

## Activation des oncogènes par mutation ponctuelle

C'est en changeant les propriétés de son produit que les mutations ponctuelles peuvent activer un oncogène et être à l'origine d'un cancer. Ce mécanisme est probablement en cause dans de nombreux cas de cancérogenèse chimique.

**Marie-Henriette**

**Loucheux-Lefebvre**

Directeur de Recherche au Cnrs  
Directeur de l'unité Inserm U. 124

L'étude en génétique moléculaire de l'induction et du développement des tumeurs humaines et animales a connu l'essor que l'on sait grâce, d'une part, aux rapides progrès technologiques dont a été l'objet la biologie moléculaire et, d'autre part, à l'élaboration d'une théorie unificatrice du cancer qui reconnaissait le rôle décisif de l'activation de gènes de cancer, ou oncogènes, dans la cancérogenèse, qu'elle soit d'origine virale ou chimique [1]. Deux étapes importantes ont permis la mise en place de cette théorie unificatrice : la première est celle de la découverte des proto-oncogènes cellulaires, qui a mis en évidence le fait que les cellules normales contiennent des gènes très semblables à ceux trouvés dans des virus hautement cancérogènes [2]. La seconde concerne le fait que certains proto-oncogènes peuvent être activés par mutations ponctuelles\*, ces dernières ayant été caractérisées sur de l'ADN cellulaire de tumeurs humaines [3-5].

L'activation de ces oncogènes est identifiée grâce aux expériences de transfection qui utilisent la propriété de certaines cellules fibroblastiques d'embryons de souris (NIH 3T3) d'intégrer dans leur génome de l'ADN ajouté au milieu de culture et d'exprimer l'information qu'il code\*\*. Dans la grande majorité des cas, le gène responsable des propriétés

transformantes de l'ADN isolé à partir de tumeurs est un proto-oncogène de la famille *ras* (Harvey-*ras* (H-*ras*), Kirsten-*ras* (K-*ras*), et N-*ras*). Les quelques oncogènes autres que *ras* présentant aussi une propriété transformante sont rappelés dans le *Tableau 1*. Il a été montré que l'ADN obtenu à partir d'un certain nombre de tumeurs pouvait dans environ 10 à 20 % des cas [6], induire des modifications morphologiques dans les cultures de cellules NIH 3T3 alors que l'ADN équivalent extrait de tissus normaux ne présentait pas cette propriété.

### Activation du gène *ras*

Les premiers travaux mettant en évidence l'activation des proto-oncogènes ayant été réalisés sur des cultures de cellules tumorales, des critiques se sont élevées : elles faisaient remarquer que la propriété transformante aurait pu être acquise à la suite d'un changement secondaire consécutif à l'adaptation, mais ne reflétant pas une propriété de la cellule tumorale de départ [7, 8]. Depuis, les études réalisées directement sur les tumeurs « fraîches » dont les mutations, après traitement de l'ADN à l'aide des enzymes de restriction, ont été identifiées par hybridation soit avec des sondes clonées soit avec des oligonucléotides\*\*\*, ont montré qu'une mutation ponctuelle pouvait être

\* Une mutation ponctuelle est le changement d'une base par une autre.

\*\* Un schéma de la transfection peut être trouvé dans la figure 2 de la référence 1.

\*\*\* Voir lexiques m/s n° 2, vol. 2, p. 104 et m/s n° 7, vol. 2, p. 398.

#### ADRESSE

M.-H. Loucheux-Lefebvre : Inserm U.124 : Expression des gènes et cancérogenèse chimique, Institut de recherches sur le cancer de Lille, 59045 Lille Cedex.

## RÉFÉRENCES

1. Stéhelin D. Les oncogènes cellulaires, clés de la cancérogenèse. *médecine/sciences* 1985 ; 1 : 12-6.
2. Stéhelin D, Varnus HE, Bishop JM, Vogt PK. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma virus is present in normal avian DNA. *Nature* 1976 ; 260 : 170-3.
3. Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T 24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 1982 ; 300 : 149-52.
4. Taparowski E, Suard Y, Fasano O, Shimizu K, Goldfarb M, Wigler M. Activation of the T 24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature* 1982 ; 300 : 762-5.
5. Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, et al. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 1982 ; 300 : 143-9.
6. Cooper GM, Lane MA. Cellular transforming genes and oncogenes. *Biochim Biophys Acta* 1984 ; 738 : 9-20.
7. Duesberg PH. Retroviral transforming gene in normal cells. *Nature* 1983 ; 304 : 219-26.
8. Rubin H. Mutations and oncogenes — cause or effect. *Nature* 1984 ; 309 : 518.
9. Santos E, Martin-Zanca D, Reddy EP, Pietrotti MA, Della Porta G, Barbacid M. Malignant activation of a *K-ras* oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient. *Science* 1984 ; 223 : 661-4.
10. Fujita J, Yoshida O, Yuasa Y, Rhim JS, Hatanaka M, Aaronson S. *Ha-ras* oncogenes are activated by somatic alterations in human urinary tract tumours. *Nature* 1984 ; 309 : 464-6.
11. Ishikawa F, Takaku F, Hayashi K, Nagao M, Sugimura T. Activation of rat *c-raf* during transfection of hepatocellular carcinoma DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 3209-12.

