

Summary

Evidence that oncogene activation contributes to the induction and maintenance of human cancers is becoming increasingly compelling. Specific mechanisms leading to neoplastic transformation include point mutations, chromosomal translocations, gene amplification or deletion and other destabilizing genetic events. Animal studies have shown the high induction of tumors by chemical carcinogens, the *ras* oncogenes often being the target for DNA-damaging agents where activation is correlated with their known mutagenic effects. In man, one of the best examples of the relationship between unrepaired DNA lesions, mutations and carcinogenesis is the syndrome, *Xeroderma pigmentosum* (XP). The absence of excision repair in this rare, autosomal recessive disorder, results in a high predisposition to neoplasms in the sun-exposed skin. We have screened 8 XP tumors for activated transforming genes using 3T3 transfection. In 2 tumors from a XP child, an activated *N-ras* oncogene was detected. Characterization by synthetic oligonucleotide probes showed a critical base substitution in codon 61, at a potential pyrimidine dimer. Many of the XP tumors showed *Ha-ras* gene rearrangement and amplification sometimes together with *c-myc* amplification. The presence of several altered oncogenes in these XP tumors is probably due to the high level of unrepaired UV-induced lesions which persist in the skin. Hence XP serves as a very good model for studying carcinogenesis in man where specific lesions result in an initiating mutation (e.g. *N-ras* activation) which together with amplified gene (e.g. *Ha-ras*, *c-myc*) expression lead to tumor formation.

Activation des oncogènes dans les tumeurs épithéliales isolées de malades atteints du Xeroderma pigmentosum

Alain Sarasin, Leela Daya-Grosjean,
Horacio G. Suarez, Bertrand Chrétien,
Marie-Françoise Avril

L'activation d'oncogènes est en partie liée à l'initiation de la cancérogénèse [1]. Quatre processus différents d'activation des oncogènes ont été décrits et analysés : l'insertion d'un rétrovirus près d'un proto-oncogène ; la translocation chromosomique ; l'amplification génique et la mutation ponctuelle. Dans 10 à 15 % des tumeurs humaines, il a été détecté des mutations ponctuelles sur certains proto-oncogènes (essentiellement ceux de la famille *ras*) qui confèrent au gène muté la capacité de transformer des lignées établies de fibroblastes de souris (NIH 3T3) ou de rat [2]. Cette activité transformante est liée à une modification d'un acide aminé à un endroit précis de la protéine ras (P21) rendant cette protéine incapable d'effectuer son cycle enzymatique normal. Cette enzyme semble être impliquée dans la transduction de signaux à travers la membrane cytoplasmique [3].

Le rôle majeur des lésions sur l'ADN

Les cancérogènes chimiques induisent avec une forte fréquence l'apparition de cancers chez les animaux

traités. L'étude de l'activation des gènes *ras* dans ces tumeurs chimio-induites a montré que la nature du changement de base était liée au type de cancérogène utilisé et au type de lésion induite sur la molécule d'ADN. Ainsi certaines substances alkylantes (cancérogènes chimiques, drogues antitumorales) ont la propriété de former des lésions O⁶-méthyl-guanine sur l'ADN traité. En l'absence d'une réparation parfaite de cette lésion, celle-ci pourra s'apparier au moment de la réplication de l'ADN lésé avec une thymine au lieu de la cytosine qui s'apparie naturellement avec la guanine non modifiée. Dans ces conditions, la conséquence de la présence de l'O⁶-Me-G sera une mutation ponctuelle transformant une paire de bases G:C en A:T. Ainsi, Barbacid a montré que dans 100 % des cancers mammaires de rat soumis à l'alkylant nitroso-méthylurée (NMU), l'activation du gène *Ha-ras* était due à une mutation ponctuelle de la paire de bases G:C en A:T correspondant au codon 12 de la protéine P21 (3). Le spectre des mutations obtenu sur les oncogènes activés provenant de tumeurs animales consécutives au traitement par des cancérogènes est donc similaire au spectre des mutations déterminé

sur des systèmes modèles, *in vitro*, ou chez les bactéries après traitement de l'ADN par ces mêmes cancérigènes. Il serait particulièrement intéressant de pouvoir établir ce même type de corrélation chez l'homme et de pouvoir en déduire le mécanisme de la cancérogenèse à partir de l'étude du spectre de mutation observé sur les proto-oncogènes mutés. Le *Xeroderma pigmentosum* est, chez l'homme, l'exemple le plus pertinent où il apparaît possible d'établir ce type de corrélation. En effet, cette maladie transmise de façon héréditaire et récessive se caractérise par l'apparition, avec une fréquence particulièrement élevée, de tumeurs cutanées dans les zones exposées au soleil [4, 5]. Cette cancérogenèse est liée à la présence de lésions induites par les UV sur l'ADN cellulaire (en particulier les dimères de pyrimidine et les pyrimidines (6-4) pyrimidones). L'absence de réparation de l'ADN lésé, caractéristique des cellules isolées de malades atteints du *Xeroderma pigmentosum*, est directement responsable de la production de mutations ponctuelles localisées en face de la lésion, c'est-à-dire de deux pyrimidines adjacentes (figure 1).

