médecine/sciences 1999 ; 15 : 66-8

Amplification génique, sites fragiles et hypoxie

L'instabilité génomique est l'une des propriétés les plus anciennement reconnues aux cellules cancéreuses. Les techniques de cytogénétique classique, et plus récemment de cytogénétique moléculaire, ont identifié une grande variété de réarrangements chromosomiques qui contribuent à la progression tumorale. Fonctionnellement, on peut classer les mutations qui résultent de ces réarrangements en deux grandes catégories : celles qui inactivent des gènes suppresseurs de tumeur et celles qui conduisent à la surexpression d'oncogènes. Des translocations, inversions ou délétions récurrentes ont été associées à l'une ou l'autre de ces deux catégories de mutations. Dans le cas des surexpressions d'oncogènes, des réarrangements particuliers associés à une augmentation du nombre de copies des gènes ont été également mis en évidence dans une grande variété de tumeurs [1, 2]. Ce phénomène, connu sous le nom d'amplification génique, conduit à la formation d'expansions chromosomiques appelées HSR *(homogeneously staining regions)* ou de molécules extrachromosomiques appelées DM (doubles-minutes) qui portent les copies surnuméraires d'oncogènes et des séquences qui les flanquent *(m/s 1996, n° 4, p. 526)*. L'étude des mécanismes conduisant à l'accumulation de ces copies s'est avérée peu aisée à partir de tissu tumoral car de nombreux remaniements postérieurs à l'amplification se sont généralement produits au stade où l'on peut observer les cellules. La mise au point de systèmes cellulaires modèles s'est donc révélée nécessaire pour analyser les événements survenant précocement au cours du processus d'amplification. Appliquée à ces modèles, la technique de FISH (hybridation *in situ* fluorescente) a permis de montrer que deux mécanismes ségrégatifs différents interviennent aux étapes précoces du phénomène : un processus d'amplification purement intrachromosomique par cycles de cassure-fusion-pont (CFP) chromatidiens et un processus aboutissant à former des DM [3].

Sites fragiles, délétions et translocations dans les tumeurs

Un certain nombre de travaux déjà anciens avaient suggéré l'existence d'une relation entre réarrangements chromosomiques et locus préalablement localisés et décrits comme sites fragiles [4]. Cytogénétiquement, ces sites apparaissent comme des cibles de cassures chromosomiques récurrentes survenant lorsque les cellules sont soumises à des conditions spécifiques de culture. Ils sont classés en fonction de leur fréquence d'expression en sites communs ou rares, et en fonction du *stress* qui les induit [5]. Au contraire des sites rares, les sites fragiles communs sont présents chez tous les individus de l'espèce. Leur fréquence d'expression peut cependant varier d'un individu à un autre et d'un tissu à un autre. Récemment, l'analyse de réarrangements survenant dans les cellules tumorales a permis de corréler la localisation de certains sites fragiles communs à celle de points de cassure impliqués dans la formation de délétions et de translocations récurrentes [6]. L'exemple le mieux étudié est l'association du site fragile FRA3B avec des délétions ou des translocations conduisant à l'inactivation du gène *FHIT* dans de très nombreux types de cancers comme les cancers de l'œsophage, de l'estomac, du sein, du poumon et du côlon, cette liste n'étant pas exhaustive. Des analyses fonctionnelles suggèrent par ailleurs que ce gène est un suppresseur de tumeur. Plus récemment, une association a été trouvée entre le site fragile FRA7G et des délétions de cette région dans de nombreuses tumeurs. Le gène inactivé par ces délétions est en cours d'identification. La convergence des résultats de ces études récentes suggère donc que les sites fragiles communs jouent un rôle important dans l'étiologie de certaines lésions génétiques associées à la progression tumorale. Jusqu'à très récemment, aucune donnée n'indiquait si l'activation de ces sites participait aux événements conduisant à l'amplification d'oncogènes.