Tableau I  
GÈNES CELLULAIRES AUTRES QUE CEUX DE LA FAMILLE RAS  
AYANT DES PROPRIÉTÉS  
TRANSFORMANTES SUR LES CELLULES NIH 3T3

Nom du gène et son origine	Réf.	Observations
<i>8-lym</i> Lymphome humain des cellules B.	[31]	Activation par recombinaison de <i>met</i> et de <i>tpr</i> ( <i>translocated promoter region</i> ) [38]
<i>met</i> Lignée cellulaire à partir de cellules d'un ostéosarcome humain activé par N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.	[32]	
<i>mcf-2 — mcf-3</i> Lignée cellulaire MCF-7 à partir de cellules d'une tumeur du sein.	[33]	
<i>c-raf</i> Tumeur humaine de l'estomac et hépatocarcinome chimio-induit de rat	[34]	L'activation est consécutive à un réarrangement du gène au cours de la transfection [11].
<i>neu</i> Neuroblastome chimio-induit de rat	[35]	
<i>dbl</i> Lymphome humain des cellules B	[36]	
<i>ret</i> Lymphome humain des cellules T	[12]	L'activation est consécutive à un réarrangement du gène au cours de la transfection
<i>mel</i> Mélanome humain	[37]	

mise en évidence dans environ 10 % des cas [9, 10].

Une autre critique qui peut être faite concerne la méthode d'intégration de l'ADN dans le génome des cellules NIH 3T3, durant laquelle certaines recombinaisons pourraient se faire. C'est effectivement ce qui a été montré, mais uniquement pour d'autres oncogènes que ceux de la famille *ras*. C'est le cas du gène *raf*, dont les propriétés transformantes mises en évidence sur les cellules NIH 3T3 viennent d'être attribuées non pas à une mutation, mais à un réarrangement se faisant au cours du transfert de l'ADN tumoral [11]. Un tel réarrangement avait aussi été mis en évidence pour le gène *ret* [12].

### Mutations ponctuelles et augmentation d'expression

L'étude des gènes *ras* transformants isolés de tumeurs humaines a permis de montrer que ces oncogènes pouvaient être activés

à la suite de mutations ponctuelles (*figure 1*). Ces dernières ne sont pas localisées au hasard et on a constaté que, pour être actives, elles devaient modifier les propriétés codantes du 12<sup>e</sup>, du 13<sup>e</sup> ou du 61<sup>e</sup> codon. Mais il est bien évident que d'autres mutations peuvent exister dans les tumeurs sans donner de gènes transformants décelables par transfection dans les cellules NIH 3T3 ou plus exactement cette technique de transfection ne permet pas de tester des mutations autres que celles en 12, 13 et 61, c'est-à-dire des mutations qui ne confèrent que des propriétés faiblement transformantes. La mutation de *ras* n'est cependant pas la seule voie d'activation de l'oncogène : l'augmentation d'expression de gènes *ras* normaux peut aussi être impliquée dans la cancérogenèse humaine et conduit, lors de la transfection, à un changement de morphologie des cellules NIH 3T3 [13]. Cette augmentation d'expression, qui a été montrée par exemple dans

certains cancers du sein et plusieurs tumeurs du colon [14-17], peut elle-même être expliquée par deux mécanismes différents. Dans le premier, la région codant pour la protéine peut être placée, à la suite d'un remaniement chromosomique, sous la dépendance du système de régulation d'un autre gène et conduire à une expression importante de l'information génétique du proto-oncogène. Dans le second, le proto-oncogène est répliqué dans les cellules en multiples copies et l'augmentation d'expression est le résultat de cette amplification.

