

Une avancée majeure en cancérogenèse expérimentale

La création de lignées tumorales humaines à partir d'une combinaison définie de gènes

Le développement d'un cancer est un processus complexe qui fait intervenir à la fois l'accumulation séquentielle d'altérations génétiques et épigénétiques, des mécanismes de sélection et d'expansion cellulaires, et qui peut s'étendre sur une durée relativement longue au cours de la vie de l'individu [1]. Les chercheurs ont tenté depuis de nombreuses années de reproduire dans des cellules normales cultivées *in vitro*, les étapes précoces de la progression vers l'état cancéreux. Bien qu'il s'agisse là de conditions expérimentales très réductrices, ne tenant par exemple aucun compte des phénomènes de vascularisation et de dissémination tumorales qui existent *in vivo*, elles ont néanmoins permis au fil des ans de caractériser des gènes associés au processus tumoral (oncogènes).

L'analyse du premier virus transformant connu, le virus du sarcome de Rous [2], isolé en 1911, a montré que des cultures primaires de fibroblastes embryonnaires de poulet pouvaient être transformées par un oncogène unique, dans ce cas, l'oncogène *src* [3]. La transformation par *src*, particulièrement rapide et dramatique, induit dans les cellules des altérations majeures qui servent de référence pour la définition du phénotype transformé [4]: (1) des altérations morphologiques liées à une perte de la propriété d'inhibition de contact et au développement de foyers prolifératifs même lorsque les cellules sontensemencées à très faible concentration; (2) la capacité de proliférer en présence de faibles concentrations de facteurs de crois-

sance; (3) la capacité de croître en l'absence de support (*anchorage-independence*), qui se traduit par le développement de colonies, en milieu semi-solide (agar), à partir de cellules isolées; (4) la capacité de former des tumeurs après injection à l'animal.

L'étude systématique de rétrovirus transformants a permis de mettre en évidence d'autres oncogènes (dont le produit est membranaire comme *ras*, ou nucléaire comme *myc*) dont chacun, pris séparément, transforme les cellules primaires aviaires de poulet. Ces cellules, qu'elles soient ou non transformées, ont une durée de vie relativement longue, mais cependant limitée à 40-60 générations et surtout sans possibilité d'immortalisation [5].

Les tentatives de transformation de cellules normales de mammifères par un oncogène unique se sont avérées inefficaces. Il y a une quinzaine d'années, des résultats positifs ont cependant pu être obtenus après l'introduction simultanée de deux oncogènes dans des cellules primaires de rongeurs. Se fondant sur les propriétés transformantes du poliovirus ou de l'adénovirus humain, la combinaison des gènes précoces «*large T*» et «*middle T*» [6] ou des gènes précoces *E1A* et *E1B* [7] a permis de transformer les cellules embryonnaires de rat en induisant la formation de foyers de prolifération même à faible concentration cellulaire. A la même période, l'équipe de Robert Weinberg (*Massachusetts Institute of Technology*, Cambridge, MA, USA) [8] obtenait des résultats identiques en introduisant deux onco-

gènes d'origine cellulaire *myc* + *ras* (ce dernier étant d'ailleurs fréquemment activé dans des cancers humains). Contrairement aux cellules primaires de poulet, les cellules de rongeur ont une durée de vie très courte en culture, entre 10 et 20 générations, et une fréquence d'immortalisation spontanée élevée. Dans ces expériences, l'immortalisation était d'ailleurs fréquemment associée à la transformation. En effet (1) la grande majorité des foyers obtenus était capable de proliférer en culture à long terme, et, (2) des lignées de rongeur préalablement immortalisées (comme les lignées 3T3 NIH de souris ou Rat-1 de rat) pouvaient être transformées par un seul oncogène.

