

Cancer: GTPases et suppresseurs de tumeurs

Jean de Gunzburg

J. de Gunzburg: Inserm U.248, Institut Curie, Section de recherche, 26, rue d'Ulm 75248 Paris Cedex 05, France.

► Le cancer est une maladie du fonctionnement même de nos cellules qui perdent le contrôle de leur prolifération, échappent à l'apoptose et deviennent immortelles. Elle résulte de la coopération entre l'activation d'oncogènes dominants et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, processus qui sont amplifiés par le défaut des mécanismes assurant normalement la stabilité et l'intégrité du génome. La coopération entre ces différents mécanismes résulte en l'oncogénèse; les bases moléculaires de cette coopération commencent à être établies. ◀

Le cancer est une maladie intrinsèque de la cellule, inhérente à la nature même de sa machinerie. Contrairement à de nombreuses maladies qui sont la conséquence du développement au sein de notre organisme d'un agent venu de l'extérieur (virus, bactéries, parasites), le cancer provient du fait que certaines de nos propres cellules ont perdu la capacité de contrôler leur prolifération et ont réussi à échapper aux mécanismes de surveillance qui, dans ces circonstances, les conduiraient normalement à la mort. Les cellules cancéreuses ne cessent de se diviser; devenues immortelles et insensibles aux signaux venus de l'extérieur, elles se multiplient à l'infini, essaient et finissent par envahir l'organisme entier.

Normalement, les cellules contrôlent finement leur prolifération en fonction d'une multitude de signaux extrinsèques de nature chimique (hormones, cytokines, facteurs de croissance, conditions métaboliques) ou mécanique (contacts entre cellules ainsi qu'avec la matrice extracellulaire) qui assurent le maintien harmonieux de la taille et de la fonction de chaque organe, ainsi que le renouvellement nécessaire de certaines de leurs cellules au cours du temps. Le cancer est une maladie de la transduction de ces signaux, c'est-à-dire des processus internes par lesquels les cellules mettent en œuvre et coordonnent les effets biologiques qu'induisent ces signaux.

Le cancer est également une maladie des mécanismes de surveillance propres à chaque cellule qui normalement veillent à maîtriser ou à éliminer les cellules affectées dans ces événements de transduction. Chacune de ces déficiences est consécutive à la lésion (mutation ponctuelle, délétion, amplification, translocation...) des gènes qui codent pour les fonctions que nous venons d'évoquer. C'est l'accumulation de défauts dans plusieurs de ces mécanismes de transduction et de surveillance qui permet le développement des cancers, accumulation elle-même favorisée par la défaillance des mécanismes qui surveillent le maintien de l'intégrité du génome; le cancer est donc également une maladie de la stabilité génétique.

GTPases et transduction des signaux prolifératifs

Les cellules règlent leur prolifération en fonction d'une multitude de signaux prolifératifs et antiprolifératifs qui leur permettent d'adapter leur multiplication aux conditions du milieu extérieur (*figure 1*). Ces signaux, facteurs de croissance, cytokines et hormones, sont perçus par les cellules au moyen de récepteurs situés sur leur membrane plasmique [1]. Ces protéines transmembranaires exposent vers l'extérieur le site de liaison de

