médecine/sciences 1999 ; 15 : 1105-17

Les relations entre croissance et prolifération reconsidérées chez la drosophile

Laurent Perrin Nathalie Arquier Michel Sémériva

Des expériences récentes réalisées sur la drosophile montrent que la stimulation des divisions cellulaires ne conduit pas à une augmentation de la masse tissulaire. L'inhibition ou l'induction de la prolifération entraîne la formation de tissus de même taille avec, respectivement, des cellules anormalement grosses ou exceptionnellement petites. Ces données indiquent, par ailleurs, que la croissance est dominante et limitante sur la prolifération. Cet éclairage nouveau des liens entre croissance cellulaire (augmentation de la masse) et prolifération (augmentation du nombre de cellules) conduit à réexaminer la vision de la morphogenèse et de la cancérogenèse en prêtant davantage d'attention à la dérégulation de la croissance plutôt qu'à celle du cycle cellulaire.

comme un synonyme de prolifération entraîne souvent une confusion entre deux processus qu'il est nécessaire de distinguer. Les cellules peuvent croître sans se diviser et des mutations qui bloquent le cycle cellulaire ne bloquent pas nécessairement la croissance. C'est ce que nous ont appris des expériences historiques sur la levure [1]. Chez les organismes multicellulaires, les neurones par exemple croissent sans se diviser. Inversement, les cellules peuvent quelquefois se diviser sans croître, c'est-à-dire sans augmentation totale de la masse cellulaire. Par exemple, dans de nombreux organismes, la cellule œuf se

divise en de très nombreuses cel-

lules plus petites tout en conservant

'utilisation fréquente du

terme « croissance cellulaire »

un volume total constant. Croissance et cycle cellulaires peuvent donc être contrôlés de manière indépendante.

Dans de nombreux systèmes, cependant, la croissance et la prolifération apparaissent coordonnées, et des observations relativement anciennes sur les micro-organismes et les cellules en culture suggèrent une hiérarchie entre croissance et division cellulaires. Les cellules doivent atteindre une taille minimale pour se diviser et, lorsqu'elles sont privées des constituants nécessaires à leur croissance tels que les facteurs de croissance, elles s'arrêtent de croître et de se diviser. Inversement, stimuler la progression du cycle cellulaire n'entraîne pas la croissance: la masse cellulaire sera seulement subdivisée en entités plus petites.

ADRESSES .

L. Perrin: Institut de génétique humaine, Cnrs-UPR 1142, 141, rue de la Cardonille, 34396 Montpellier Cedex 5, France. N. Arquier, M. Sémériva: Laboratoire de génétique et physiologie du développement, UMR 6545 Cnrs-Université, IBDM Cnrs-Inserm-Université de la Méditerranée, Campus de Luminy, Case 907, 13288 Marseille Cedex 09, France. L'analyse des relations entre croissance et prolifération a récemment été menée chez un eucaryote multicellulaire, la drosophile [2, 3]. Pendant les premières étapes du développement jusqu'à l'éclosion de la larve, l'œuf de drosophile est clivé séquentiellement en un nombre de plus en plus grand de cellules, partageant la cellule unique en environ 15 000 cellules plus petites tout en conservant la masse totale constante. L'embryogenèse aboutit à une larve qui se nourrit et augmente son volume d'environ 1000 fois. Cette augmentation de taille au niveau cellulaire s'effectue essentiellement de deux manières: les cellules larvaires vont augmenter de volume par 2 ou 3 ordres de grandeur et deviennent polyploïdes, c'est-à-dire que leur matériel génétique se réplique sans cytodiérèse. Ces tissus disparaîtront dans la pupe en s'engageant dans un programme de mort cellulaire appelé histolyse. Les autres tissus de la larve sont constitués de cellules diploïdes (histoblastes), qui se divisent pendant la vie larvaire, ne sont pas détruits pendant la pupaison et donneront les différents tissus de l'adulte (figure 1). Parmi ceux-ci, les disques imaginaux [4] constituent un très bon modèle pour l'étude de la croissance et de la prolifération au cours du développement. C'est, de plus, le modèle de croissance qui, chez la drosophile, se rapproche le plus de la situation trouvée chez les mammifères: la croissance s'effectue par mitoses successives conduisant à un plus grand nombre de cellules de même dimension que les cellules mères. Chaque disque imaginal est constitué d'un sac composé d'un épithélium monostratifié (figure 2). Le disque d'aile, composé d'une cinquantaine de cellules au moment de l'éclosion de l'embryon, voit sa taille s'accroître d'environ 1000 fois en masse et en nombre de cellules au cours de la vie larvaire. La différenciation a lieu ensuite dans la pupe. Bien que la morphologie du disque ne donne que peu d'informations sur les événements morphogénétiques complexes à venir, les événements moléculaires préfigurent déjà la morphogenèse pupale. Par exemple, au cours de la vie larvaire, l'expression localisée des molécules de signal Wingless (Wg) à la frontière dorso-ventrale et *Decapen*-

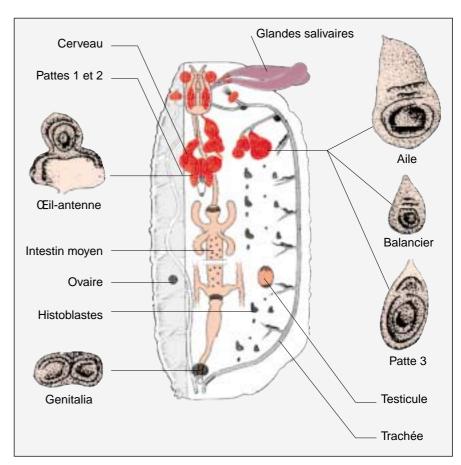


Figure 1. Origine larvaire des cellules adultes. Illustration schématique d'une larve de drosophile de 3º stade disséquée le long de sa ligne médiane ventrale et dont la partie droite a été étalée. En noir, les histoblastes et, en rouge, les disques imaginaux, cellules et tissus précurseurs des tissus et des organes adultes. Ces cellules sont diploïdes, se divisent pendant la vie larvaire et résistent à l'histolyse durant la pupaison. Toutes les autres cellules, les cellules dites larvaires, grandissent jusqu'à 1 000 fois pendant la vie larvaire, deviennent polyploïdes (environ 10 réplications de leur ADN sans division cellulaire) et sont éliminées par histolyse pendant la pupaison (0,5mm de long pour l'embryon jusqu'à près de 5mm pour une larve de 3º stade). De chaque côté de la larve, sont dessinés quelques-uns des disques imaginaux qui donneront les principaux appendices de l'adulte: œil, antenne, aile, balancier, patte et genitalia (précurseurs des ovaires pour les femelles et des testicules pour les mâles).

taplegic (Dpp) à la frontière antéropostérieure, donne une information spatiale au sein du disque (figure 2). Ces molécules, qui agissent en gradient, conduisent à l'expression localisée de gènes agissant en aval et dont le profil d'expression représente une carte spatio-temporelle des processus de détermination cellulaire durant le développement du disque [5].

A la lumière des récents travaux réalisés chez la drosophile sur le couplage-découplage entre prolifération et croissance cellulaires (pour revue, *voir* [6-8]), nous avons voulu souli-

gner ici les changements que ces découvertes impliquent sur notre vision de la morphogenèse et de la cancérogenèse.