Mettant à profit ce concept de la coopération entre deux oncogènes, de nombreuses tentatives de transformation de cellules embryonnaires humaines furent entreprises, mais sans succès. Il semblait exister une différence fondamentale entre les cellules de rongeur et les cellules humaines, ces dernières présentant, dans leur progression vers l'état cancéreux, au moins une étape supplémentaire qui ne pouvait être franchie. Des résultats récents en provenance de diverses équipes ont suggéré aux chercheurs du laboratoire de Robert Weinberg que l'absence d'activité télomérase dans la plupart des cellules somatiques humaines pouvait être responsable de ce blocage.

Cette activité télomérase présente en effet d'intéressantes propriétés: (1) elle est impliquée dans le maintien de la longueur et de l'intégrité des

extrémités des chromosomes (ou télomères); son absence entraîne, division après division, une érosion de ces extrémités, imposant une limite au nombre de divisions cellulaires possibles et donc une limite à la durée de vie de la cellule; (2) elle est très faible, voire indétectable, dans la plupart des cellules somatiques humaines et dans les cultures primaires qui en dérivent; elle est en revanche présente dans les cultures de cellules de rongeurs qui possèdent des télomères très longs de l'ordre de 100 kilobases [9]; (3) son expression dans les cellules humaines normales peut être obtenue après la seule introduction du gène *hTERT* (*human telomerase reverse transcriptase*) qui code pour la sous-unité catalytique de la télomérase; dans certains cas, il en résulte un accroissement notable de la durée de vie des cultures [10-14]; (4) elle est détectable dans la majorité des tumeurs humaines [15].

Ayant ces données à l'esprit, les chercheurs du laboratoire de Robert Weinberg introduisirent, à l'aide de rétrovirus, la combinaison des gènes *ras* + « *large T* » (fortement transformante chez les rongeurs) avec le gène *hTERT* dans des cellules humaines. Par précaution, ils réalisèrent les autres combinaisons possibles ne comprenant qu'un seul et deux des trois gènes. Espérant établir la généralité de leurs résultats, ils réalisèrent les expériences en parallèle sur des cellules embryonnaires épithéliales de rein et sur des fibroblastes normaux. Les résultats des travaux, identiques pour les deux types cellulaires, épithéliaux et mésenchymateux, viennent de paraître dans le numéro du 29 juillet de la revue *Nature* [16]. Ils montrent sans ambiguïté et de façon remarquable que seule la combinaison [*ras+largeT+hTERT*] est capable d'induire une transformation de ces cellules, comme en témoignent la formation de colonies en agar et le développement de tumeurs après injection dans la souris nude. Le *Tableau I* résume ces données.

L'équipe de Robert Weinberg pense que les trois gènes utilisés sont non seulement nécessaires, mais suffisants. En effet, deux types d'argu-

Tableau I			
CAPACITÉ DE DIFFÉRENTES COMBINAISONS DE GÈNES DE TRANSFORMER DES CELLULES HUMAINES			
Gènes introduits dans les cultures primaires	Capacité de surmonter les étapes de sénescence et de crise	Capacité de développer des colonies en agar	Capacité de former des tumeurs chez les souris nude
Aucun	<i>non</i>	<i>non</i>	<i>non</i>
large T	<i>non</i>	<i>non</i>	<i>non</i>
ras	<i>non</i>	<i>non</i>	<i>non</i>
hTERT	<i>non</i>	<i>non</i>	<i>non</i>
large T + ras	<i>non</i>	<i>oui</i> (quelques colonies abortives)	<i>non</i>
ras + hTERT	<i>non</i>	<i>non</i>	<i>non</i>
large T + hTERT	<i>oui</i> (immortalisation)	<i>non</i>	<i>non</i>
ras + large T + hTERT	<i>oui</i> (immortalisation)	<i>oui</i>	<i>oui</i>

ments rendent improbable la sélection de variants génétiques à partir des cellules exprimant *ras*, « *large T* » et *hTERT*, variants qui, à eux seuls, seraient responsables du phénotype malin: (1) l'absence de temps de latence après l'injection des cellules traitées chez les souris, et (2) l'absence de divergence décelable entre les populations originales injectées chez les souris et les populations issues des tumeurs et remises en culture, pour les critères suivants: morphologie, efficacité de clonage en agar, homogénéité de la taille des télomères, conservation de l'hétérogénéité des sites d'intégration des trois gènes au niveau génomique (populations polyclonales), croissance des cellules en culture et chez l'animal (tumeurs secondaires).