TIRÉS À PART

J. de Gunzburg.

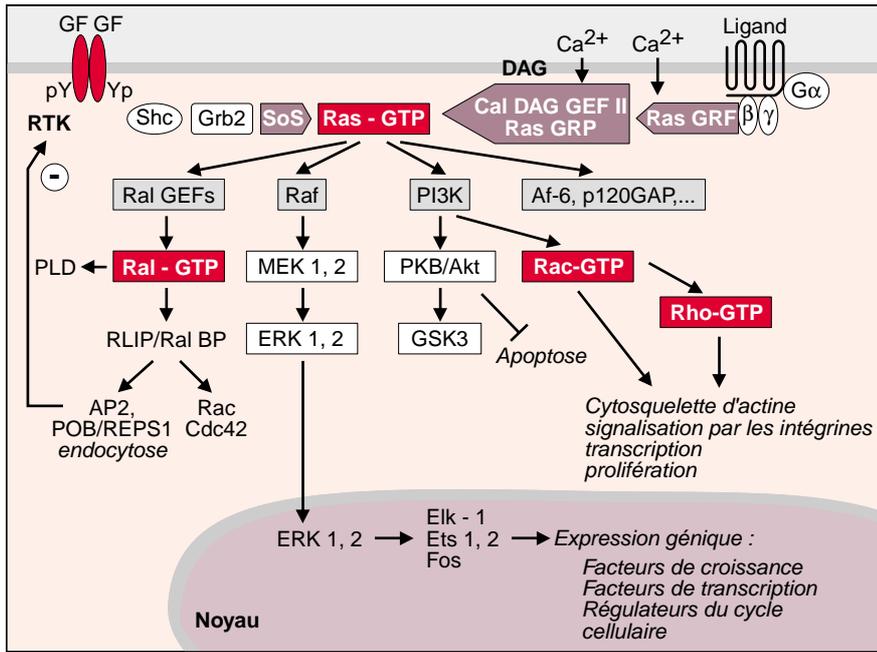


Figure 1. **Transduction des signaux mitogènes empruntant la voie Ras.** Les signaux émanant de récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), ou à sept domaines transmembranaires, stimulent l'apparition de la forme active de la protéine Ras liée au GTP. Les protéines effectrices de son activité mitogène, et les voies qu'elles contrôlent en aval sont indiquées.

l'hormone ou du facteur de croissance, et vers le cytoplasme les domaines responsables de la transduction du signal. Les signaux prolifératifs transduits par ces récepteurs provoquent en quelques minutes l'activation de commutateurs biologiques, les GTPases Ras, qui constitue une véritable plaque tournante du contrôle de la prolifération cellulaire.

Les trois protéines Ras (H-, K- et N-Ras) [2] lient le GDP et le GTP avec une très forte affinité et portent une activité GTPase intrinsèque (figure 2). Elles ont été très conservées à travers l'évolution puisqu'on retrouve des protéines homologues dans toutes les espèces de la levure à l'homme; elles sont le prototype d'une vaste famille de GTPases – la superfamille Ras – qui jouent un rôle important dans le contrôle de nombreuses fonctions biologiques telles que prolifération, différenciation, morphogenèse, trafic intracellulaire, etc. [3-5]. Les protéines Ras, comme la plupart de ces GTPases, sont exprimées de façon quasiment ubiquitaire chez les mammifères supérieurs. Normalement présentes dans la cellule sous leur forme inactive liée au GDP, les protéines Ras sont activées par les signaux mito-

gènes qui stimulent rapidement la formation de leur forme active liée au GTP; celle-ci active à son tour plu-

sieurs protéines effectrices qui sont responsables des effets biologiques des protéines Ras [4]. Parmi elles, on ne citera ici que deux exemples. Les sérine/thréonine kinases Raf active la cascade des MAP-kinases (*mitogen activated protein kinases*) ERK; ces enzymes règlent à leur tour par phosphorylation l'activité de certaines voies métaboliques, facteurs de traduction et facteurs de transcription [6]. La phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3 kinase) est responsable de l'activation de la protéine-kinase PKB/Akt qui joue un rôle essentiel dans la survie des cellules en bloquant les processus apoptotiques [7]; la PI3 kinase entraîne de même l'activation des GTPases Rac et Rho (membres également de la superfamille Ras) qui contrôlent la polymérisation du cytosquelette d'actine, jouent un rôle dans l'adhérence ainsi que dans la transmission du signal par les intégrines, et permettent aux cellules de progresser à travers la phase G1 du cycle cellulaire. Il est à noter que les GTPases Rho, Rac et Cdc42, dont l'activité est nécessaire à la stimulation de la prolifération cellulaire par Ras, sont également activées indépendamment de Ras par certains signaux mitogènes [8].

