du sein	Transduction du signal ? Régulation de MMP-9?
<i>BRMS1</i>	Sein	Communication cellulaire, motilité
<i>DPC4</i>	Côlon, pancréas	?

**Tableau 3.5** Gènes suppresseurs présumés de métastases.

stimulent spécifiquement le processus métastatique [1].

### Génétique des métastases

Avec la publication de la séquence du génome humain, et différentes initiatives majeures telles que le Cancer Genome Project au Royaume-Uni et le Cancer Genome Anatomy Project aux USA, la recherche de gènes régulés de manière positive, mutés ou perdus dans des cancers métastatiques (Tableau 3.5) a gagné du terrain. Il est maintenant possible d'utiliser la microdissection par capture

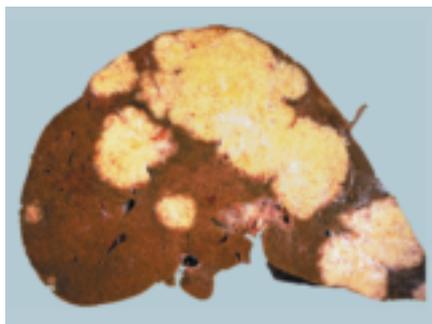
laser et l'analyse en série de l'expression des gènes (SAGE), d'isoler les cellules cancéreuses invasives et de comparer leur expression protéique ou génique à celle de cellules normales ou non invasives du même patient [2]. Avant ceci, les techniques de transfection de chromosomes ou d'ADN de cellules métastatiques à des cellules non métastatiques (ou vice versa), d'hybridation soustractive/d'ACP différentielle, de puces à ADNc et autres techniques, ont permis d'identifier certains gènes spécifiquement liés aux métastases, bien que beaucoup d'autres ainsi identifiés

soient aussi associés à la croissance tumorale ou à des processus développementaux.

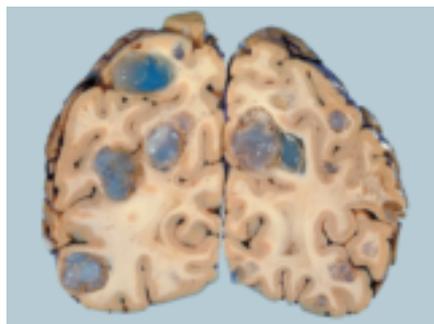
Les événements qui conduisent aux métastases cancéreuses comprennent des modifications de l'adhérence cellule-à-cellule et cellule-à-matrice, des altérations de la forme cellulaire, la déformabilité et la motilité, l'invasion des tissus normaux voisins, l'accès aux canaux lymphatiques ou vasculaires, la dissémination via le sang ou la lymphe, la survie des mécanismes de défense hôte, l'extravasation et la colonisation de sites secondaires (fig. 3.41). On sait maintenant que différentes caractéristiques des cellules cancéreuses stimulent le processus métastatique, et on a identifié une grande partie des événements moléculaires qui sous-tendent ce processus. Cependant, la capacité de pronostiquer des métastases cachées et la découverte de thérapies sélectives et efficaces contre les pathologies métastatiques restent des défis majeurs en oncologie.

### Biologie des métastases

La croissance de tumeurs ayant un diamètre supérieur à quelques millimètres n'est pas possible sans néovascularisation, et on comprend de plus en plus la manière dont ce phénomène est lié aux métastases [3]. Un grand nombre de modifications génétiques associées à la progression maligne (mutation de *HRAS*, sur-expression des oncogènes *ERBB2*, perte de *p53*) induisent un phénotype angiogénique (vaisseaux sanguins en développement) via l'induction de cytokines, comme le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF-A). VEGF-A est aussi régulé positivement par l'hypoxie dans les tumeurs, en partie par les cellules hôtes telles que les macrophages. La présence de zones hypoxiques est une caractéristique des tumeurs solides et a été associée à une faible réponse aux thérapies conventionnelles (fig. 3.40). En outre, l'activation du récepteur du facteur de croissance épithélial (EGFR) et d'autres voies de signalisation oncogènes peuvent aussi réguler positivement VEGF-C, une cytokine lymphangiogénique connue [4]. Les récepteurs de ces cytokines (Flk-1 et Flk-4) sont exprimés sur le système vasculaire des