La *figure 1* indique la séquence des événements et le niveau possible d'action des gènes *ras*, « *large T* » et *hTERT* aboutissant à la transformation des cellules primaires humaines: après la mise en culture, les cellules humaines, qui normalement n'expriment aucune activité télomérase, peuvent se diviser pendant 30 à 50 générations avant d'entrer en sénescence. Cette sénescence [17] est caractérisée par des altérations morphologiques, un ralentissement considérable, puis un arrêt de la division cellulaire. Dans de nombreux

types de cellules humaines, la sénescence semble être la conséquence d'une perte excessive de l'ADN télomérique, ce qui constituerait un signal conduisant à un arrêt du cycle [18]. Comme ce processus est contrôlé par les protéines p53 et rétinoblastome (Rb), il est surmonté par la présence du gène « *large T* » qui inhibe ces régulateurs du cycle cellulaire. En présence de « *large T* » et de *Ras* qui délivre un signal mitogène constitutif [19], les cellules échappent à la sénescence, continuent de se diviser et présentent un phénotype partiellement transformé (qui se traduit par des colonies abortives obtenues en agar, voir *Tableau I*). Si la télomérase n'est toujours pas activée à ce stade, les divisions forcées des cellules vont encore diminuer la taille de leurs télomères, ce qui accroît l'instabilité génétique. On dit qu'elles sont en pré-crise ou pré-immortelles. La prolifération de ces cellules est alors limitée par une catastrophe génétique [20]. C'est la crise. L'acquisition d'une activité télomérase, un phénomène considéré comme tardif parmi les différentes étapes conduisant à la cancérisation cellulaire, permet d'éviter la crise en permettant une prolifération illimitée. Cette véritable immortalisation cellulaire est accompagnée de la stabilisation voire de l'allongement des

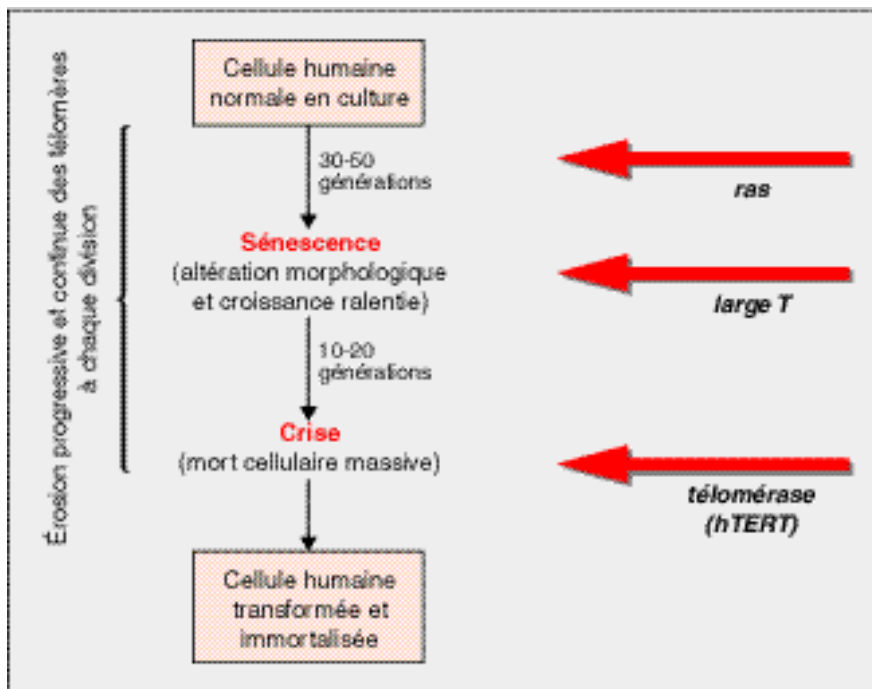


Figure 1. **Séquence des événements conduisant à la transformation des cellules primaires humaines.**