Dans une tumeur gastrique, les deux allèles *ras*, tous deux activés, le sont par des mécanismes différents : dans l'un, il s'agit d'une

mutation ponctuelle, dans l'autre, normal, c'est une amplification de 30 à 50 fois qui est observée [18]. Les auteurs suggèrent que ceci corresponde à deux étapes différentes d'activation. Dans un travail tout récent [19] réalisé à la fois sur une tumeur pancréatique humaine et un ganglion métastatique, une même mutation sur le gène *ras* ainsi qu'une amplification de 3 à 6 fois du gène activé ont été observées, aussi bien sur la tumeur primaire que sur le ganglion.

### Phénomène précoce ou tardif ?

Le fait que les cellules NIH 3T3 soient déjà partiellement transformées et n'auraient besoin que

d'une ultime intervention pour devenir complètement malignes a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'acquisition des propriétés transformantes par la mutation du gène *ras* représentait un événement tardif de la tumorigénèse. Certains travaux pouvaient d'ailleurs être interprétés en ce sens [20, 21] qui suggéraient que l'acquisition de propriétés de plus en plus malignes se faisait après des passages nombreux de cellules en culture, en relation avec l'activation d'un gène *ras*.

Cependant, des preuves expérimentales montrant que l'activation du gène *ras* ne constituait pas toujours un événement tardif dans le développement tumoral ont pu être obtenues grâce à la mise en