**Fig. 3.42** Croissances métastatiques multiples d'un carcinome intestinal dans le foie.



**Fig. 3.43** Métastases cérébrales multiples à partir d'un carcinome du poumon.

tumeurs, et les deux (outre le fait d'agir comme des mitogènes puissants pour les cellules endothéliales) améliorent aussi la perméabilité des vaisseaux. Ainsi, l'activation de ces voies de signalisation peut stimuler à la fois l'invasion vasculaire et lymphatique et la dissémination tumorale. Le facteur de croissance du fibroblaste de base (bFGF) est souvent régulé positivement dans les cancers, notamment sur le pourtour invasif, là où les cellules tumorales et les cellules hôtes interagissent [5].

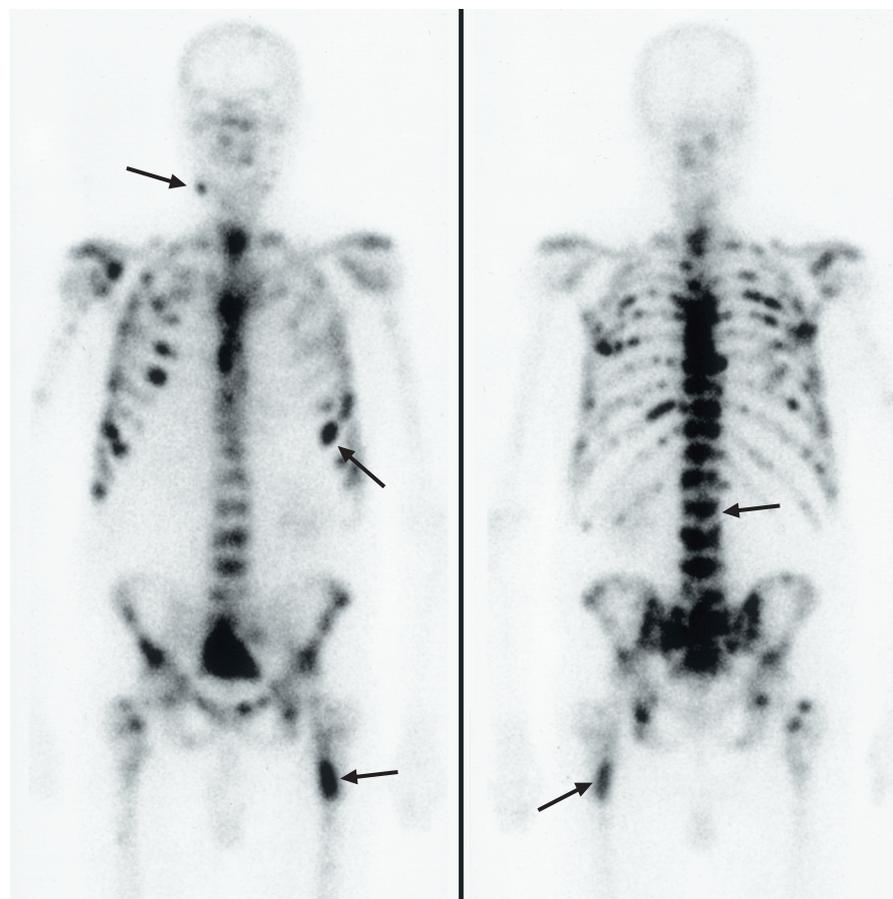
Les cellules épithéliales sont normalement délimitées par les membranes basales qui les séparent du stroma sous-jacent et des compartiments mésenchymateux. La rupture de cette barrière est la première étape de la transition d'un carcinome *in situ* à un carcinome invasif et potentiellement métastatique. La membrane basale se compose d'une variété de protéines structurales, comprenant le collagène IV (le principal composant), la laminine, l'entactine ainsi que les héparanes sulfates protéoglycans. On estime que les interactions entre les cellules tumorales et la membrane basale comprennent trois étapes, qui peuvent être facilement démontrées *in vitro*: l'adhérence, la dissolution/protéolyse de la matrice, et la migration [6]. Les cellules épithéliales sont normalement polarisées et fermement liées les unes aux autres via les desmosomes, des jonctions serrées et des molécules d'adhérence intercellulaire comme la E-cadhérine. Elles sont aussi liées à la membrane basale via d'autres molécules d'adhérence comme les intégrines. Les modifications des interactions d'adhérence cellule-à-cellule et cellule-à-matrice sont courantes dans le cancer invasif (*Communication intercellulaire*, p. 111). En fait, la E-cadhérine pourrait être assimilée à un gène suppresseur de tumeur, étant donné que sa déficience ou son inactivation fonctionnelle comptent parmi les caractéristiques les plus courantes du cancer métastatique, et que sa réintroduction dans les cellules peut inverser le phénotype malin. Le gène de la polypose adénomateuse familiale (*APC*), qui est muté dans un grand nombre de cancers du côlon sporadiques et héréditaires,