Croissance cellulaire et prolifération

Chaque division cellulaire est constituée d'une phase de réplication (phase S) et de la mitose (phase M) précédées, respectivement, des phases G1 et G2 au cours desquelles interviennent l'essentiel des mécanismes de contrôle de la progression

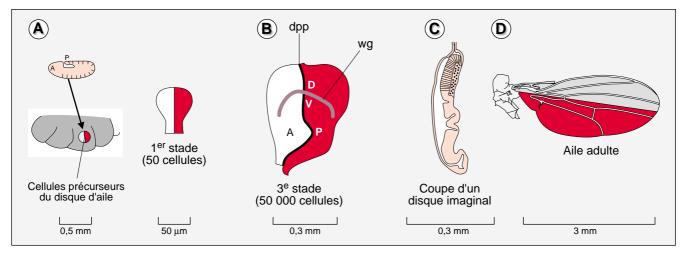


Figure 2. **Développement du disque d'aile. A.** Les cellules des disques imaginaux s'invaginent à partir de l'ectoderme embryonnaire à 9 heures de développement, subissent quelques divisions, puis ne se divisent plus jusqu'au 1^{er} stade larvaire (l'encart montre un agrandissement des cellules précurseurs du disque d'aile au stade embryonnaire). À ce stade, elles sont au nombre de 50 et vont se diviser une dizaine de fois pour donner les 50 000 cellules du disque d'aile de 3^e stade larvaire (B). **B.** Les régions d'expression des morphogènes dpp et wg délimitent respectivement les compartiments antéro-postérieur (A/P) et dorso-ventral (D/V). **C.** Coupe d'un disque d'aile. C'est un épithélium monostratifié formant un sac attaché à la cuticule par son extrémité. À la fin du 3^e stade larvaire, les cellules du disque cessent de se diviser. Dans la pupe, l'épithélium subit une morphogenèse qui donnera l'aile adulte (**D**). Le compartiment postérieur est coloré en rouge.

dans le cycle dont les acteurs principaux sont les cyclines, leurs kinases et les inhibiteurs de ces kinases. Dans les cellules en culture, l'inhibition de la croissance cellulaire par appauvrissement du milieu, provoque un arrêt de la prolifération en phase G1. L'ajout de sérum déclenche alors croissance et prolifération de façon coordonnée [9]. Cette simple observation est déjà suggestive d'une hiérarchie entre croissance et prolifération, dans laquelle la croissance est en amont de la prolifération.

Chez la levure, les études pionnières menées par Hartwell et al. [10] et Nurse et al. [11] ont identifié des mutants de prolifération de deux classes. Un premier groupe de mutations bloque la progression dans le cycle tout en permettant la croissance cellulaire, alors que des mutations dans l'autre groupe arrêtent croissance et prolifération de manière coordonnée en phase G1. Les mutations de la première classe sont maintenant connues pour affecter le contrôle du cycle cellulaire, alors que celles de la deuxième classe affectent le potentiel de biosynthèse de la cellule. Chez la levure donc, croissance et prolifération sont deux mécanismes distincts mais généralement couplés, la croissance étant dominante et limitante par rapport à la prolifération [1].

Chez les eucaryotes supérieurs, le développement de la plupart des organismes s'accompagne d'une augmentation importante de la masse associée de manière coordonnée à une augmentation du nombre de cellules. Une telle coordination permet aux cellules de garder une taille constante, et aux tissus en développement d'atteindre une taille et une densité cellulaire appropriées. Comment les processus distincts d'accumulation de la masse et de la progression dans le cycle sont-ils coordonnés dans ces organismes? Deux études récentes [2, 3] s'intéressent à cette question au cours du

développement du disque d'aile. Elles s'appuient, d'une part, sur l'existence chez la drosophile de mutations dans des gènes intervenant dans la progression du cycle cellulaire et, d'autre part, sur des outils spécifiques de la drosophile. Par exemple, il est possible d'induire l'expression sélective d'un gène dans un territoire spécifique (figure 3) ou bien encore de créer, par recombinaison mitotique, des clones de cellules mutantes homozygotes pour ces acteurs du cycle cellulaire, dans un environnement de type sauvage (figure 4).

Weigmann et al. [2] ont utilisé un allèle thermosensible du gène cdc2, qui code pour une kinase essentielle pour la mitose. En inhibant l'activité de cdc2 par passage à une température restrictive relativement tard dans le développement de manière à ne bloquer que les dernières divisions cellulaires, on ne bloque pas le développement du disque imaginal. Les disques ainsi produits sont de taille et de forme normales, mais sont constitués de cellules moins nombreuses et plus grosses comparées à celles des disques normaux. Au niveau moléculaire, l'expression de *dpp* et celle de ses gènes cibles apparaît, elle aussi, normale. Cela indique donc, d'une part, que l'augmentation de la taille des cellules dans les disques mutants pour cdc2 compense la diminution du nombre de cellules, gardant ainsi constant le volume global du disque, d'autre part, que les signaux qui dirigent la détermination cellulaire au sein du disque sont, dans ce contexte, interprétés de façon appropriée.

De manière peut-être encore plus convaincante, les mêmes auteurs [2] ont observé des disques dans lesquels la fonction de cdc2 a été inhibée seulement dans un compartiment du disque, l'autre possédant la fonction de cdc2 normale. Chaque comparti-

m/s n° 10, vol. 15, octobre 99

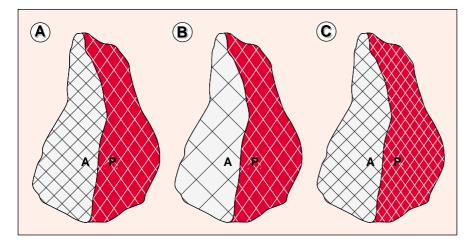


Figure 3. Inhiber ou stimuler la prolifération ne modifie pas la croissance des disques imaginaux. Dans ces expériences, des régulateurs du cycle cellulaire sont exprimés dans le compartiment postérieur du disque d'aile (rouge). A. Disque imaginal d'aile de larve mûre sauvage. Les cellules des deux compartiments, représentées par le quadrillage, sont de même taille. B. Disque imaginal d'aile mutant pour un régulateur du cycle cellulaire (cdc2) dans lequel le gène cdc2 fonctionnel a été exprimé uniquement dans le compartiment postérieur. La vitesse de division des cellules du compartiment antérieur a été ralentie du fait de la mutation dans le gène cdc2. Elles ont cependant continué de croître et sont plus grosses que les cellules du compartiment antérieur où la fonction de cdc2 a été rétablie. La forme et la taille du disque ne sont pas affectées. C. Disque imaginal d'aile de larve mûre de type sauvage où E2F, un activateur du cycle cellulaire, a été surexprimé uniquement dans le compartiment postérieur. Les cellules y sont alors plus nombreuses et plus petites que dans le compartiment antérieur. Dans ce cas aussi, la taille et la forme du disque sont normales. (D'après [2, 3].)

ment est constitué d'une population de cellules dont la croissance et la prolifération sont distinctes de l'autre compartiment, fournissant un moyen intrinsèque de comparer deux populations cellulaires au sein du même disque. Pour cela, ils ont utilisé un système permettant d'induire l'expression du gène étudié spécifiquement dans un des deux compartiments. La protéine CDC2 fonctionnelle a été exprimée uniquement dans le compartiment postérieur, au sein d'un disque mutant pour cdc2. La fonction de cdc2 est donc restituée dans la partie postérieure du disque où les cellules peuvent se diviser normalement, la partie antérieure restant mutante pour cdc2 (figure 3). Les cellules sont alors plus grosses et moins nombreuses dans le compartiment antérieur mais le disque dans son ensemble présente cependant, comme dans l'expérience précédente, une taille et une morphologie normales [2].

Dans une expérience réciproque [3], la surexpression d'un régulateur positif du cycle, E2F, dans un disque de type sauvage par ailleurs, conduit à une accélération du cycle cellulaire. Cette augmentation de la prolifération engendre des cellules plus nombreuses bien que de taille réduite mais le compartiment postérieur, où est surexprimé E2F, conserve des dimensions et une morphologie normales (figure 3). Dans d'autres séries d'expériences [2, 3], des clones de cellules dépourvues de la fonction de régulateurs positifs du cycle tels que cdc2 [2] et cdc25 ou E2F [3] ont été créés par recombinaison mitotique (figure 4). En l'absence, par exemple, de la fonction de cdc25 (arrêt du cycle cellulaire en phase G2) ou bien en l'absence de la fonction de E2F (arrêt du cycle en phase G1), les cellules sont capables de croître. Elles se divisent un petit nombre de fois (probablement à cause de la persistance de la protéine ou de l'ARN messager) mais accroissent leur taille (figure 5).