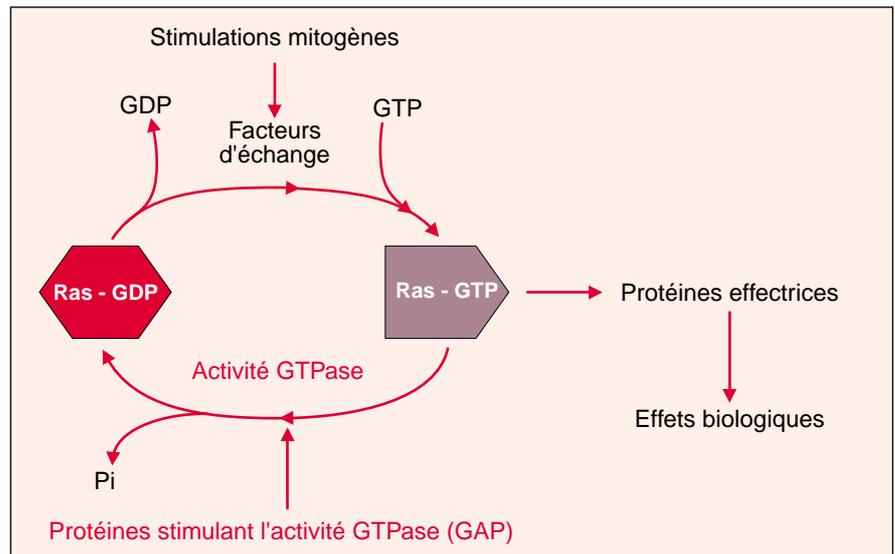


Figure 2. **Les GTPases Ras, modèle de commutateur biologique.** Les GTPases Ras sont normalement au repos sous leur forme inactive liée au GDP. Les stimulations mitogènes activent des facteurs d'échange qui stimulent la dissociation du GDP, et son remplacement par le GTP. Sous sa forme active, Ras-GTP lie et active les protéines effectrices de ses effets biologiques (voir figure 1). L'activité GTPase intrinsèque, qui peut être stimulée par d'autres protéines cellulaires (GAP), assure le retour des GTPases à leur forme inactive liée au GDP.

Ces différentes voies effectrices, mettant en jeu de multiples GTPases, coopèrent entre elles afin de permettre les cellules à entrer dans un nouveau cycle de division cellulaire en stimulant leur progression au-delà du point de restriction de la phase G1 du cycle. Le très grand niveau de complexité des voies de transduction des signaux mitogènes – voies convergentes et divergentes, ainsi que les régulations croisées entre ces voies – constitue le mécanisme même de la coordination des nombreuses fonctions cellulaires contribuant à l'accomplissement de la division cellulaire.

Les gènes du cancer : oncogènes et suppresseurs de tumeurs

L'oncogenèse est un processus à plusieurs étapes qui nécessite conjointement l'activation d'oncogènes dominants et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs [9]. Les oncogènes dominants peuvent être activés par des mécanismes qui modifient la protéine qu'ils codent (mutation ponctuelle, troncature) ou altèrent son expression (amplification ou translocation du gène) et résultent ainsi en la production constitutive de signaux intracellulaires mitogènes. Parmi les oncogènes dominants, l'activation de l'un des trois proto-oncogènes *ras* en oncogène par mutation ponctuelle est retrouvée dans 30% à 60% des cancers humains et constitue une des étapes précoces du processus d'oncogenèse. Les mécanismes précis par lesquels ces mutations bloquent les protéines Ras dans une forme constitutivement active sont à présent connus jusque dans leur détail atomique, grâce aux remarquables études moléculaires et structurales consacrées à ce sujet [10].