régule normalement l'expression de la  $\beta$ -caténine, une protéine qui interagit avec la E-cadhérine. Les mutations de *APC* (ou de la  $\beta$ -caténine) font augmenter les taux cellulaires de cette dernière et facilitent les interactions avec les facteurs de transcription tels que TCF/LEF (T cell factor/lymphoid enhancer factor) qui dirigent l'expression des gènes impliqués dans l'inhibition de l'apoptose et la stimulation de la prolifération cellulaire. D'autres gènes communément perdus dans les cancers (par exemple, *DCC*, pour *deleted in colon carcinoma*) codent aussi pour des molécules d'adhérence.

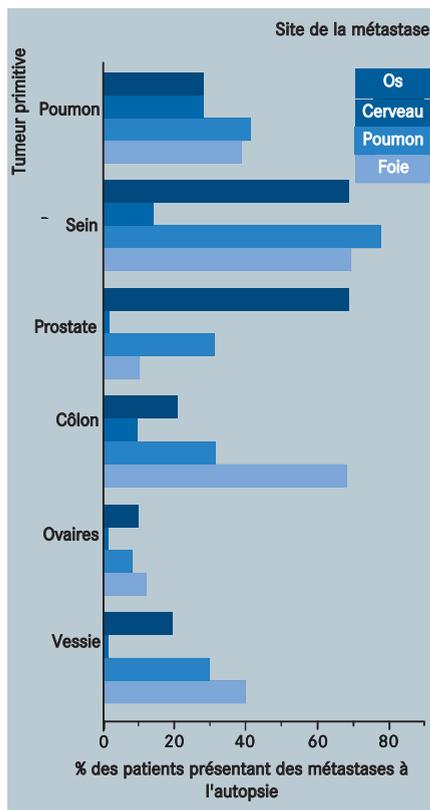
#### Intégrines

Les intégrines sont des protéines hétérodimères qui entraînent l'adhérence

entre les cellules et la matrice extracellulaire ou d'autres éléments cellulaires. La spécificité du ligand est déterminée par la composition de la sous-unité; beaucoup d'intégrines se lient à des substrats multiples et d'autres sont plus sélectives. Loin d'être une 'colle' inerte, elles sont capables de transmettre d'importants signaux régulant la survie, la différenciation et la migration cellulaires [7]. On a recensé beaucoup de différences dans l'expression des intégrines entre les cellules bénignes et les cellules malignes, mais les schémas sont complexes. En outre, leur expression et leur affinité de liaison peuvent être profondément influencées par le microenvironnement local et les facteurs solubles, permettant à la cellule tumorale de répondre aux



**Fig. 3.44** IRM présentant des métastases squelettiques chez un patient souffrant d'un carcinome prostatique primitif (vue de face et de dos). Certaines des plus grosses métastases sont indiquées par des flèches. Noter les nombreuses métastases au niveau des côtes et de la colonne vertébrale.