Ces résultats indiquent donc que la croissance cellulaire, chez la drosophile, est réglée indépendamment de la prolifération. Comment ces deux processus sont-ils coordonnés au sein du disque en développement? La croissance agit-elle, comme chez la levure, de manière dominante en amont de la prolifération? Si tel est le cas, les mutants qui affectent la croissance cellulaire doivent ralentir la prolifération sans affecter la taille cellulaire. De fait, des mutations de perte de fonction dans les gènes Minute codant pour des protéines ribosomiques qui participent donc à la machinerie de biosynthèse, ralentissent la croissance et la prolifération de façon coordonnée, sans affecter la taille cellulaire [12]. C'est également le cas des mutants du gène thickveins (tkv), qui code pour un des récepteurs de Dpp, chez lesquels les deux processus sont ralentis sans modification de la taille des cellules (figure 5). D'autres résultats confirment ce paradigme. Par exemple, la perte de fonction du gène pitchoune (pit), qui code pour une ARN-hélicase nucléolaire, inhibe la croissance et la prolifération de façon coordonnée et, à l'opposé, sa surexpression au sein du disque d'aile induit croissance et prolifération [13]. De même, la perte de fonction du gène modulo (mod), qui code pour une protéine nucléolaire se liant à l'ARN [14, 15], engendre des défauts de croissance sévères alors que sa surexpression induit croissance et prolifération.

Coordination de la croissance et de la prolifération

Les mutations qui affectent la synthèse protéique engendrent des défauts de croissance. C'est le cas des mutations Minute, mais aussi de celles affectant les ARN ribosomiques (mutations bobbed et mini) [16]. La capacité d'une cellule de croître dépend donc de son potentiel de synthèse protéique. Ainsi les mécanismes de contrôle de la croissance doivent-ils agir sur ce métabolisme de base. Chez les métazoaires, eucaryotes pluricellulaires, chaque cellule reçoit des informations de son voisinage: croissance et prolifération sont réglées par l'intermédiaire de

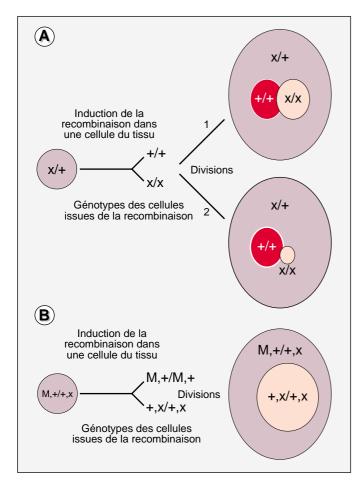


Figure 4. Création de mosaïques génétiques par recombinaison mitotique. A. Le principe de la recombinaison mitotique est d'induire des remaniements chromosomiques qui aboutissent à l'échange de parties de chromatides homologues. À partir de cette recombinaison, on peut obtenir deux cellules de génotypes différents de celui de la cellule mère. Si cette dernière est hétérozygote pour une mutation (x),elle donnera naissance après division à une cellule homozygote pour l'allèle mutant (x/x) et à une

cellule homozygote pour l'allèle sauvage (+/+). Chacune de ces deux cellules filles va se diviser et former, respectivement, un clone de cellules homozygotes mutantes (x/x) et un contre-clone, composé de cellules homozygotes pour l'allèle sauvage (+/+). Si la viabilité et la vitesse de prolifération des cellules des deux génotypes différents sont les mêmes, des clones contenant le même nombre de cellules seront obtenus pour le clone mutant ou le contreclone (cas 1). En revanche, si la viabilité ou la prolifération cellulaires sont affectées pour les cellules mutantes, celles-ci seront défavorisées et finalement éliminées. On obtiendra alors un clone de taille réduite contenant moins de cellules que le contre-clone de type sauvage (cas 2), voire pas de clone du tout. B. On peut étudier le comportement de cellules mutantes dans un environnement génétique Minute. Les mutations Minute sont des mutations haplo-insuffisantes qui touchent des composants nécessaires à la synthèse protéique et donc la croissance. Les cellules hétérozygotes pour une mutation Minute croissent plus lentement que les cellules de type sauvage et les cellules homozygotes pour une mutation Minute (M/M) ne sont pas viables et ne se divisent pas. L'induction d'une recombinaison mitotique dans un environnement hétérozygote (M,+/+,x) conduit à la formation de clones mutants pour le gène étudié (x/x) de taille plus importante que dans le cas (A) car la croissance des cellules mutantes est maintenant favorisée vis-à-vis des cellules environnantes. Chaque cellule représente un tissu composé de plusieurs cellules.

signaux extrinsèques, les facteurs de croissance, encore appelés mitogènes. Cette double dénomination illustre la confusion existant entre croissance et prolifération. Long-

temps considérées comme des activateurs du cycle cellulaire, des études récentes montrent que ces molécules ont la capacité d'activer directement la traduction et donc la croissance. Un grand nombre de facteurs de croissance conduisent à l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et à la synthèse de l'inositol triphosphate (IP3) (figure 6). La voie de signalisation dépendante de l'IP3 induit, entre autres, la phosphorylation de la p70S6k qui active alors la protéine ribosomique S6 dont le rôle est central dans l'activité du ribosome vis-à-vis de la traduction [17-19]. L'activation de la PI3K conduit aussi à la phosphorylation de 4EBP1, un régulateur négatif du facteur de déclenchement de la traduction eIF4E. 4EBP1 se dissocie alors de eIF4E et lève donc l'inhibition. Cette voie de signalisation est inhibée spécifiquement par une molécule, la rapamycine, utilisée pour ses propriétés inhibitrices de la croissance et de la prolifération et qui agit donc directement sur la traduction [20]. Notons aussi que eIF4E est lui-même activé par phosphorylation en réponse à de nombreux stimulus extérieurs et par différentes voies de signalisation [21].

Par ailleurs, l'expression du facteur de transcription Myc est associée à la prolifération dans de nombreux types cellulaires. L'ARN messager de Myc est soumis à un turn-over rapide et son expression est induite par des facteurs de croissance [6]. $\hat{M}yc$ est connu pour ses propriétés oncogéniques: sa surexpression dans des cellules quiescentes a une action transformante, provoquant une activation de la croissance et de la prolifération. A l'inverse, son inactivation dans des fibroblastes murins entraîne un ralentissement coordonné de la croissance et de la prolifération. Myc semble donc intervenir plutôt sur la croissance. Parmi les gènes dont l'expression est activée par Myc, nombreux sont ceux qui se trouvent impliqués dans la croissance cellulaire ou son contrôle, comme, chez les mammifères, eIF4E, ou MrDb, qui code pour une ARN-hélicase homologue de Pit (voir plus haut). Chez la drosophile, la seule cible connue est *pit* lui-même [13]. L'hypothèse selon laquelle Myc est un régulateur de la croissance agissant sur la synthèse protéique est renforcée par l'observation que des mutants hypomorphes de Myc chez la drosophile ont des défauts de croissance sévères et un phénotype semblable à celui des mutants Minute