De nombreux oncogènes dominants, isolés à partir de tumeurs animales ou humaines, codent pour des protéines normalement impliquées dans la transduction des signaux mitogènes empruntant la voie Ras. Parmi eux, on compte des facteurs de croissance (*sis*) et leurs récepteurs à activité tyrosine kinase (*erb-B* et la famille des récepteurs HER, *fms*, *met*, *ret*, *FGFR3*...), des protéines non réceptrices à activité tyrosine kinase de la famille *src* (*src*, *lck*...), des protéines

adaptatrices (*Nck*, *Crk*, *Shc*...) qui relient les récepteurs aux activateurs de Ras, et *raf* qui met en route la cascade des MAP-kinases [11]. Ras ne constitue pas la seule GTPase dont l'activation constitutive est impliquée dans l'oncogenèse. En effet, une sous-unité α de protéine G hétérotrimérique est retrouvée activée en oncogène (*Gasp*) par mutation ponctuelle [12]; de plus, les gènes codant pour certaines protéines activatrices des GTPases Rho, Rac et Cdc42 (*tiam1*, *dbl*, *lbc*, *lfc*, *vav*, *ost*...) ont été caractérisés comme oncogènes [13]. Cette liste ne prétend pas décrire de façon exhaustive l'ensemble des oncogènes cytoplasmiques répertoriés à ce jour (et ne mentionne même pas les oncogènes nucléaires, parmi lesquels de nombreux facteurs de transcription); cependant, elle souligne les conséquences oncogènes des dérèglements fonctionnels des voies de transduction des signaux mitogènes contrôlées par les GTPases telles que Ras.

A elle seule, l'activation d'oncogènes dominants n'est pas suffisante pour mener au cancer. Pourtant, en vertu

des principes exposés ci-dessus, l'activation oncogénique de la voie Ras devrait à la fois stimuler la prolifération cellulaire en activant la voie Raf-MAP-kinases, et inhiber les processus apoptotiques par l'intermédiaire de la voie PI3 kinase-Akt. Cependant, et de façon paradoxale, l'expression d'un oncogène *ras* activé dans des cellules normales provoque précisément les réponses inverses, à savoir un arrêt de croissance ainsi que la sénescence ou la mort cellulaire par apoptose, qui représentent de véritables contre-mesures cellulaires à l'encontre de signaux prolifératifs inappropriés [14]. Cet exemple illustre bien la double action de protéines telles que Ras, Myc ou Bcl-2 dont l'expression constitutive dans le contexte approprié contribue à l'oncogenèse, alors qu'elle mène dans des cellules normales à l'arrêt de la prolifération ou à l'apoptose [15].

D'autres altérations génétiques, l'inactivation de suppresseurs de tumeurs ou anti-oncogènes, sont donc requises pour empêcher la mise en jeu de ces contre-mesures cellu-