**Fig. 3.45** Emplacement des métastases à l'autopsie pour certains cancers fréquents, indiquant que le site de la métastase n'est pas aléatoire.

Tumeur primitive	Site des métastases
Cancer des bronches	Surrénale (souvent bilatéral)
Carcinome canalaire du sein	Foie
Carcinome lobulaire du sein	Dissémination péritonéale diffuse
Sein-	Os, ovaires
Poumon	Cerveau
Mélanome oculaire	Foie
Prostate	Os
Mélanome	Cerveau

**Tableau 3.6** Sites de métastases qui ne peuvent s'expliquer par l'anatomie circulatoire.

différentes conditions rencontrées tout au long de la cascade métastatique.

#### Autres molécules impliquées dans l'adhérence

D'autres molécules d'adhérence impliquées dans la progression du cancer comportent les sélectines telles que le sialyl Le<sup>x</sup> et les membres de la superfamille des immunoglobulines, comprenant les molécules d'adhérence intercellulaire (ICAM-1, ICAM-2, VECAM et PECAM). Ces dernières sont régulées positivement sur les cellules endothéliales activées, et peuvent interagir avec les intégrines sur les leucocytes et les cellules tumorales circulantes, facilitant ainsi leur arrêt et leur extravasation. CD44 est une autre molécule d'adhérence utilisée durant le 'homing' des lymphocytes, et on a suggéré qu'une modification du schéma 'épithélial' standard vers l'expression des variants d'épissage associés aux cellules hématopoïétiques aidait à la dissémination hémotogène des cellules des carcinomes. Il est possible que la thrombospondine provoque l'adhérence entre les cellules tumorales circulantes, les plaquettes et les cellules endo-théliales, favorisant l'embolisation (l'obstruction des vaisseaux) et l'arrêt. Les cellules tumorales accèdent alors à la membrane basale sous-endothéliale lorsque les cellules endothéliales se rétractent en réponse à ces embolies, et peuvent adhérer aux protéines exposées. Des peptides synthétiques contenant des séquences d'acides aminés qui sont en compétition avec la liaison à la laminine ou à la fibronectine peuvent inhiber la colonisation des poumons par des cellules injectées par voie intraveineuse dans des modèles expérimentaux.

#### RHO

La famille génique *RHO* composée de petites protéines hydrolysant la GTP compte plusieurs membres connus pour leur implication dans la migration cellulaire via la régulation de la contraction des filaments cytosquelettiques à base d'actomyosine et le remplacement des sites d'adhérence. La surexpression de

RhoC seul dans des cellules de mélanome est suffisante pour induire un phénotype hautement métastatique [8].

#### Fonctions enzymatiques dans l'invasion et dans les métastases

Les cellules des tumeurs invasives présentent une augmentation de l'expression de plusieurs enzymes en raison de la régulation positive des gènes, de la stimulation de l'activation des proenzymes ou de la réduction de l'expression d'inhibiteurs tels que les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP). En outre, les cellules tumorales peuvent aussi induire l'expression des enzymes par les cellules hôtes voisines et les 'détourner' pour stimuler l'invasion.