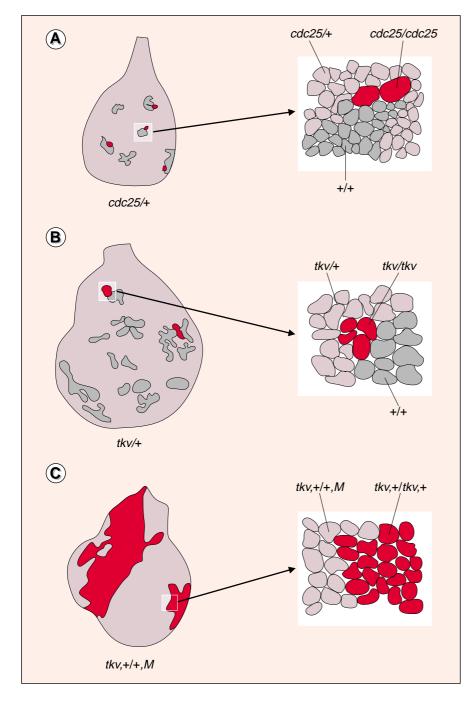


Figure 5. On peut différencier l'effet d'une mutation sur la croissance ou sur la prolifération en examinant des clones mutants induits par recombinaison mitotique. Des clones de cellules mutantes pour cdc25 (string), une cycline phosphatase, ou pour thickveins, un récepteur de Dpp, ont été produits par recombinaison mitotique et sont analysés dans des disques imaginaux d'aile. Les cellules homozygotes pour l'allèle mutant (rouge) peuvent être repérées grâce à un marqueur clonal, ainsi que les cellules homozygotes pour l'allèle sauvage (gris). Le fond génétique du disque est constitué de cellules hétérozygotes pour l'allèle mutant (bistre). A. Exemple de clone de cellules mutantes pour cdc25. Les cellules dépourvues de la fonction de string (cdc25) ne se sont divisées qu'une fois alors que les cellules sauvages du contre-clone (gris) se sont divisées plusieurs fois. Les cellules mutantes sont cependant plus grandes que les cellules de type sauvage du contre-clone. Des mutations dans le gène cdc25 inhibent donc la progression du cycle cellulaire. (D'après [3].) B. Exemple de clone de cellules mutantes pour thickveins. Les cellules dépourvues de la fonction thickveins forment des clones de très petite taille (rouge). Ils sont plus petits que les contre-clones de cellules de type sauvage homozygotes (gris). Les cellules tkv ont cependant la même taille que les cellules de type sauvage, contrairement à ce qui est observé en (A) pour un régulateur du cycle cellulaire. Les cellules tkv⁻ sont défavorisées dans leur croissance par rapport aux cellules normales, prolifèrent donc moins vite et sont même souvent éliminées. (D'après [26].) C. Exemple de clone de cellules mutantes pour thickveins dans un contexte génétique Minute. On observe dans ce cas des clones de cellules mutantes pour tkv de grande taille (rouge). Les cellules mutantes tkv ne sont plus défavorisées par rapport aux cellules hétéro-

zygotes pour l'allèle mutant tkv (bistre) qui portent aussi la mutation Minute et croissent donc plus lentement. Les cellules mutantes ont la même taille que les cellules environnantes. Ces caractéristiques indiquent que les mutations tkv affectent la croissance et non le cycle cellulaire. (D'après [26].)

[22]. D'autres observations montrent que Myc ne peut supplanter le contrôle de la taille pour l'entrée en phase S et est incapable d'accélérer la prolifération de cellules qui se divisent déjà rapidement [23].

Il apparaît donc que les facteurs de croissance ont la capacité d'activer la croissance cellulaire par leur action sur la traduction. Comment, à partir de là, est induite la prolifération? Chez la levure, un mécanisme contrôlant la progression dans le cycle par le taux de croissance a été mis en évidence. La cycline Cln3, nécessaire à la transition G1/S, est réglée au niveau traductionnel, et une inhibition de la traduction, même faible, provoque

une diminution disproportionnée de la concentration cellulaire de Cln3. Polymenis *et al.* [24] ont montré que la traduction de Cln3 dépend directement de la concentration cellulaire de ribosomes, par un mécanisme faisant intervenir un petit cadre de lecture (uORF) localisé dans la partie 5' de son messager. Tant que la concentra-

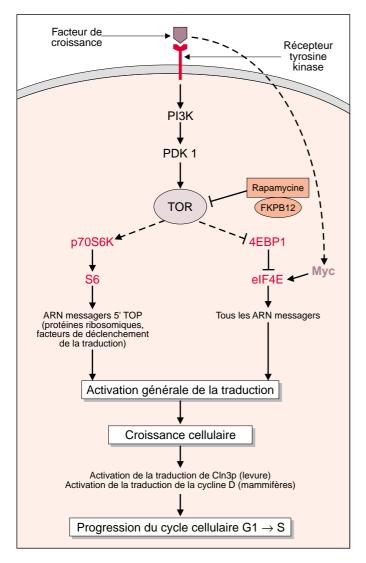


Figure 6. L'activation de déclenchement de la traduction par des facteurs de croissance. La PI3-kinase (PI3K) est activée par phosphorylation consécutivement à la fixation du ligand (facteur de croissance mitogène) sur son récepteur tyrosine kinase. La activée PI3K phosphoryle le phosphatidylinositol diphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol triphosphate (PIP3), qui active indirectement TOR, une kinase cible de l'inhibiteur de croissance cellulaire, la rapamycine. TOR règle la traduction par deux voies de signalisation distinctes. Elle active la kinase p70S6 (p70S6K) qui phospho-

ryle la protéine ribosomique S6. Une fois phosphorylée, S6 permet à son tour d'activer le démarrage de la traduction des ARN messagers «5'TOP» qui codent pour les protéines ribosomiques et les facteurs du déclenchement de la traduction. Par ailleurs, l'activité kinase de TOR permet de lever l'inhibition de elF4E provoquée par la fixation de 4EBP1. elF4E est essentiel pour le déclenchement de la traduction de tous les ARN messagers. L'activation de la traduction peut aussi s'effectuer par Myc grâce à sa qualité de facteur de transcription de elF4E. Enfin, la traduction de la cycline 3 phosphorylée (Cln3P) chez la levure permet la progression du cycle cellulaire de la phase G1 en phase S (23) (une ligne en pointillé indique un lien dont les partenaires n'ont pas encore été identifiés. Une flèche indique une activation, une barre une répression). (D'après [47].)

tion cellulaire de ribosomes est insuffisante, la cycline n'est pas traduite. L'élimination de l'uORF réduit la sensibilité de Cln3 à l'inhibition traductionnelle et conduit à une augmentation de la prolifération indépendante de la croissance, produisant alors des cellules de taille réduite.

Quelques données suggèrent que chez les métazoaires existe aussi un mécanisme permettant de régler le cycle cellulaire par la vitesse de croissance. C'est en particulier le cas de la cycline D, qui joue un rôle semblable à celui de la cycline Cln3 au cours de la transition G1/S et qui semble être

réglée au niveau de sa traduction. Son expression est augmentée après surexpression de eIF4E. Sa traduction est par ailleurs contrôlée *via* la voie de signalisation de la PI3K et inhibée par la rapamycine (*figure 6*), suggérant un contrôle de son activité par 4EBP1 et/ou RPS6 [25].

Chez la drosophile comme chez la levure, la croissance cellulaire est donc dominante et limitante par rapport à la prolifération. Il est sans doute nécessaire de réévaluer, à la lumière de ces nouvelles données, des processus tels que le développement ou la cancérogenèse, dans lesquels le contrôle de la prolifération cellulaire semble jouer un rôle fondamental.

Croissance et morphogenèse

Chaque disque imaginal a une taille et une forme distinctes (figure 1), indiquant que sa croissance a été réglée avant sa morphogenèse finale qui se produira dans la pupe et aboutira aux structures adultes. De fait, dans le disque d'aile, Wg et Dpp sont nécessaires à la croissance et à la prolifération. Leur perte de fonction conduit à un défaut de croissance de l'aile et, à l'opposé, leur expression ectopique au cours de la vie larvaire engendre des duplications de structures. Les expériences de Weigmann et al. [2] et Neufeld et al. [3] suggèrent que ces molécules ne contrôlent pas directement les régulateurs du cycle cellulaire. De plus, il n'existe pas de corrélation entre le profil de prolifération des disques et les zones d'expression des molécules de signalisation. En effet, bien que wg et dpp soient exprimés de façon localisée et agissent en gradient, la prolifération est uniforme dans l'ensemble du disque tout au long du développement larvaire [5, 26].