Sites fragiles et étapes précoces d'amplification intrachromosomique

A l'aide de systèmes modèles, il a été montré que l'événement le plus simple susceptible de déclencher les cycles de CFP est l'introduction d'une cassure double-brin dans l'ADN [7]. Récemment, nous avons confirmé cette hypothèse par la démonstration qu'une cassure double-brin unique, non cicatrisée par les systèmes de réparation classiques, suffit à déclencher l'ensemble des événements conduisant à une amplification par CFP [8]. Ces résultats ont soulevé la question du rôle des molécules utilisées *in vitro* pour cribler les mutants amplifiés. En effet, il semblait possible que ces agents, qui sont clastogènes* dans

* *Clastogènes : introduisent des cassures dans l'ADN.*

leur grande majorité, jouent un rôle dans la mise en route du processus. Nous avons montré que seules les molécules qui induisent des cassures récurrentes ciblées au niveau de sites fragiles localisés en position télomérique par rapport aux gènes sélectionnés sont capables d'induire le processus d'amplification par CFP [9]. De plus, la cassure des ponts mitotiques formés au cours du processus de CFP n'est pas aléatoire, mais survient préférentiellement au niveau de sites fragiles centromériques par rapport aux marqueurs analysés. La localisation des sites fragiles qui flanquent le gène sous sélection détermine donc la taille et le contenu génétique des amplicons initiaux dans les systèmes modèles [9]. Nous avons proposé que les sites fragiles pourraient jouer le même rôle lors de l'amplification d'oncogènes dans les cellules des tumeurs, hypothèse qui semble être confirmée par un certain nombre d'études récentes. Par exemple, dans le cas du locus 11q13 qui est probablement amplifié par CFP dans une grande variété de tumeurs solides, une carte génétique des amplicons a été établie [10]. L'analyse des banques de données a permis d'établir une corrélation entre sites fragiles et bornes des amplicons *(figure 1)*. Il a été récemment démontré qu'une des bornes de cet amplicon est précisément co-localisée avec le site FRA11A [11]. Au locus 12q13-14, de nombreux gènes ont été identifiés parmi lesquels cinq sont fréquemment co-amplifiés dans divers types de tumeurs, alors que deux gènes qui les flanquent ne le sont jamais [12]. L'analyse des banques de données révèle qu'un site fragile est présent au niveau des séquences frontières proximale et distale de ces amplicons *(figure 1)*.

Sites fragiles et amplification extrachromosomique

Actuellement, il existe un consensus pour considérer que le déclenchement du processus extrachromosomique résulte d'un événement de recombinaison décalé plutôt que d'un événement de cassure double-brin imparfaitement réparé. En particulier, nous avons montré que l'activation des sites fragiles n'induit pas le processus extrachromosomique [9]. En revanche, un rôle de l'activation des sites fragiles dans l'évolution des DM restait possible. Cette question a été abordée en étudiant des clones présentant une amplification du gène *MDR1 (multidrug resistance 1)* sur des DM [13]. De tels mutants peuvent être obtenus après sélection par des molécules non clastogènes telles que certains poisons du fuseau mitotique. Dans ces conditions, les DM sont de relativement petite taille et portent chacun une copie du gène. Ces caractéristiques se maintiennent au cours de l'expansion des clones si les cellules sont cultivées dans ce même milieu. En revanche, si on traite brièvement ces cellules par un activateur des sites fragiles, les petits DM homogènes en taille sont rapidement remplacés par des DM de taille variable, quelquefois très gros, qui portent chacun des copies multiples du gène *MDR1*. Le fait qu'un site fragile lié au gène *MDR1* est, selon toute probabilité, co-amplifié sur ces DM suggère que la fusion d'éléments extrachromosomiques peut être induite s'ils portent des sites fragiles et si ces sites sont activés par un *stress* adéquat. Cette hypothèse a été validée par l'analyse de deux autres locus *(Tableau I)*. Nous avons montré, en outre, qu'après activation des sites fragiles, les DM sont fréquemment réintégrés au niveau des cassures induites dans les chromosomes. Afin de déterminer si ces événements de fusion et de réintégration pouvaient survenir dans des cellules contenant des DM porteurs de séquences non synténiques, des clones présentant des copies extrachromosomiques du gène *AMPD2* (adénylate désaminase 2) ont été sélectionnés à partir de cellules contenant des DM porteurs du gène *MDR1*. Après traitement par des inducteurs de sites fragiles, des fusions entre les deux types de DM ont été observées ainsi que des événements de réintégration donnant naissance à des HSR complexes ciblées au niveau des sites chromosomiques [13]. Ce type de mécanisme pourrait rendre compte de la formation des HSR contenant des oncogènes initialement non synténiques, qui sont fréquemment observées au niveau de locus récurrents dans un grand nombre de cancers du sein [14].