#### Métalloprotéinases matricielles

Les métalloprotéinases matricielles (MMP) représentent un groupe important. Différents cancers peuvent présenter des schémas d'expression distincts. Par exemple, dans les carcinomes épidermoïdes, les taux de gélatinase B (MMP-9), de stromélysines 1 à 3 (MMP-3, MMP-10 et MMP-11, normalement des enzymes du stroma qui sont aussi exprimées par ces carcinomes) et de matrilysine (MMP-7) sont souvent élevés. Les adénocarcinomes, par exemple du sein, peuvent présenter des taux accrus de gélatinase A (MMP-2) et la MMP-7 est couramment surexprimée dans les carcinomes du côlon. En outre, MT1-MMP, qui active MMP-2, est souvent régulée positivement dans les tumeurs et/ou dans les tissus hôtes voisins. Le principal substrat de la gélatinase est le collagène IV, un composant important de la membrane basale, alors que les stromélysines préfèrent la laminine, la fibronectine et les protéoglycanes, et peuvent activer la procolagénase (MMP-1), qui à son tour dégrade les collagènes fibrillaires des tissus interstitiels. Il est aussi fréquent que l'activateur du plasminogène urokinase (uPA) soit régulé positivement dans le cancer. Il contrôle la synthèse de la plasmine, qui dégrade la laminine, et active les gélatinases. Ainsi, la régulation positive de ces enzymes dans le cancer conduit aux

Cible	Exemple d'agent	Commentaires
<b>Adhérence/liaison</b>	Complexes RGD-toxine et thérapie génique ciblant les RGD Anticorps monoclonal anti-avf13 (Vitaxin, Medi522)	N'ont pas atteint les essais cliniques  Cytostatique chez les patients; anti-tumoral et anti-angiogénique dans les modèles animaux
<b>Protéolyse</b>	Inhibiteurs des métalloprotéinases matricielles	Cytostatique chez les patients; rares régressions partielles des tumeurs; fibrose stromale; activité observée sur de multiples modèles animaux et en combinaison avec la chimiothérapie; nouveaux agents avec une spécificité MMP variée en cours de développement.
<b>Motilité</b>	Pas d'agent sélectif	
<b>Voies de signalisation</b>	Squalamine (inhibiteur du NHE-3)  Inhibiteurs des petites molécules PDGFR, KDR et EGFR  Anticorps monoclonal anti-EGFR (C225)  Anti-corps anti-VEGF  CAI (inhibiteur de l'absorption de Ca <sup>++</sup> non voltage dependent)	Sélectif pour les cellules endothéliales  Actif <i>in vitro</i> sur des modèles animaux; activité précliniques en combinaison; essais de phase I terminés pour plusieurs agents, un certain degré de stabilisation ou de régression des tumeurs  Anticorps neutralisant; actif <i>in vitro</i> sur des modèles animaux; essais de phase I en cours  Anticorps bloquant; actif <i>in vitro</i> sur des modèles animaux ; activité préclinique seul et en combinaison; essais de phases I - III en cours  Actif <i>in vitro</i> sur des modèles animaux ; activité préclinique en combinaison; essais de phase I d'agents uniques et de combinaisons; un certain degré de stabilisation ou de régression des tumeurs
<b>Matrice extracellulaire</b>	Pirfenidone	Supprime les cellules stromales/inflammatoires Remodelage par l'expression stromale de TGF-β Essais de phase I pour la fibrose pulmonaire

**Tableau 3.7** Agents thérapeutiques dirigés contre les interactions stroma-tumeurs

cascades protéolytiques et à un potentiel d'invasion de la membrane basale et du stroma.

Les métalloprotéinases contribuent aussi à la croissance tumorale et aux métastases par d'autres moyens [9]. Au cours de l'angiogenèse, 'l'invasion' des bourgeons capillaires nécessite une protéolyse locale (en partie induite par les MMP-2 et MMP-9 régulées positivement, avec uPA). Par ailleurs, MMP-9 a été impliquée dans le 'déclenchement de l'angiogenèse' par libération du VEGF séquestré dans la matrice extracellulaire [10]. En outre, ces protéases peuvent contribuer à une crois-

sance soutenue des tumeurs par le clivage des ectodomains des proformes liées aux membranes des facteurs de croissance, et la libération des peptides qui sont mitogènes et chimiotactiques pour les cellules tumorales.