Puisque dans ces tissus prolifératifs la croissance est dominante et limitante par rapport à la prolifération, le contrôle de la morphogenèse du disque doit plutôt dépendre de mécanismes contrôlant directement la croissance cellulaire. Le pouvoir mitogène de Wg et Dpp ne serait qu'un effet secondaire dû au couplage entre croissance et prolifération. Il est important de noter que, chez les vertébrés, les gènes qui contrôlent la morphogenèse des membres appar-







Figure 7. Exemple de disques imaginaux tumoraux. Des coupes de disques imaginaux d'aile de larve de troisième stade sont présentées ici. A. Larve de type sauvage. B. Larve homozygote pour un allèle muté dans le gène fat qui code pour une cadhérine non conventionnelle. Des mutants dans le gène fat développent une hyperplasie des disques dont les cellules ne cessent de proliférer mais gardent leur caractère épithélial. **C**. Larve homozygote pour un allèle muté dans le gène lethal(2)giant larvae (I(2)gl). L'homozygotie pour une mutation dans ce gène conduit à des néoplasmes au niveau des disques imaginaux. L'arrêt de la prolifération en fin de troisième stade larvaire ne se produit pas et les cellules mutantes ont perdu leur caractère épithélial. (D'après [33].)

tiennent à la famille de gènes homologues de *dpp* et *wg* de drosophile, respectivement *BMP* et *WNT*.

L'analyse de la perte de fonction du gène the confirme cette hypothèse: en effet, les clones composés de cellules homozygotes pour un allèle mutant de tkv, induits par recombinaison mitotique, montrent un défaut de croissance et de prolifération. Les cellules homozygotes mutantes prolifèrent plus lentement que les cellules non mutantes, sont défavorisées et, dans la majorité des cas, éliminées par compétition. On n'observe donc pas de clones ou uniquement des clones de très petite taille comparés à leur contre-clone respectif [26, 27]. En revanche, en donnant un avantage de croissance aux cellules homozygotes pour l'allèle mutant, par le biais d'une induction clonale en contexte génétique Minute (voir figure 4), des clones de grande taille sont obtenus (figure *5B*, *5C*) [27]. Cela indique que l'inactivation de la voie de signalisation Dpp n'affecte la prolifération que secondairement, par un défaut primaire de leur potentiel de croissance cellulaire.

Comment Wg et Dpp contrôlent-ils la croissance cellulaire? Peu de cibles de leurs voies de signalisation ont pour l'heure été identifiées chez la drosophile, mais l'analyse de leurs homologues vertébrés indique qu'ils pourraient effectivement agir directement sur la croissance cellulaire. D'une part, Sluzarski *et al.* [28] ont montré que WNT1 (l'homologue vertébré de Wg) est capable d'induire la formation d'IP3 *via* son association avec l'un de ses récepteurs, la protéine Frizzled. D'autre part, une étude récente indique que *c-myc* est une cible directe du facteur de transcription Tcf-4 dont l'activité est réglée par la voie de signalisation dépendante de WNT1 [29].

Comme pour les membres des vertébrés, les disques imaginaux de drosophile sont soumis à un contrôle strict de l'arrêt de leur croissance, assurant la symétrie bilatérale des différents appendices. Puisque la modification du nombre de cellules au sein du disque n'affecte pas sa taille ni sa morphologie finale, l'hypothèse d'un contrôle de la taille de l'organe par un mécanisme de comptage de cellules est peu probable. En revanche, il semblerait que l'acquisition de la taille finale des disques imaginaux dépende des mécanismes mêmes du contrôle de leur croissance. C'est ce que suggère l'analyse de mutations conduisant à une hyperprolifération des cellules imaginales qui n'arrêtent pas de croître en fin de vie larvaire. En effet, comme nous le verrons au paragraphe suivant, ces mutations affectent des gènes suppresseurs de tumeurs qui se révèlent participer au contrôle de la croissance.

Cependant, les mêmes morphogènes qui assurent donc la croissance de l'ensemble d'un tissu, peuvent, dans certains cas, agir comme des régulateurs du cycle cellulaire et provoquer l'arrêt des divisions cellulaires et donc de la croissance de manière très précise dans des territoires spécifigues. Par exemple, les cellules de la frontière dorso-ventrale du disque imaginal d'aile expriment Wg. Elles donneront les cellules de la bordure de l'aile qui comprennent une rangée d'organes mécano-sensoriels. Dans ces cellules, Wg bloque le cycle cellulaire en phase G1 dans les cellules dans lesquelles il est exprimé, et en phase G2 dans les cellules adjacentes qui reçoivent son signal. A cet endroit, Wg active l'expression des facteurs de transcription pro-neuraux Achaete et Scute, qui à leur tour inhibent le facteur de progression du cycle String (CDC25) [30]. De

même, Dpp provoque l'arrêt en G1 des cellules précurseurs des photorécepteurs dans une rangée de cellules du sillon morphogénétique du disque imaginal d'œil [31].

Enfin, une observation de Neufeld et al. [3] apparaît contredire la généralisation d'un contrôle de la croissance indépendant de la prolifération. Quand E2F, Dp (le partenaire de E2F dans un facteur de transcription hétérodimérique) et l'inhibiteur d'apoptose P35 sont conjointement surexprimés dans le compartiment postérieur du disque, les cellules n'arrêtent pas leur croissance, entraînant une dysplasie au sein du disque. La surexpression de régulateurs du cycle apparaît donc retentir sur la croissance. Cependant, E2F n'active pas seulement la transcription des cyclines, mais aussi, entre autres, celle de myc dont nous avons précédemment noté les liens avec le contrôle de la croissance cellulaire. E2F pourrait donc être une composante charnière entre croissance et prolifération. Cette dernière expérience illustre aussi l'importance de l'apoptose dans le contrôle de la taille des appendices

Gènes suppresseurs de tumeurs chez la drosophile et croissance: le paradoxe

chez la drosophile puisque des clones

de cellules co-exprimant E2F et Dp,

mais pas p35 ne montrent pas ce phé-

notype hyperplasique.

Les observations précédentes montrent que le moyen le plus sûr de provoquer une hyperprolifération, telle que celle observée dans les cancers, est de dérégler la croissance plutôt que le cycle cellulaire. La masse tissulaire ne peut être augmentée en affectant directement un régulateur négatif du cycle cellulaire ou en surproduisant un régulateur positif. Cette notion a déjà été évoquée pour expliquer l'origine de la formation de tumeurs consécutives à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs chez les mammifères [32].

Que peut nous apporter la drosophile par rapport à cette question? Les travaux historiques d'Elizabeth Gateff en 1969 [33] ont montré l'existence de cancers chez la drosophile dont les caractéristiques s'apparentent à celles observées chez les mammifères. Comme chez les vertébrés, les néoplasmes malins de drosophile sont caractérisés par leur croissance cellulaire autonome, la létalité de l'hôte lorsqu'ils sont transplantés, et la perte de la structure des tissus affectés et de leurs fonctions cellulaires [34]. On observe aussi chez la drosophile des néoplasmes bénins, forme moins prononcée de transformation oncogénique; les caractères d'envahissement après transplantation y sont absents. Ces travaux ont par ailleurs établi que, dans un organisme entier, des mutations récessives peuvent, à l'état homozygote, être à l'origine des cancers, illustrant la notion de gènes dits suppresseurs de tumeurs et confirmant leur existence. Gateff a identifié une trentaine de ces mutations [35]. Les tumeurs n'y sont cependant retrouvées que dans un ou quelques tissus, en dépit de l'homozygotie de l'animal entier. Les tissus affectés font partie de ceux qui sont encore capables de proliférer pendant le développement larvaire: le cerveau, les disques imaginaux (précurseurs des structures adultes), les tissus hématopoïétiques et la lignée germinale. La figure 6 illustre des exemples de tumeurs observées au niveau des disques imaginaux. L'intérêt d'étudier la cancérogenèse chez cet insecte, outre la similitude de phénotype tumoral, paraît évidente: elle peut être étudiée facilement sur un organisme entier et la versatilité de l'approche génétique possible avec la drosophile ouvre un domaine d'expérimentation très vaste. La déception de réaliser que, pour l'instant, aucun des homologues des gènes suppresseurs de tumeurs chez la drosophile n'a été impliqué dans la cancérogenèse chez les vertébrés est certainement compensée par des découvertes touchant plus aux mécanismes mêmes de la cancérogenèse qu'aux acteurs y participant directement.