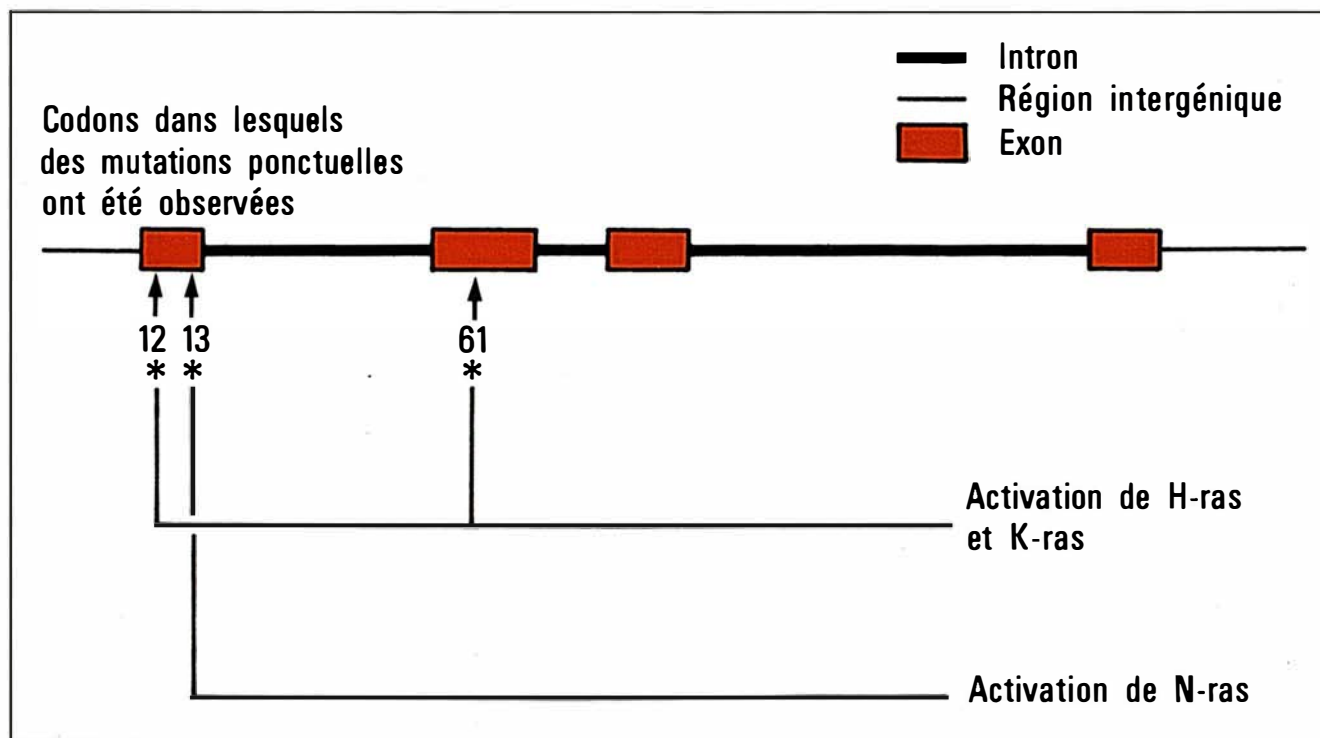


Figure 1. La famille des gènes *ras*, très conservés au cours de l'évolution, code pour un groupe de protéines, p21, de masse 21 000 daltons. Trois membres de cette famille ont été identifiés dans les cellules humaines : H-ras, K-ras et N-ras. Les deux premiers, H-ras et K-ras, ont des équivalents viraux (virus du sarcome murin de Harvey et de Kirstein), le troisième, N-ras, n'en a pas et a été caractérisé dans une lignée établie à partir des cellules d'un neuroblastome humain. L'activation de ces oncogènes est due à des mutations ponctuelles en des sites spécifiques et conduisant à des modifications dans la séquence protéique. A partir de l'ADN extrait de tumeurs humaines, on a pu montrer que, pour H-ras et K-ras, ce sont essentiellement dans les codons codant pour les acides aminés en position 12 et 61 que se trouvent les mutations. Pour le N-ras, la mutation a été observée sur le codon 13.



## RÉFÉRENCES

12. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, *ret*, by DNA rearrangement. *Cell* 1985 ; 42 : 581-8.
13. Pulciani S, Santos E, Long LK, Sorrentino V, Barbacid M. *Ras* gene amplification and malignant transformation. *Mol Cell Biol* 1985 ; 2836-41.
14. Ohuchi N, Thor A, Page DL, Horan Hand P, Halter SA, Schlom J. Expression of the 21,000 molecular weight *ras* protein in a spectrum of benign and malignant human mammary tissues. *Cancer Res* 1986 ; 46 : 2511-9.
15. Spandidos DA, Agnantis N. Human malignant tumors of the breast, as compared to their respective normal tissue, have elevated expression of the Harvey *ras* oncogene. *Anti-cancer Res* 1984 ; 4 : 269-72.
16. Thor A, Horan Hand P, Wunderlich D, Caruso A, Muraro R, Schlom J. Monoclonal antibodies define differential *ras* gene expression in malignant and benign colonic diseases. *Nature* 1984 ; 311 : 562-5.
17. Horan Hand P, Thor A, Wunderlich D, Muraro R, Caruso A, Schlom J. Monoclonal antibodies of predefined specificity detect activated *ras* gene expression in human mammary and colon carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 5227-31.
18. Bos JL, Verlaan-de Vries M, Marshall CJ, Veeneman GH, van Boom JH, van der Eb AJ. A human gastric carcinoma contains a single mutated and an amplified normal allele of the *Ki-ras* oncogene. *Nucleic Acids Res* 1986 ; 14 : 1209-17.
19. Yamada H, Sakamoto H, Taira M, et al. Amplification of both *c-Ki-ras* with a point mutation and *c-myc* in a primary pancreatic cancer and its metastatic tumors in lymph nodes. *Jpn J Cancer Res*, 1986 ; 77 : 370-5.
20. Sukumar S, Pulciani S, Doniger JA, et al. A transforming *ras* gene in tumorigenic guinea pig cell lines initiated by diverse chemical carcinogenesis. *Science* 1984 ; 223 : 1197-9.
21. Vousden KH, Marshall CJ. Three different activated *ras* genes in mouse tumours ; evidence for oncogene activation of a mouse lymphoma. *EMBO J* 1984 ; 3 : 913-7.
22. Kahn A. Hybridation moléculaire : les polymorphismes de taille des fragments de restriction (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism). *médecine/sciences* 1986 ; 2 : 152-3.
23. Quintanilla M, Brown K, Ramsden M, Balmain A. Carcinogen specific mutation and amplification of the *ras<sup>H</sup>* gene during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 1986 ; 322 : 78-80.
24. Guerrero I, Calzada P, Mayer A, Pellicer A. A molecular approach to leukemogenesis : mouse lymphomas contain an activated *c-ras* oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 202-5.
25. Sukumar S, Notario V, Martin-Zanca D, Barbacid M. Induction of mammary carcinoma in rats by nitrosomethylurea involves malignant activation of *H-ras-1* locus by single point mutations. *Nature* 1983 ; 306 : 658-61.
26. Marshall CJ, Vousden KH, Phillips DH. Activation of *c-Ha-ras-1* proto-oncogene by *in vitro* modification with a chemical carcinogen, benzo (a) pyrene diol epoxide. *Nature* 1984 ; 310 : 586-9.
27. Vousden KH, Bos JL, Marshall CJ, Phillips DH. Mutations activation human *c-Ha-ras-1* proto-oncogene (*H RAS 1*) induced by chemical carcinogens and depurination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 1222-6.
28. Galiègue-Zouitina S, Bailleul B, Ginot YM, Perly B, Vigny P, Loucheux-Lefebvre MH. N<sup>2</sup> Guanyl and N<sup>6</sup> adenylation of chicken erythrocyte DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Res* 1986 ; 46 : 1858-63.
29. Rhim JS, Fujita J, Arnstein P, Aaronson SA. Neoplastic conversion of human keratinocytes by adenovirus 12-SV 40 virus and chemical carcinogens. *Science* 1986 ; 232 : 385-8.
30. Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. Multiple independent activations of the *neu* oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p 185. *Cell* 1986 ; 45 : 649-57.
31. Goubin G, Goldman DS, Luce J, Neiman PE, Cooper GM. Molecular cloning and nucleotide sequence of a transforming gene detected by transfection of chicken B-Cell lymphoma DNA. *Nature* 1983 ; 302 : 114-9.
32. Cooper CS, Park M, Blair DG, et al. Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* 1984 ; 311 : 29-33.
33. Fasano D, Birnbaum D, Edlund L, Fogh J, Wigler M. New human transforming genes detected by a tumorigenicity assay. *Mol Cell Biol* 1984 ; 4 : 1695-705.
34. Fukui M, Yamamoto T, Kawai S, Maruo K, Toyoshima K. Detection of a *raf*-related and two other transforming DNA sequences in human tumors maintained in nude mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985 ; 82 : 5954-8.
35. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, et al. The *neu* oncogene : an *erbB*-related gene encoding a 185,000 M tumor antigen. *Nature* 1984 ; 312 : 513-6.
36. Eva A, Aaronson SA. Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-Cell lymphoma. *Nature* 1985 ; 273-5.
37. Padua RA, Barras N, Currie GA. A novel transforming gene in a human malignant melanoma cell line. *Nature* 1984 ; 311 : 671-3.
38. Park M, Dean M, Cooper CS et al. Mechanism of *met* oncogene activation. *Cell* 1986 ; 45 : 895-904.