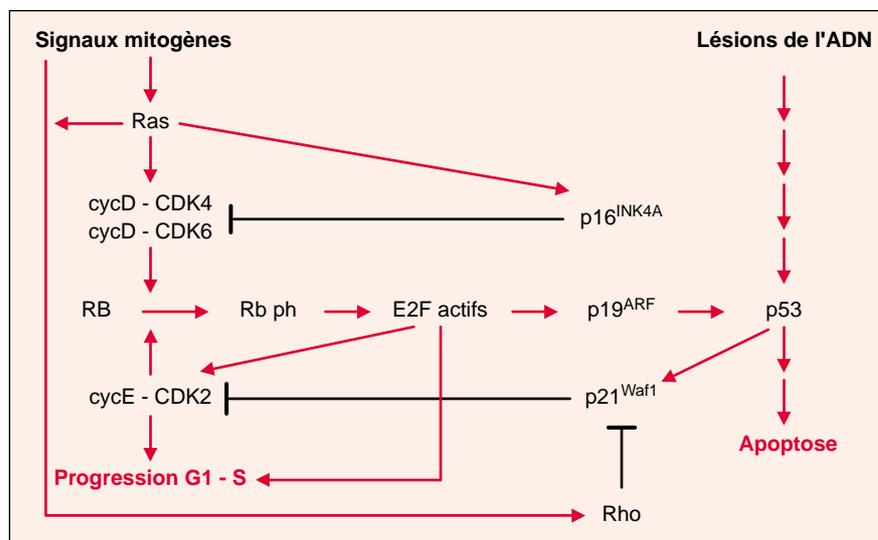


Figure 3. **GTPases, suppresseurs de tumeurs et contrôle du cycle cellulaire.** Les signaux mitogènes, en activant Ras, entraînent la phosphorylation de la pRb par les complexes cycline D-CDK4 et cycline D-CDK6, libérant ainsi les facteurs de transcription E2F actifs. Ceux-ci, à leur tour, stimulent la transcription de gènes impliqués dans la progression G1-S, parmi lesquels le gène de la cycline E. L'activation de Ras, entraînant en cascade l'activation de la GTPase Rho, inhibe la synthèse de la p21^{waf1}, et contribue ainsi à lever l'inhibition du complexe cycline E-CDK2. Toutefois, l'activation illicite de Ras entraîne la synthèse de l'inhibiteur p16^{INK4a}, bloquant ainsi l'activité des complexes cycline D-CDK4 et 6, et provoquant la sénescence des cellules. L'activation illicite des facteurs E2F entraîne, via la synthèse de la p19^{ARF}, l'activation de p53 et l'apoptose.

lares, et laisser ainsi libre cours à l'oncogenèse [9]. Ces suppresseurs de tumeurs représentent les gardiens du contrôle de la prolifération ainsi que de l'intégrité de la cellule. Deux mécanismes principaux de surveillance exercent leur action au niveau du cycle cellulaire, les voies pRB/p16^{INK4A} et p53/p19^{ARF} [14, 16]. En réponse à une stimulation constitutive de la voie Ras, le niveau d'expression des deux protéines codées par le locus *INK4A/ARF*, p16 et p19, est augmenté. p16 inhibe l'activité des complexes cycline D1-CDK4 et cycline D1-CDK6, et contribue ainsi à maintenir la pRB (produit du gène de susceptibilité au rétinoblastome), ainsi que ses homologues p107 et p130, dans un état hypophosphorylé qui leur confère des propriétés antiprolifératives [17]. Ainsi, l'inactivation des gènes codant pour p16 et pRB aboutit à des effets similaires, et n'est pas retrouvée de façon simultanée dans des tumeurs. L'augmentation de l'expression de p19 entraîne l'élévation du niveau de p53. Agissant comme un facteur de transcription, p53 induit à son tour l'expression de la p21^{waf1} qui antagonise l'action de plusieurs CDK agissant à divers points du cycle cellulaire et provoque l'arrêt de la prolifération; le niveau accru de p53 constitue également un signal proapoptotique. L'inactivation des voies pRB/p16 ou p53/p19, permet donc à la future cellule cancéreuse d'échapper à la sénescence ou à l'apoptose; l'invalidation de l'une d'entre elles, voire des deux, est constatée dans la très vaste majorité des tumeurs humaines.

L'immortalité constitue une des propriétés essentielles des cellules cancéreuses. Les mécanismes décrits plus haut, activation d'oncogènes et inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, contribuent également à l'immortalisation des cellules. Toutefois, ils n'y suffisent pas; l'immortalisation des cellules humaines nécessite le maintien de la longueur des télomères, mécanisme qui permet aux cellules d'échapper à la limitation du nombre de divisions que chaque cellule semble porter de façon intrinsèque. Les tissus humains normaux ont un faible niveau de télomérase (l'activité responsable du