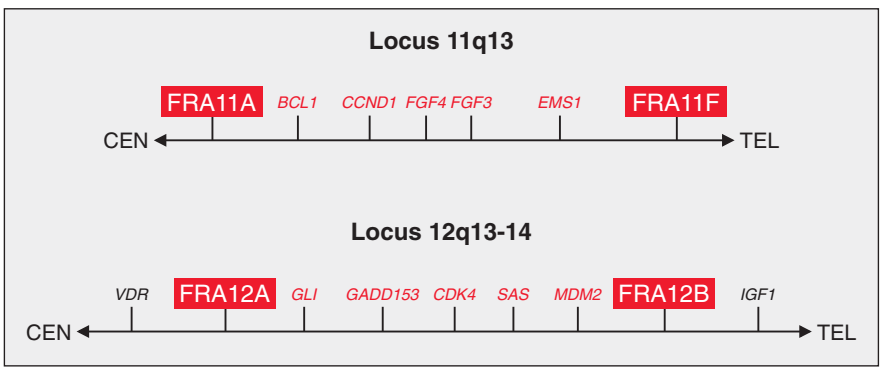

Figure 1. ***Carte génétique des locus 11q13 et 12q13-14.*** *CEN : centromère, TEL : télomère. Les sites fragiles sont indiqués dans les boîtes rectangulaires ; leurs localisations sont : FRA11F (11q14-2), FRA11A (11q13-3), FRA12B (12q21-3) et FRA12A (12q13-1). Au locus 11q13, les gènes* BCL1 (B cell CCL lymphoma), CCND1 *(cycline D1),* FGF3 *et* 4 (fibroblast growth factor type 3 et 4), *et* EMS1 (cortactin protein) *sont généralement co-amplifiés. Au locus 12q13-14, les gènes* GLI (glioma-associated oncogene homolog), GADD153 (DNA damage-inducible transcript 3), CDK4 (cyclin-dependant kinase 4), SAS (sarcoma-amplified sequence) *et* MDM2 *(homologue humain du gène murin double-minute 2) sont fréquemment co-amplifiés alors que* VDR (vitamin D receptor) *et* IGF1 (insulin-like growth factor 1) *ne le sont jamais.*

L'hypoxie induit les réarrangements en activant des sites fragiles

Des réarrangements récurrents, débutant potentiellement au niveau de sites fragiles, ont été identifiés dans les cellules de tumeurs venant

Tableau I

RELATION ENTRE SITES FRAGILES ET ÉVOLUTION DES DM[1]

Gène sélectionné	Site fragile lié au gène	Induction des sites fragiles*	Fusion des DM
MDR1	oui	non	–
		oui	+
AMPD2	oui	oui	+
DHFR	non	oui	–

Devenir des DM portant des copies des gènes MDR1 (multi drug resistance 1), AMPD2 *(adénylate désaminase 2), ou* DHFR *(dihydrofolate réductase): des sites fragiles liés sont co-amplifiés seulement dans les deux premiers cas. *: les sites fragiles ont été induits directement par l'agent sélectif ou par de brefs traitements avec un inducteur de sites fragiles lorsque la sélection a été réalisée par un agent qui ne les induit pas.*
[1] DM: doubles-minutes

de patients traités et non traités. Cela suggère qu'il existe des activateurs de sites fragiles autres que les molécules ou les irradiations utilisées lors des thérapies anticancéreuses. Dans un certain nombre de cas, l'activation des sites résulte probablement de facteurs liés à l'environnement. Par exemple, il a été montré que des composés présents dans la fumée de cigarette activent certains sites fragiles [15]. Ces observations peuvent aisément rendre compte de l'induction de réarrangements observés dans un grand nombre de carcinomes de la tête et du cou chez les fumeurs. Dans d'autres cas, les contraintes susceptibles de déclencher l'activation des sites fragiles n'étaient pas évidentes. Une hypothèse séduisante était que certains paramètres du micro-environnement des tumeurs jouent ce rôle activateur. La carence en oxygène ou hypoxie est un *stress* que les cellules des tumeurs subissent couramment. L'hypoxie a notamment été associée à la résistance aux radiothérapies, à la progression tumorale et à la capacité des cellules de métastaser. L'hypoxie induisant l'apoptose des cellules normales, elle sélectionne des cellules ayant perdu une protéine p53 fonctionnelle lors du développement tumoral [16]. Par ailleurs, nous venons de montrer que l'hypoxie induit des cassures aux sites fragiles dans le génome de hamster [13], et dans le génome humain. L'hypoxie peut donc jouer un double rôle au niveau de l'évolution des tumeurs: elle induit, par activation des sites fragiles, divers types de réarrangements chromosomiques récurrents et elle assure la sélection de sous clones cellulaires porteurs de mutations conduisant à un phénotype plus agressif ■