œuvre de modèles permettant de suivre, sur des animaux, les différentes étapes de la progression tumorale. Le modèle le plus étudié a été celui de la peau de souris sur qui on peut induire des tumeurs par traitement (badigeonnage) avec un cancérigène chimique. Les deux substances qui ont été utilisées, le diméthyl benzanthracène (DMBA) et N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) provoquent tous deux des tumeurs à la suite d'une unique application. Mais ces deux cancérigènes n'interagissent pas avec l'ADN selon le même mécanisme : l'un, le DMBA, est d'abord métabolisé et provoque surtout des transversions\* A-T, alors que l'autre, le MNNG, est un agent méthylant conduisant à des transitions\* G-A. Dans cet essai, on a trouvé pour la majorité des tumeurs induites par le DMBA, un polymorphisme\*\* XbaI sur le *ras* muté, polymorphisme qu'on ne retrouve pas sur l'oncogène *ras* des tumeurs induites par le MNNG. Or, si la modification du *ras* était une conséquence de la progression tumorale, on pourrait s'attendre à ce que sa modification soit la même quel que soit le cancérigène utilisé. Le résultat obtenu semble donc bien prouver que les mutations sur *ras* interviennent dès l'étape d'initiation par le cancérigène [23].

### Interaction directe avec le cancérigène ?

Un grand nombre d'études réalisées sur des tumeurs humaines [3, 5, 9, 10, 14, 15-19] ou animales [21, 23-25] suggèrent fortement — mais indirectement — que les

\* Une transition correspond à une mutation dans laquelle une base purique ou pyrimidique est remplacée par une base de même nature. Dans une transversion, c'est l'inverse.

\*\* Certaines mutations ponctuelles peuvent intervenir soit dans le site de clivage d'une enzyme de restriction donnée, et le faire ainsi disparaître, soit créer un nouveau site pour cette enzyme. Il s'ensuit, lors de la digestion enzymatique, une modification de la taille des segments d'ADN, connue sous le nom anglais de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Pour une explication plus détaillée voir [22].