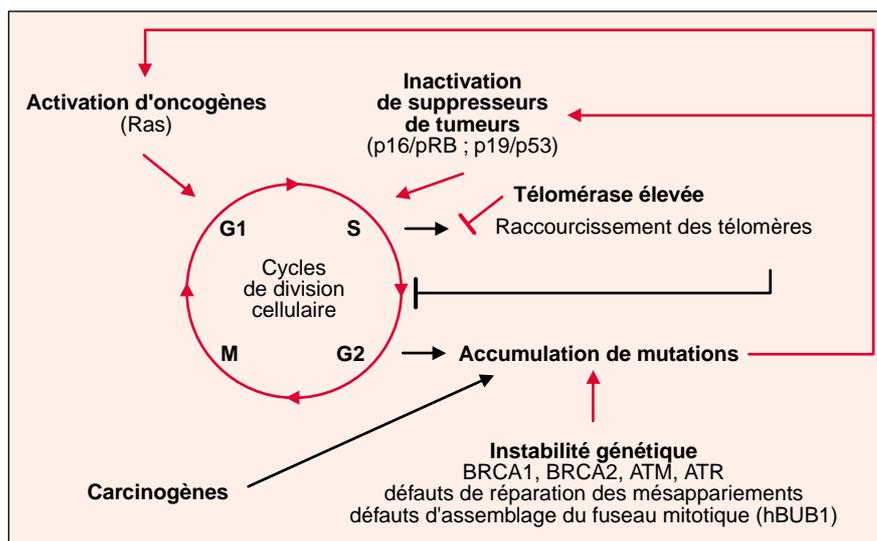


Figure 4. Mécanismes de l'oncogenèse. Les carcinogènes (substances chimiques, radiations ionisantes) ainsi que l'augmentation du nombre des divisions cellulaires provoquent l'accumulation de mutations qui résultent en l'activation d'oncogènes dominants et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Ces mécanismes sont amplifiés par l'augmentation de l'instabilité génétique résultant de la perte de plusieurs mécanismes assurant la stabilité et l'intégrité du génome. Enfin, l'augmentation de l'activité télomérase participe à l'immortalisation des cellules, prélude à l'acquisition du phénotype tumoral.

maintien de la longueur des télomères), alors que de nombreuses cellules tumorales et lignées cellulaires (ainsi que les cellules murines) possèdent une activité télomérase élevée. Il est à présent établi que l'augmentation de l'activité télomérase coopère avec l'inactivation des voies p16/pRB et/ou p19/p53 pour immortaliser les cellules épithéliales humaines, tissus dont dérivent 90 % des cancers [18]. C'est de la synergie entre immortalisation par ces mécanismes, levée des freins à la prolifération par inactivation de suppresseurs de tumeurs et transformation par les oncogènes dominants, que procède la genèse des cancers humains.

La contribution de l'instabilité génétique

L'apparition d'une tumeur humaine est le résultat d'un processus complexe comprenant au moins une demi-douzaine d'événements génétiques indépendants. Des calculs simples prenant en compte le taux de mutation connu des cellules non germinales (environ 10⁻⁷ par gène et par cycle cellulaire) prédisent que la

durée de la vie humaine ne suffirait pas pour atteindre une telle accumulation de mutations. L'étude de modèles tels que la tumorigenèse colique a permis de mettre en évidence une instabilité génétique accrue dans les cellules préumorales et tumorales [19]; plusieurs catégories principales d'instabilité semblent jouer un rôle important dans l'oncogenèse [20]. Tout d'abord, l'inactivation de plusieurs gènes responsables des mécanismes de réparation des mésappariements nucléotidiques au niveau de l'ADN est impliquée dans la genèse des cancers colorectaux héréditaires non polyposiques (HNPCC). Les défauts des mécanismes de surveillance des dommages de l'ADN (mutation des gènes *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM* pour *ataxia telangiectasia mutated* ainsi que du gène homologue *ATR*) sont impliqués dans la genèse de nombreuses tumeurs humaines (telles que les adénocarcinomes du sein et de l'ovaire pour *BRCA1*). Enfin, le défaut du mécanisme de vérification du bon assemblage du fuseau mitotique, notamment au niveau de l'attachement des chromosomes aux microtubules par les kiné-

tochores, mène rapidement à l'aneuploïdie qui semble être un mécanisme important dans la progression tumorale, et non un simple épiphénomène de la maladie, accélérant encore le rythme de l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs. Ainsi, l'accumulation facilitée de défauts génétiques contribue aux différentes étapes de la formation et de la progression des tumeurs, à savoir la perte du contrôle de la prolifération et l'immortalisation, puis pour les tumeurs solides le développement de la tumeur grâce notamment à l'induction d'une angiogenèse locale et, finalement, l'acquisition du phénotype métastatique, prélude à la subversion des fonctions vitales de l'organisme entier par la maladie.