acteurs y participant directement. Aujourd'hui, une cinquantaine de gènes suppresseurs de tumeurs a été caractérisée chez la drosophile [36, 37], dont une liste non exhaustive a été dressée dans le *Tableau I*. Ils codent pour des protéines de fonctions très variées: protéines associées au cytosquelette, protéines membranaires impliquées dans l'adhérence cellulaire, protéines ribosomiques et/ou affines de l'ARN, protéines

nucléaires réglant la structure de la chromatine, kinases, etc. Le seul oncogène identifié chez la drosophile correspond à une mutation dominante (*Tum'*) dans le gène *hopscotch* (Janus kinase de la voie JAK/STAT) et s'apparente donc aux mutations transformantes trouvées chez les oncogènes [38].

L'étude des phénotypes associés à la perte de fonction de la très large majorité de ces gènes nous conduit aux conclusions générales suivantes: (1) de manière surprenante, les gènes suppresseurs de tumeurs semblent intervenir de façon positive dans la croissance cellulaire. Certains d'entre eux codent même pour des acteurs directs de la machinerie biosynthétique, tels que des protéines ribosomiques. Un seul d'entre eux, warts/lats, code pour une protéine qui semble être directement impliquée dans la régulation du cycle cellulaire [39]; (2) cette dérégulation négative de la croissance conduit pourtant à des cancers qui se développent au niveau de quelques tissus, chez des animaux qui possèdent les deux copies du gène inactivé.

Nous illustrerons ces conclusions en développant seulement quelques exemples.

Le gène lethal(2)giant larvae

Dans des larves homozygotes pour une mutation de perte de fonction totale du gène lethal(2)giant larvae (l(2)gl), on observe des néoplasmes au niveau des neuroblastes optiques du cerveau et au niveau des disques imaginaux. Lorsque ces tissus sont transplantés dans la cavité abdominale d'un hôte de type sauvage, ils continuent à proliférer de manière autonome, envahissent l'hôte et finissent par le tuer. En fait, les cellules mutantes prolifèrent moins vite que les cellules de type sauvage. Le phénotype d'hyperprolifération n'est observé que parce que les larves ont une vie prolongée du fait de leur incapacité à arrêter la croissance et donc la prolifération des cellules imaginales. Elles ne forment pas la pupe et donc ne déclenchent pas le programme de mort cellulaire des tissus larvaires ou histolyse. Il faut cependant remarquer que l'histolyse ne touche que les tissus larvaires polyploïdes, incapables de se diviser, ce qui n'est le cas ni des disques imaginaux, ni des neuroblastes, qui engendrent les tissus de l'adulte en échappant à l'histolyse. Il existe d'ailleurs une mutation hypomorphe*, $l(2)gl^{ls3}$, qui ne produit ni larves géantes, ni tumeurs, essentiellement parce que les larves entrent en pupaison au moment adéquat. Si, en revanche, on retarde artificiellement la pupaison

* Hypomorphe: perte partielle de fonction.

– en utilisant une mutation dans un gène responsable de la production de l'hormone de mue, l'ecdysone – on est capable alors de mettre en évidence le phénotype tumoral au niveau des disques imaginaux [40]. Revenons au phénotype des larves portant un allèle de perte totale de fonction du gène l(2)gl. En fait, à âge égal, les larves mutantes sont plus petites, montrent un retard de croissance et possèdent des disques imaginaux plus petits. Cela constitue la première indication d'un défaut de

croissance associé à la mutation. Cette observation est renforcée par l'analyse du comportement de clones somatiques homozygotes pour l'allèle de perte de fonction. On a, dans ce cas, la possibilité de comparer la croissance et la vitesse de prolifération des cellules mutantes et des cellules de type sauvage (ou hétérozygote) environnantes. La taille des clones est toujours très petite et le nombre de cellules le composant est faible (par au moins deux ordres de grandeur) comparé à celui formant

Tableau I GÈNES SUPPRESSEURS DE TUMEURS CHEZ LA DROSOPHILE			
Molécules d'adhérence	fat ^a	motifs cadhérine	tous les disques imaginaux
Molécules associées au cytosquelette	expanded (ex)ª	protéine type protéine 4.1 (schwannomine)	disque imaginal d'aile, de patte et d'antenne
	lethal(1)disc large (dlg1)		tous les disques imaginaux
	lethal(2)giant larvae (l(2)gl)ª	association à la myosine non musculaire	tous les disques imaginaux, cellules mères des ganglions et les neuroblastes des centres optiques de la larve
Protéines ribosomiques et affines de l'ARN	abnormal immune response (air8)ª	protéine ribosomique S6	cellules hématopoïétiques
	modulo (mod) ^b RPS21 °	motifs RRM protéine ribosomique S21	cellules hématopoïétiques cellules hématopoïétiques et disques imaginaux
Molécules réglant la structure de la chromatine	lethal(3)malignant brain tumor (mbt) ª	motifs MBT	tous les disques imaginaux, cellules mères des ganglions et les neuroblastes des centres optiques de la larv
	multi-sex comb (MXC)ª additional-sex comb	famille La <i>(lupus autoantigen)</i> (<i>ASX</i>) ^a nouvelle protéine	cellules hématopoïétiques disque imaginal d'œil-antenne
Kinases	lethal(3) discs overgrown (dco) ^a	caséine kinase I	tous les disques imaginaux
	warts/lats ^a	kinase à SER/THR	tous les disques imaginaux
Divers	hyperplastic discs (hyd)ª	ligase à l'ubiquitine	tous les disques imaginaux et les cellules de la lignée germinale
	tumoral imaginal discs	protéine chaperone	tous les disques imaginaux
	lethal(3)malignant neoplasm (mbn)ª	nouvelle protéine	cellules hématopoïétiques
	ovarian tumors (otu)ª	nouvelle protéine	cystocystes (cellules ovariennes germinales)

^a D'après [36]; ^b d'après [13, 14]; ^c d'après [43].

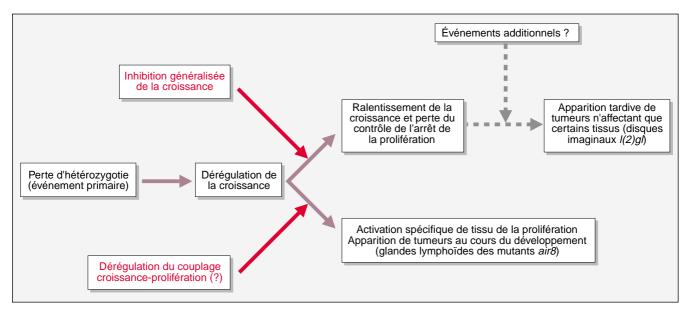


Figure 8. Modèle potentiel de cancérogenèse provoquée par l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs chez la drosophile.

le contre-clone fait de cellules de type sauvage. Par ailleurs, la taille des cellules à l'intérieur du clone n'est pas différente de celles de type sauvage de manière significative. De plus, elles ne montrent aucun signe de néoplasie et sont morphologiquement indiscernables des cellules de type sauvage. Ce résultat signifie que les cellules mutantes prolifèrent moins vite et, puisque leur taille n'est pas affectée, que c'est leur croissance qui est modifiée et non pas directement leur cycle cellulaire. Il apparaît clairement ici que l'inactivation du gène ne conduit pas directement à un phénotype d'hyperprolifération non contrôlée et que ce phénotype n'est que secondaire: il nécessite d'autres événements ultérieurs pour se manifester. On rejoint ainsi le paradigme observé dans les cellules cancéreuses de mammifères dans lesquelles plusieurs mutations doivent agir en synergie pour que le phénotype tumoral se manifeste.