mutations sur le gène *ras* sont induites par l'action in vivo des cancérrogènes chimiques. Une autre approche in vitro a également été réalisée dans le but d'établir une relation causale entre l'action des cancérrogènes et l'induction de mutation : c'est celle qui consiste à induire des lésions sur l'ADN du gène *ras* par action directe avec le cancérrogène ultime et, après avoir mis en évidence l'activité du gène *ras* ainsi modifié sur les cellules NIH 3T3, à caractériser la mutation qui en est responsable et relier sa nature (transversion ou transition) au type de lésion créée par le cancérrogène. Le benzo (a) pyrène a été le premier cancérrogène chimique à être étudié par cette technique [26, 27] : plusieurs mutations localisées soit dans le codon 12, soit dans le codon 61 ont été identifiées : elles correspondent toutes à des transversions, soit sur la guanine, soit sur l'adénine. Deux des transversions ainsi observées n'avaient pu être mises en évidence dans les systèmes bactériens, qui sont très largement utilisés pour les études du pouvoir mutagène de substances chimiques : autrement dit, les conclusions des études de mutagenèse réalisées sur des systèmes bactériens ne peuvent être généralisées aux systèmes mammifères, en particulier l'humain.

Il y aurait donc intérêt à étendre ces études à d'autres substances chimiques, ou, plus précisément, à certains autres produits qui seraient choisis d'une part parce que les lésions qu'ils créent sur l'ADN sont parfaitement connues et d'autre part, parce qu'ils peuvent servir de modèle dans la transformation cancéreuse des cellules humaines. Parmi ces cancérrogènes, l'oxyde de nitro 4 quinoléine (4NQO) répond à ces deux conditions : l'interaction de son cancérrogène ultime avec l'ADN a été élucidée [28] et une toute récente publication [29] met en évidence le rôle du 4NQO dans l'établissement d'une culture de cellules épithéliales tumorales humaines, en faisant ainsi un modèle de cancérrogène chimique chez l'homme, dont il faudrait déterminer s'il peut activer un oncogène.

*m/s n° 1 vol. 3, janvier 87*

### **Mutation ponctuelle dans neu**

Comme cela a été rappelé dans le *Tableau I*, quelques oncogènes autres que *ras* sont susceptibles d'induire des foyers dans des cellules NIH 3T3. Leur mécanisme d'activation n'a pas été élucidé sauf, tout récemment, pour l'un d'entre eux, l'oncogène *neu* [30].

Dans ce cas, c'est aussi l'existence d'une mutation ponctuelle, probablement consécutive à une lésion de l'ADN, qui est responsable de l'activation de l'oncogène : *neu* a en effet été mis en évidence à partir d'ADN isolé de lignées cellulaires établies à partir de cellules de neuroblastomes chimio-induits chez le rat.

**En conclusion**, les oncogènes *ras* activés ont pu être identifiés dans environ 15 % de l'ensemble des tumeurs humaines, quelle que soit leur origine. Leur rôle dans le développement tumoral n'a pas été élucidé et de nombreuses voix se sont élevées pour dire qu'ils n'étaient peut-être activés que dans les dernières étapes de la progression tumorale, comme conséquence du désarroi génétique des cellules cancéreuses. Cependant, les résultats que nous venons de décrire concernant les mutations ponctuelles observées dans un certain nombre de cas attribuent un rôle causal à l'activation de *ras* dans le développement tumoral. C'est tout au moins ce qui peut être affirmé à présent à la suite des études réalisées sur des modèles animaux, bien que le nombre de mutations mis en évidence soit relativement faible.

Le problème de la détection des mutations et de leur incidence sur l'expression des oncogènes est donc posé. En effet, les mutations qui ont été identifiées l'ont été à la suite d'un avantage de croissance sélectif et les méthodes qui permettent leur étude sont non seulement très peu nombreuses mais aussi parfois très lourdes à mettre en œuvre, comme la transfection sur cellules NIH 3T3. La réalisation de nouveaux essais utilisant des critères biologiques différents permettra de franchir une étape supplémentaire ■

### **Summary**

Recent developments in cancer research have shown that the changed activity of certain single genes, termed as cellular oncogenes or proto-oncogenes can lead to neoplastic development. The tumorigenic behavior results from the constitutive switch-on of unmodified cellular oncogenes and/or from modifications in their DNA sequence, due to point mutations or more extensive DNA-rearrangements. In particular the point mutations identified in the *ras* family of oncogenes are clearly responsible for the acquisition of the transforming potential. This suggests that there may be a direct link between exposure to agents which damage DNA and genetic changes leading to malignancy.

### **TIRÉS À PART**

M.-H. Loucheux-Lefebvre : Inserm U.124 : Expression des gènes et cancérogenèse chimique, Institut de recherches sur le cancer de Lille, 59045 Lille Cedex.