Remerciements

Le travail personnel des auteurs a bénéficié de la collaboration du Professeur G. Buttin et de subventions de l'Université Pierre et Marie Curie, de la Ligue Nationale Française contre le Cancer (Comité de Paris), de l'Association pour la Recherche sur le Cancer, de la Fondation de France (97003903) et de la Communauté Européenne (Biomed II, CT-96-0894 à M. Debatisse). Arnaud Coquelle est allocataire du Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie.

Michelle Debatisse
Arnaud Coquelle

Unité de génétique somatique, URA Cnrs 1960, Institut Pasteur, 25, rue du Dr-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

RÉFÉRENCES

1. Brison O. Gene amplification and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1155 : 25-41.

2. Knuutila S, Bjorkqvist AM, Autio K, *et al.* DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol* 1998; 152: 1107-23.

3. Debatisse M, Tolédo F. Amplification génique, plasticité des génomes et oncogenèse. *Med Sci* 1995; 11: 1099-109.

4. Yunis JJ, Soreng AL. Constitutive fragile sites and cancer. *Science* 1984; 226: 1199-204.

5. Sutherland GR, Richards RI. The molecular basis of fragile sites in human chromosomes. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 323-7.

6. Smith DI, Huang H, Wang L. Common fragile sites and cancer. *Int J Oncol.* 1998; 12: 187-96.

7. Toledo F, Buttin G, Debatisse M. The origin of chromosome rearrangements at early stages of *AMPD2* gene amplification in Chinese hamster cells. *Curr Biol* 1993; 3: 255-64.

8. Pipiras E, Coquelle A, Bieth A, Debatisse M. Interstitial deletions and intrachromosomal amplification initiated from a double-strand break targeted to a mammalian chromosome. *EMBO J* 1998; 17: 325-33.

9. Coquelle A, Pipiras E, Toledo F, Buttin G, Debatisse M. Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell* 1997; 89: 215-25.

10. Bekri S, *et al.* Detailed map of a region commonly amplified at 11q13 → q14 in human breast carcinoma. *Cytogenet Cell Genet* 1997; 79: 125-31.

11. Perucca-Lostanlen D, Hecht BK, Courseaux A, Grosgeorge J, Hecht F, Gaudray P. Mapping FRA11A, a folate-sensitive fragile site in human chromosome band 11q13.3. *Cytogenet Cell Genet* 1997; 79: 88-91.

12. Reifenberger G, Reifenberger J, Ichimura K, Collins VP. Amplification at 12q13-14 in human malignant gliomas is frequently accompanied by loss of heterozygosity at loci proximal and distal to the amplification site. *Cancer Res* 1995; 55: 731-4.

13. Coquelle A, Toledo F, Stern S, Bieth A, Debatisse M. A new role for hypoxia in tumor progression: induction of fragile site triggering genomic rearrangements and formation of complex DMs and HSRs. *Molec Cell* 1998; 2: 259-65.

14. Bernardino J, Apiou F, Gerbault-Seureau M, Malfoy B, Dutrillaux B. Characterization of recurrent homogeneously staining regions in 72 breast cancers. *Genes Chromosom Cancer* 1998; 23: 100-8.

15. Kao-Shan CS, Fine RL, Whang-Peng J, Lee EC, Chabner BA. Increased fragile sites and sister chromatid exchanges in bone marrow and peripheral blood of young cigarette smokers. *Cancer Res* 1987; 47: 6278-82.

16. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996; 379: 88-91.

TIRÉS À PART

M. Debatisse.