télomères et, au moins dans certains cas, d'une diminution de l'instabilité génétique accompagnant l'état pré-immortel. Selon ce schéma, la transformation des cellules humaines en cellules cancéreuses nécessiterait la mise en œuvre d'au moins 4 voies régulatrices distinctes définies par les protéines Ras, p53, Rb et hTERT. Il s'agit là d'un nombre minimal, le résultat récent d'une autre équipe suggérant l'existence d'un plus grand nombre de ces voies régulatrices [21].

Finalement, les travaux présentés par l'équipe de Robert Weinberg constituent une avancée majeure dans le domaine de l'oncogénèse, notamment en mettant à la disposition de la communauté scientifique un cadre expérimental clairement défini pour l'analyse de la transformation des cellules primaires humaines (voir également les commentaires sur ces travaux dans [22]). De façon plus générale, les chercheurs ont maintenant à leur disposition trois modèles de transformation *in vitro*, aviaire, murin et humain, présentant un nombre différent de blocages dans leur progression vers l'état cancé-

reux. L'analyse des similitudes et des différences existant entre ces modèles devrait constituer une source précieuse d'informations, notamment en ce qui concerne le rôle particulier de l'activité télomérase et de l'immortalisation.

Marc Castellazzi

Inserm U. 412, École Normale Supérieure, 46, allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France.

1. Mougneau E, Glaichenhaus N, Cuzin F. Analyse des étapes précoces de la progression tumorale. *Med Sci* 1985; 1: 86-90.
2. Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exp Med* 1911; 13: 397-411.
3. Stéhelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 1976; 260: 170-3.
4. Jove R, Hanafusa H. Cell transformation by the viral src oncogene. *Annu Rev Cell Biol* 1987; 3: 31-56.

5. Benjamin T, Vogt PK. Cell transformation by viruses. In: Fields BN, *et al.*, eds. *Fields Virology*. New York: Raven Press, 1990: 317-67.

6. Rassoulzadegan M, Cowie A, Carr A, Glaichenhaus N, Kamen R, Cuzin F. The role of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation. *Nature* 1982; 300: 713-8.

7. Ruley HE. Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* 1983; 304: 602-6.

8. Land H, Parada LF, Weinberg RA. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 1983; 304: 596-602.

9. Kipling D. Telomere structure and telomerase expression during mouse development and tumorigenesis. *Eur J Cancer* 1997; 33: 792-800.

10. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, *et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279: 349-52.

11. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, *et al.* hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 1997; 90: 785-95.

12. Counter MC, Hahn WC, Wei W, *et al.* Dissociation among *in vitro* telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14723-8.

13. Bryan TM, Cech TR. Telomerase and the maintenance of chromosomal ends. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 318-24.

14. Marcand S, Brun C, Ancelin K, Gilson E. Les télomères: du normal au pathologique. *Med Sci* 1997; 13: 1250-8.

15. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33: 787-91.

16. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, *et al.* Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 1999; 400: 464-8.

17. Hayflick L, Moorehead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25: 585-621.

18. Koering CE, Gilson E. Contrôle télomérique de la sénescence. *Med Sci* 1998; 14: 748-53.

19. Chardin P. Protéines Ras et transmission des signaux mitogènes. *Med Sci* 1994; 10: 657-64.

20. Chin L, Artandi SE, Shen Q, *et al.* p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* 1999; 97: 527-38.

21. Morales CP, Holt SE, Ouellette M, *et al.* Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet* 1999; 21: 115-8.

22. Weitzman JB, Yaniv M. Rebuilding the road to cancer. *Nature* 1999; 400: 401-2.

Remerciements

L'auteur remercie le Dr Éric Gilson pour son aide dans l'élaboration de cet article (École normale supérieure, Cnrs UMR 5665, Lyon).