#### *Héparanase*

Outre les protéines structurales clivées par les métalloprotéinases dans la membrane basale et la matrice extracellulaire, les autres composants majeurs sont les glycosaminoglycanes, et surtout l'héparane sulfate protéoglycane (HSPG). L'héparanase est une enzyme importante

qui dégrade les chaînes latérales d'héparane sulfate des HSPG et, de la même manière que les protéases décrites plus haut, non seulement aide à la décomposition de la matrice extracellulaire et de la membrane basale, mais est aussi impliquée dans la régulation du facteur de croissance et dans l'activité des cytokines. Le facteur de croissance du fibroblaste de base (bFGF, un autre puissant facteur chimiotactique et mitogène pour les cellules endothéliales) et d'autres facteurs de croissance se lient à l'héparine sont séquestrés par l'héparane sulfate, constituant un dépôt local pouvant être libéré

## CLASSIFICATION TNM DES TUMEURS MALIGNES

Le système TNM de classification des tumeurs malignes (<http://www.uicc.org/index.php?id=508/>) est une forme de sténographie clinique utilisée pour décrire l'extension anatomo-mique (stadification) d'un cancer en termes de :

T - la tumeur primitive

N - les ganglions lymphatiques régionaux  
M - les métastases distantes

On donne à ces composants un numéro qui reflète l'absence ou la présence de maladie et son importance. Par exemple, une tumeur du côlon, classée T2N1M0, se sera étendue dans la paroi musculaire du côlon et disséminée vers 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux, mais sans preuve de métastases distantes. L'évaluation à l'aide du système TNM peut par conséquent aider à la planification du traitement par les oncologues et à la surveillance de l'efficacité du traitement en question, et donner des indications concernant le pronostic. En outre, l'utilisation d'un système normalisé facilite la diffusion des informations dans la communauté clinique.

Le système TNM a été mis au point par Pierre Denoix (Président de l'UICC, 1973-1978) entre 1943 et 1952 (Sobin LH, TNM - Principles, history and relation to other prognostic factors, *Cancer*, 91: 1589-92, 2001). En 1968, une série de brochures publiées par l'UICC décrivant la classification des cancers en 23 sites corporels différents ont été compilées pour produire le *Livre de Poche*, qui a ensuite été régulièrement réédité, enrichi et révisé. De manière à empêcher les variations indésirables de la classification par l'action de ses utilisateurs, il a été admis

### T = tumeur primitive

TX	Tumeur non évaluable
T0	Pas de tumeur primitive
Tis	Carcinome <i>in situ</i>
T1	Envahissement de la sous-muqueuse
T2	Envahissement de la muscularis propria
T3	Envahissement par la muscularis propria de la sous-séreuse et des tissus péricoliques ou périrectaux non péritonéalisés
T4	Envahissement direct des autres organes ou structures et/ou perforation du péritoine viscéral

### N = ganglions lymphatiques régionaux

NX	Ganglions régionaux non évaluables
N0	Pas de métastase ganglionnaire régionale
N1	Métastases dans 1 à 3 ganglions régionaux
N2	Métastases dans 4 ganglions régionaux ou plus

### M = métastase distante

MX	Métastases distantes non évaluables
M0	Absence de métastase distante
M1	Présence de métastases distantes

Tableau 3.8 Classification TNM du cancer du côlon et du rectum.

en 1982 qu'une seule classification TNM internationale devait être formulée. Ainsi, ce sont des réunions d'experts qui mettent à jour les classifications existantes et qui en développent de nouvelles. L'édition actuelle du TNM (Eds. Sobin LH et Wittekind Ch, *TNM Classification of Malignant Tumours, 6th Edition*, Wiley, 2002) rassemble des lignes directrices pour une classification et une stadification qui correspondent exactement à celles de la sixième édition de *AJCC Cancer Staging Manual* (2002). Le TNM, aujourd'hui le système de classification le plus couramment utilisé pour classer la dissémination des tumeurs, est publié en 12 langues et accompagné d'un *TNM Atlas* illustré (Ed. Hermanek P et coll., 4th Edition, Springer-Verlag, 1997), de la *TNM Mobile Edition* (Wiley, 2002) et d'un supplément au TNM (Eds. Wittekind Ch et coll.,

*TNM Supplement 2001. A Commentary on Uniform Use, 2nd Edition*, Wiley 2001) avec des règles et des explications.