Perspectives

Guérir le cancer apparaît de moins en moins comme une utopie, grâce notamment à l'essor exponentiel des connaissances dans le domaine de la biologie au cours de ces dernières années. En outre, la compréhension des mécanismes fondamentaux de l'oncogenèse ainsi que le raffinement de la définition des facteurs de risque ont accompli des progrès remarquables. Une des révolutions principales de ce début de siècle est constituée par le décryptage, bientôt complet, du génome humain, ainsi que le développement des technologies qui permettront dans un avenir proche le diagnostic moléculaire (et non plus seulement histologique) de chaque affection. Parallèlement, la compréhension détaillée au niveau moléculaire des voies de transduction ainsi que des mécanismes de surveillance cellulaire constituent déjà la source du développement de stratégies, chimiques ou géniques, destinées à pallier les défauts fonctionnels de chacun des oncogènes, suppresseurs de tumeurs et autres molécules impliquées dans l'oncogenèse. Il est très probable que ces progrès permettront, dans les années qui viennent, la mise en œuvre de stratégies thérapeutiques « à la carte », consistant en l'association particulière des divers traitements spécifiques à chacun des défauts moléculaires diagnostiqués pour chaque patient. Ce nouveau type de démarche biomédicale

dépasse d'ailleurs largement le cadre du cancer et constitue désormais la principale stratégie de lutte contre un grand nombre de maladies graves, encore aujourd'hui incurables ■

RÉFÉRENCES

- Tronick SR, Aaronson SA. Growth factors and signal transduction. In: Mendelsohn J, Howley PH, Israel MA, Liotta LA, eds. *The molecular basis of cancer*. Philadelphia: WB Saunders Co, 1995: 117-40.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 1991; 349: 117-27.
- Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998; 279: 509-14.
- Campbell SL, KhosraviFar R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 1998; 17: 1395-413.
- Chavrier P, Goud B. The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 466-75.
- Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 180-6.
- Downward J. Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 49-54.
- Zohn IM, Campbell SL, KhosraviFar R, Rossman KL, Der CJ. Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested. *Oncogene* 1998; 17: 1415-38.
- Weinberg RA. The cat and mouse games that genes, viruses, and cells play. *Cell* 1997; 88: 573-5.
- Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmuller L, Lautwein A, Schmitz F, Wittinghofer A. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 1997; 277: 333-8.
- Rosen N. Oncogenes. In: Mendelsohn J, Howley PH, Israel MA, Liotta LA, eds. *The molecular basis of cancer*. Philadelphia: WB Saunders Co, 1995: 105-16.
- Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, Vallar L. GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature* 1989; 340: 692-6.
- Collard JG. Signaling pathways regulated by Rho-like proteins: a possible role in tumor formation and metastasis. *Int J Oncol* 1996; 8: 131-8.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell* 1997; 88: 593-602.
- Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998; 281: 1317-22.

16. Sharpless NE, DePinho RA. The *INK4A/ARF* locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 22-30.

17. Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998; 12: 2245-62.

18. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 1999; 400: 464-8.

19. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-170.

20. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 386: 643-9.

MS2000

Summary

Cancer: GTPases and tumour suppressors

Cancer is a multistep disease which is inherent to the very nature of the cellular machinery. It consists primarily in the loss of control of cellular proliferation, immortalisation, and finally invasion of other tissues by the fully malignant cells. Cells normally control their proliferation in response to specific signals that result in intracellular cascades of molecular events that involve molecular switches such as Ras family GTPases. Cancer results from the synergistic activation of dominant oncogenes, the products of many such genes are normally involved in the transduction of mitogenic signals, and inactivation of tumour suppressors, some of which are involved in cell cycle control. In addition, the maintenance of telomere length is required for the immortalisation of human epithelial cells. These mechanisms are amplified by the loss of cellular checkpoints ensuring the repair of damaged DNA, and stability of the genome. Full understanding of these defects, and the development of novel diagnostic as well as therapeutic anti cancer strategies based on molecular approaches will constitute one of the most formidable challenges of the beginning of the third millennium.