Enfin, nous avons récemment observé, que le gène l(2)gl était nécessaire à la transmission du signal Dpp, un homologue de TGF β chez la drosophile, qui se comporte chez cet insecte comme un facteur de croissance. Ces différentes données suggèrent fortement que la fonction cellulaire primaire de l(2)gl est nécessaire, de manière positive, à la croissance cellulaire.

Gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes

Une catégorie étonnante de gènes suppresseurs de tumeurs chez la drosophile est constituée par un groupe de gènes impliqués dans la machinerie de biosynthèse des protéines, et codent pour des protéines ribosomiques ou intervenant dans la biogenèse des ribosomes. La perte de fonction de ces gènes conduit à la formation de tumeurs dans la lignée hématopoïétique. Le prototype de ces gènes est aberrant immune response 8 (air8) qui code pour la protéine RPS6 (voir plus haut). La phosphorylation de RPS6 entraîne l'activation de la synthèse protéique. Des mutations hypomorphes dans le gène air8 conduisent au ralentissement de la prolifération dans la plupart des types cellulaires, ce qui est cohérent avec le rôle de RPS6 dans l'activation de la synthèse protéique : l'inhibition de la croissance entraîne de manière dominante le blocage des divisions cellulaires. De même, Watson et al. [41] montrent que les cellules homozygotes pour des mutations dans air8 créées recombinaison mitotique sont incapables de se diviser et ne survivent pas. Ces expériences indiquent bien que RPS6 est essentielle pour la prolifération et la survie cellulaires. Cependant, les mutants air8 montrent un phénotype d'hyperprolifération non contrôlée au niveau des glandes lymphatiques, qui sont les organes hématopoïétiques. Ils produisent ainsi des cellules sanguines anormalement différenciées. Le caractère malin de ces cellules sanguines mutantes est démontré par des expériences de transplantation chez un hôte de type sauvage dans lequel elles croissent et prolifèrent de manière autonome et envahissante. De plus, les cellules sanguines dérivées des glandes lymphatiques mutantes pour air8 peuvent être mises en culture cellulaire et gardent les fonctions de cellules sanguines pluripotentes [42].

Le gène modulo montre une phénoménologie tout à fait semblable. modulo code pour une protéine nucléolaire affine de l'ARN. Ces différentes propriétés suggèrent déjà que Modulo exerce sa fonction dans la machinerie de biosynthèse des protéines [14, 15]. Dans les mutants modulo, on observe le même comportement que dans air8: ralentissement de la croissance et donc de la prolifération dans la plupart des tissus, sauf dans les glandes lymphatiques qui montrent une hyperplasie, et un nombre anormalement élevé d'hémocytes.

m/s n° 10. vol. 15. octobre 99

Conclusions

Nous n'avons développé ici que quelques exemples illustrant le paradigme qu'on peut établir à partir des phénotypes mutants des gènes suppresseurs de tumeurs chez la drosophile. De manière claire, le phénotype primaire associé à la perte de fonction de ces gènes est un ralentissement de la prolifération consécutif à un défaut de croissance. Certains tissus échappent cependant à ce ralentissement et montrent au contraire une prolifération non contrôlée, malgré l'absence ou la diminution de la fonction d'éléments essentiels à la croissance des cellules normales. C'est d'ailleurs un paradoxe surprenant, car on peut se demander comment des cellules cancéreuses peuvent croître et donc proliférer en dépit de la diminution de la fonction de protéines, telles que RPS6 et RPS21, qui semblent pourtant indispensables à la vie d'une cellule [43]. Enfin, comme pour les cancers observés chez les mammifères, il semble nécessaire dans certains cas d'invoquer chez la drosophile l'intervention d'événements (mutationnels?) supplémentaires pour expliquer l'émergence de cellules qui échappent à ce contrôle négatif de la croissance, consécutif à l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs, et s'engagent alors dans la voie tumorale. On peut imaginer que les outils accessibles chez la drosophile permettront de répondre à ces différentes énigmes, essentiellement parce qu'on peut suivre, pratiquement division après division, le devenir d'une cellule homozygote pour un allèle mutant dans un gène suppresseur de tumeurs et sa transformation en cellule cancéreuse. Il sera peut-être aussi possible de mieux évaluer l'effet de ces mutations vis-à-vis de la mort cellulaire, dont nous n'avons pas parlé ici du fait du manque actuel de données sur ce problème chez la drosophile. Des observations récentes suggèrent en effet une coopération d'oncogènes dans les cellules cancéreuses pour à la fois stimuler la prolifération et inhiber l'apoptose [44].

Nous terminerons sur l'observation que, chez les mammifères aussi, dans de nombreux cas, des mutations portées par l'organisme entier entraînent ce double phénotype de retard de croissance et d'apparition tardive de tumeurs dans des tissus particuliers. Deux exemples récents ont été observés chez la souris. Tout d'abord, l'inactivation du gène Smad3, qui transduit jusqu'au noyau le signal émis par le TGFβ, conduit à des souris normales mais plus petites qui développent, 4 à 6 mois après leur naissance, des cancers du côlon [45]. Ensuite, l'inactivation du gène p107, qui appartient à la famille des gènes Rb et code pour un régulateur de la croissance et du cycle cellulaire [9], conduit à la naissance de souris normales mais de taille plus petite par rapport aux souris sauvages. De plus, ces souris, selon leur contexte génétique, développent des hyperplasies myéloïdes de la rate et du foie [46]. Il nous faut maintenant comprendre comment et pourquoi une cellule dont la croissance est défavorisée par rapport aux cellules environnantes, échappe au contrôle intrinsèque de la croissance cellulaire et devient tumorale

Remerciements

Nous remercions la Ligue nationale de recherche contre le cancer et l'Association de recherche contre le cancer pour leur soutien financier. N. Arquier est financée par la Ligue nationale de recherche contre le cancer et L. Perrin par un contrat du Centre francoindien pour la promotion de la recherche avancée (CEFIPRA, Projet n° 1603-1).

RÉFÉRENCES .

- 1. Johnston GC, Pringle JR, Hartwell LH. Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae. Exp Cell Res* 1977; 105: 79-98.
- 2. Weigmann K, Cohen SM, Lehner CF. Cell cycle progression, growth and patterning in imaginal discs despite inhibition of cell division after inactivation of *Drosophila* Cdc2 kinase. *Development* 1997; 124: 3555-63
- 3. Neufeld TP, De la Cruz AF, Johnston LA, Edgar BA. Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* 1998; 93: 1183-93.
- 4. Royet J. Organisation spatiale des disques imaginaux et des bourgeons de membres. *Med Sci* 1998; 14: 1167-75.