Le défi pour l'avenir consiste à incorporer dans le TNM les informations provenant des nouvelles techniques de diagnostic et d'imagerie (telles que l'échotomographie endoscopique, l'imagerie par résonance magnétique, la biopsie du ganglion sentinelle, l'immunohistochimie et l'amplification génique par ACP). Il existe un faisceau croissant de facteurs de pronostic connus et potentiels (Eds. Gospodarowicz M et coll., *Prognostic Factors in Cancer*, Wiley, 2001) qui pourraient être intégrés dans le TNM pour former un système pronostique complet. Une telle intégration pourrait être exploitée pour améliorer les pronostics et individualiser le traitement des patients cancéreux.

par l'héparanase. De même, uPA et l'activateur plasminogène tissulaire (tPA) peuvent être libérés de l'héparane sulfate par l'héparanase, donnant plus de puissance aux cascades protéolytiques et mitogènes.

### Facteurs de croissance spécifiques des tissus

Finalement, il est possible que la libération des facteurs de croissance spécifiques des tissus joue un rôle dans la sélectivité organique des métastases. Par exemple, les cellules de carcinome

colorectal surexprimant l'EGFR ont une prédilection pour la croissance dans le foie où l'on détecte des concentrations élevées de ses ligands. Tous nécessitent un clivage protéolytique pour être activés. D'autres enzymes qui sont impliquées dans les métastases comprennent les

cystéines protéinases, notamment les cathépsines B et D. Il existe, pour la plupart des enzymes décrites, des programmes de recherche actifs visant à découvrir des inhibiteurs sélectifs (dont certains font déjà l'objet d'essais cliniques de phase II et III destinés à prévenir ou traiter les pathologies métastatiques. La motilité, couplée à la protéolyse, explique l'invasion par des cellules tumorales. Elle est aussi importante au cours de l'intravasation et de l'extravasation des vaisseaux sanguins et lymphatiques. On a décrit beaucoup de facteurs de motilité, qui peuvent provenir des tumeurs ou de l'hôte. Un grand nombre d'entre eux, comme le facteur de croissance transformant alpha, le facteur de croissance épidermique, et le facteur de croissance provenant des plaquettes, peuvent induire des réponses chimiotactiques dans les cellules tumorales exprimant les récepteurs apparentés. Le facteur de dispersion (aussi connu comme facteur de croissance hépatocytaire, ou HGF) est un puissant facteur de motilité provenant de l'hôte, et les cellules tumorales elles-mêmes sécrètent un grand nombre de facteurs autocrines de motilité comprenant l'autotaxine et la neuroleukine/phosphohexose isomérase.

### Préférence organique des métastases

La distribution organique des métastases dépend du type et de l'emplacement de la tumeur primitive, 50 à 60 % des sites secondaires étant imposés par la voie anatomique empruntée par les cellules se disséminant. La plupart des métastases surviennent dans le premier lit capillaire ou ganglion lymphatique rencontré. Le nombre de ganglions impliqués est un facteur

pronostique clé dans beaucoup de cancers, et ceci a conduit à des efforts d'identification des ganglions lymphatiques 'sentinelles' en vue d'améliorer les prédictions de la dissémination du cancer. Les canaux lymphatiques représentent un obstacle moins important à l'entrée des cellules tumorales que les capillaires, étant donné la fragilité de leur membrane basale. Lorsqu'elles se trouvent dans le système lymphatique, les cellules tumorales sont transportées aux sinus sous-capsulaires des ganglions de drainage, où elles peuvent s'arrêter et grandir, succomber aux défenses de l'hôte, ou quitter le ganglion via les vaisseaux lymphatiques efférents. La propension d'une cellule tumorale à générer une métastase lymphatique peut dépendre de sa capacité à adhérer aux fibres réticulaires dans le sinus sous-capsulaire. Ces fibres contiennent de la laminine, de la fibronectine, du collagène IV, et différentes intégrines exprimées par différentes cellules tumorales peuvent être responsables de l'adhérence à ces structures et aux cellules lymphatiques endothéliales [11].

Les sarcomes ont tendance à former des métastases dans les poumons parce que le drainage veineux y retourne ; les cellules du carcinome du côlon entrent dans la circulation portale qui libère les cellules dans le foie, et ainsi de suite (fig. 3.45). Cependant, on a admis depuis longtemps qu'il y avait un élément non aléatoire dans les schémas métastatiques (Tableau 3.6). Stephen Paget a émis l'hypothèse d'une affinité entre 'la graine et le sol' ('seed and soil') en 1889, en se basant sur ses observations faites à partir de plus de 700 autopsies de femmes atteintes du cancer du sein.

Selon lui, les différentes cellules cancéreuses (la graine) avaient une affinité pour certains organes (le sol).

Il existe, dans des systèmes expérimentaux, différents exemples illustrant l'hétérogénéité des tumeurs primitives et les différences de la capacité des cellules clonées à former des métastases en différents sites varie. Certains des schémas concernent la capacité des cellules malignes à adhérer aux cellules endothéliales dans les organes cibles, et à répondre aux facteurs de croissance locaux après leur extravasation. On pensait auparavant que l'échappement de la tumeur primitive et la survie dans la circulation étaient les principales étapes déterminant la production effective de métastases. Cependant, malgré le fort pourcentage de pertes au niveau de ces étapes, à la fois dans des modèles expérimentaux et chez l'homme, un grand nombre de cellules tumorales atteignent des sites distants mais restent dormantes, soit en raison d'un manque de facteurs de croissance adaptés, soit en raison de leur incapacité à induire la néoangiogenèse. En effet, en utilisant des techniques de dosage sensibles telles que l'immunocytochimie et l'amplification génique par ACP (amplification catalysée par la polymérase), les cellules tumorales individuelles (ou les marqueurs génétiques spécifiques) peuvent être retrouvées dans le sang, les ganglions, la moelle osseuse, les liquides corporels, etc., mais la signification de résultats 'positifs', et le fait qu'ils puissent être utilisés dans le pronostic de métastases déclarées ultérieures, ne sont pas encore bien établis.

### REFERENCES

1. Yoshida BA, Sokoloff MM, Welch DR, Rinker-Schaeffer CW (2000) Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. *J Natl Cancer Inst*, 92: 1717-1730.
2. Simone NL, Pawletz CP, Charboneau L, Petricoin EF, Liotta LA (2000) Laser capture microdissection: Beyond functional genomics to proteomics. *Mol Diagn*, 5: 301-307.
3. Fidler IJ (2000) Angiogenesis and cancer metastasis. *Cancer J Sci Am*, 6 Suppl 2: S134-S141.
4. Eccles SA (2000) Cell biology of lymphatic metastasis. The potential role of c-erbB oncogene signalling. *Recent Results Cancer Res*, 157: 41-54.
5. Fidler IJ (1999) Critical determinants of cancer metastasis: rationale for therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, 43 Suppl: S3-10.
6. Stracke ML, Liotta LA (1992) Multi-step cascade of tumor cell metastasis. *In Vivo*, 6: 309-316.
7. Berman AE, Kozlova NI (2000) Integrins: structure and functions. *Membr Cell Biol*, 13: 207-244.
8. Ridley A (2000) Molecular switches in metastasis. *Nature*, 406: 466-467.
9. McCawley LJ, Matrisian LM (2000) Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today*, 6: 149-156.
10. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D (2000) Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*, 2: 737-744.
11. Brodt P (1991) Adhesion mechanisms in lymphatic metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 10: 23-32.

### SITE INTERNET

The Metastasis Research Society (UK): <http://www.metastasis.icr.ac.uk>