- 5. Serrano N, O'Farrell PH. Limb morphogenesis: connections between patterning and growth. *Curr Biol* 1997; 7: R186-95.
- 6. Neufeld PN, Edgar BA. Connections between growth and the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 784-90.
- 7. Su TT, O'Farrell PH. Size control: cell proliferation does not equal growth. *Curr Biol* 1998; 8: R687-9.
- 8. Johnston LA. Uncoupling growth from the cell cycle. *Bioessays* 1998; 20: 283-6.
- 9. Nasmyth K. Retinoblastoma protein. Another role rolls in. *Nature* 1996; 382: 28-9.
- 10. Hartwell LH. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res* 1971; 69: 265-76.
- 11. Nurse P, Thuriaux P, Nasmyth K. Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe. Mol Gen Genet* 1976; 146: 167-78.
- 12. Simpson P. Parameters of cell competition in the compartments of the wing disc of *Drosophila*. *Dev Biol* 1979; 69: 182-93.
- 13. Zaffran S, Chartier A, Gallant P, et al. A Drosophila RNA helicase gene, pitchoune, is required for cell growth and proliferation and is a potential target of d-Myc. Development 1998; 125: 3571-84.
- 14. Perrin L, Demakova O, L. Fanti L, *et al.* Dynamics of the sub-nuclear distribution of Modulo and the regulation of position-effect variegation by nucleolus in *Drosophila*. *J Cell Sci* 1998; 111: 2753-61.
- 15. Perrin L, Romby P, Laurenti P, et al. The Drosophila modifier of variegation modulo gene product binds specific RNA sequences at the nucleolus and its association to chromatin depends on a phosphorylation-dependent interaction with DNA. J Biol Chem 1999; 274: 6315-23.
- 16. Kay MA, Jacobs-Lorena M. Developmental genetics of ribosome synthesis in *Drosophila*. Trends Genet 1987; 3: 347-51.
- 17. Peterson RT, Schreiber SL. Translation control: connecting mitogens and the ribosome. *Curr Biol* 1998; 8: R248-50.
- 18. Stewart MJ, Thomas G. Mitogenesis and protein synthesis: a role for ribosomal protein S6 phosphorylation? *Bioessays* 1994; 16: 809-15.
- 19. Chou MM, Blenis J. The 70 kDa S6 kinase: regulation of a kinase with multiple roles in mitogenic signalling. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 806-14.
- 20. Beretta L, Grolleau A. La rapamycine: identification d'une nouvelle voie de signalisation des facteurs de croissance, réglant le début de la traduction. *Med Sci* 1998; 14: 600-2.
- 21. Sonenberg N, Gingras AC. The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 268-75.

RÉFÉRENCES I

- 22. Gallant P, Shiio Y, Cheng PF, Parkhurst SM, Eisenman RN. Myc and Max homologs in *Drosophila*. *Science* 1996; 274: 1523-7.
- 23. Pusch O, Bernaschek G, Eilers M, Hengstschlager M. Activation of c-Myc uncouples DNA replication from activation of G1-cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 1997; 15: 649-56.
- 24. Polymenis M, Schmidt EV. Coupling of cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin CLN3 in yeast. *Genes Dev* 1997; 11: 2522-31.
- 25. Muise-Helmericks RC, Grimes HL, Bellacosa A, Malstrom SE, Tsichlis PN, Rosen N. Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally *via* a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem* 1998; 273: 29864-72.
- 26. Edgar BA, Lehner CF. Developmental control of cell cycle regulators: a fly's perspective. *Science* 1996; 274: 1646-52.
- 27. Burke RB, Basler K. Dpp receptors are autonomously required for cell proliferation in the entire developing *Drosophila* wing. *Development* 1996; 122: 2261-9.
- 28. Slusarski DC, Corces VG, Moon RT. Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 1997; 390: 410-3.
- 29. He TC, Sparks AB, Rago C, et al. Identification of c-Myc as a target of the APC pathway. Science 1998; 281: 1509-12.
- 30. Johnston LA, Edgar BA. Wingless and Notch regulate cell-cycle arrest in the developing *Drosophila* wing. *Nature* 1998; 394: 82-4.
- 31. Horsfield J, Penton A, Secombe J, Hoffman FM, Richardson H. Decapentaplegic is required for arrest in G1 phase during *Drosophila* eye development. *Development* 1998:125: 5069-78
- 32. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274: 1672-7.
- 33. Gateff E, Schneiderman HA. Neoplasms in mutant and cultured wild-type tissues of *Drosophila. Natl Cancer Inst Monogr* 1969; 31: 365-97.
- 34. Gateff E. Malignant neoplasms of genetic origin in *Drosophila melanogaster*. *Science* 1978; 200: 1448-59.
- 35. Gateff E. Cancer, genes, and development: the *Drosophila* case. *Adv Cancer Res* 1982; 37: 33-74.
- 36. Gateff E. Tumor suppressor and overgrowth suppressor genes of *Drosophila melanogaster*: developmental aspects. *Int J Dev Biol* 1994; 38: 565-90.
- 37. Watson KL, Justice RW, Bryant PJ. *Drosophila* in cancer research: the first fifty tumor suppressor genes. *J Cell Sci* 1994; 18 (suppl): 19-33.

- 38. Harrison DA, Binari R, Nahreini TS, Gilman M, Perrimon N. Activation of a *Droso-phila* Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. *EMBO* J 1995; 14: 2857-65.
- 39. Tao W, Zhang S, Turenchalk GS, et al. Human homologue of the *Drosophila melanogaster lats* tumour suppressor modulates CDC2. Nat Genet 1999; 21:177-81.
- 40. Manfruelli P, Arquier N, Hanratty WP, Semeriva M. The tumor suppressor gene, lethal(2)giant larvae (l(2)gl), is required for cell shape change of epithelial cells during Drosophila development. Development 1996; 122: 2283-94.
- 41. Watson KL, Konrad KD, Woods DF, Bryant PJ. *Drosophila* homolog of the human S6 ribosomal protein is required for tumor suppression in the hematopoietic system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11302-6.
- 42. Watson KL, Woods DF, Konrad K, et al. The p70S6 kinase (S6k) signalling in Drosophila. 3rd International Conference on Drosophila tumor suppressor genes (and their human homologues in normal and malignant development). In: Gateff E, Mechler BM, eds. Seeheim: GDR-Verlag, 1998.
- 43. Török I, Hermann-Horle D, Kiss I, Speer G, Mechler BM. Down-regulation of RpS21, a putative initiation factor interac-

- ting with Rp40-stubarista, produced viable Minute imagos and larval lethality with overgrown hematopoietic organs and imaginal discs. 3rd International Conference on Drosophila tumor suppressor genes (and their human homologues in normal and malignant development). In: Gateff E, Mechler BM, eds. Seeheim: GDR-Verlag, 1998.
- 44. Hueber AO, Evan GI. Traps to catch unwary oncogenes. *Trends Genet* 1998; 14: 364-7
- 45. Zhu Y, Richardson JA, Parada LF, Graff JM. *Smad3* mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell* 1998; 94: 703-14.
- 46. LeCouter JE, Kablar B, Hardy WR, *et al.* Strain-dependent myeloid hyperplasia, growth deficiency, and accelerated cell cycle in mice lacking the *Rb*-related *p107* gene. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 7455-65.
- 47. Thomas G, Hall MN. TOR signalling and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 782-7.

TIRÉS À PART

M. Sémériva.

Summary

Links between growth rate and proliferation revisited in Drosophila

Recent data obtained from studies on Drosophila demonstrate that cell proliferation does not equal growth. Stimulation or inhibition of the cell cycle rate leads to tissues of the same overall size as that reached in a normal situation, but these tissues are composed either of smaller cells or of larger cells respectively. These experiments have been possible thanks to the tools existing now in *Drosophila* such as mutations in cell cycle regulators, targeted and inducible expression of genes in transgenic animals and generation of genetic mosaics constituted of chosen mutant cells in various genetic backgrounds. These observations confirm previous findings obtained in yeast and strongly favour the idea that growth is dominant and rate limiting over proliferation. Several factors which were believed to affect proliferation by interfering directly and only with cell cycle might, in fact, primarily modify the growth rate before acting on proliferation. Similarly, it is now widely acknowledged that, in many cases, growth factors signal to the translation machinery to positively stimulate growth and this, in turn, will induce cell proliferation. These findings have important implications in our current understanding of morphogenesis. Growth and patterning of *Drosophila* imaginal discs appear to directly rely on a control of growth rate, in which WNT and BMP's *Drosophila* homologues may play a key role, rather than on a cell counting control. We also reconsider cancerogenesis in the light of these new results and of some recent functional analysis of tumor suppressor genes in *Drosophila*. Intriguingly, most of these genes appear to function in the control of growth and not in cell cycle regulation. Moreover, they act as positive regulators of growth rate. The challenge is now to understand why and how a cell with a disadvantage in its own growth, escapes the proliferation control and becomes tumourous.

m/s n° 10, vol. 15, octobre 99