Les lésions sur l'ADN sont-elles responsables de l'activation des oncogènes ?

Nous avons analysé l'ADN provenant de huit tumeurs épithéliales (carcinomes baso- ou spinocellulaires), prélevées chirurgicalement chez des enfants XP, pour leur activité transformante dans le test des cellules de souris NIH 3T3. Les ADN isolés de deux tumeurs indépendantes provenant du même malade (BY) ont été capables d'induire des foyers de cellules transformées. L'activité transformante était due au gène *N-ras* (figure 2A) [4, 6]. Nous avons déterminé la mutation ponctuelle responsable de cette activité transformante, en utilisant la méthode d'amplification génique *in vitro* suivie d'hybridation différentielle avec des oligonucléotides synthétiques (figure 2B) [7]. Le codon 61 du gène *N-ras* transformant a subi une mutation ponctuelle ce qui le fait coder pour l'histidine au lieu de la glutamine [8] (figure 3). Cette modification est suffisante pour

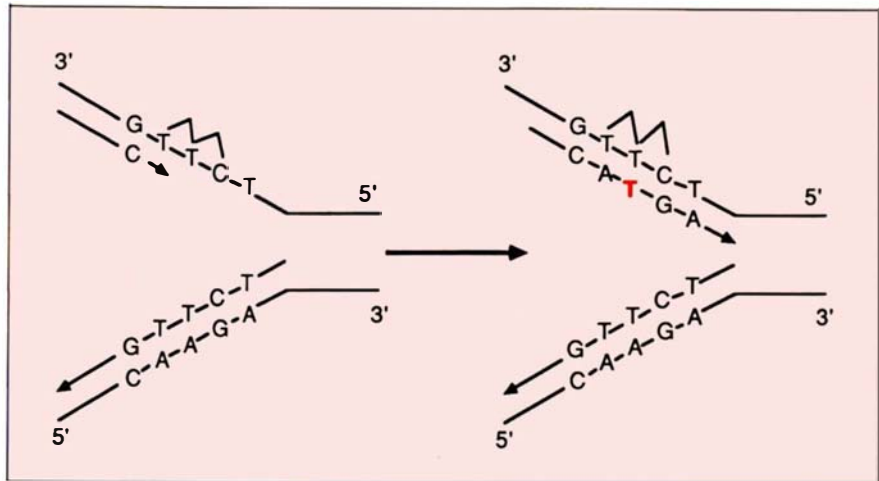


Figure 1. **Modèle de création de mutation ponctuelle pendant la réplication de l'ADN contenant des lésions induites par les UV.** La fourche de réplication est normalement bloquée par les lésions produites par les UV entre deux thymines adjacentes : dimère de thymine ou thymine (6-4) thymine [4]. Une éventuelle réplication de ces lésions (TT ou TC) se traduira par une erreur d'appariement conduisant à une mutation ponctuelle opposée à l'une des bases impliquées dans la lésion. Les séquences indiquées correspondent à celles entourant le codon 61 du gène *N-ras* (voir figure 3).

conférer au gène *N-ras* ainsi muté une activité de transformation cellulaire [3].

Nous pouvons donc faire l'hypothèse qu'après irradiation UV des cellules épithéliales de la peau exposée, et en absence de réparation de l'ADN, une lésion s'est produite sur les pyrimidines adjacentes en position 182-183 ou 183-184 du gène *N-ras*. La réplication d'une telle lésion peut alors donner naissance à une erreur d'appariement conduisant à l'incorporation de la thymine, au lieu de l'adénine, en face d'une des thymines impliquées dans la lésion (figures 1 et 3). Ce type de mutation est observé fréquemment avec des systèmes modèles *in vitro* ou des sondes exogènes *in vivo* telles que les virus navettes ou les virus animaux (SV40) irradiés aux UV [9, 10]. Cette activation du gène *N-ras* n'existe pas dans les fibroblastes non transformés du même malade. Ceci indique que la prédisposition génétique évidente à développer des cancers chez le malade XP n'est pas due à une transmission héréditaire d'un gène *N-ras* muté.

De façon intéressante, Van der Lubbe

et al. [11] ont irradié aux UV *in vitro* l'ADN cloné du proto-oncogène *N-ras* et testé directement son activité transformante après transfection de l'ADN lésé dans des cellules de souris NIH-3T3. La grande majorité des mutations ponctuelles se trouvaient sur le codon 61 du gène *N-ras* au niveau d'une des deux thymines de ce codon. Ainsi la même conclusion que celle déduite des résultats sur les tumeurs XP a été proposée, à savoir l'induction d'une lésion sur les pyrimidines 182-183-184 suivie de mutations au niveau de l'une des thymines du codon 61. De plus, le traitement *in vitro* de l'ADN irradié par une enzyme spécifique, qui élimine les dimères de pyrimidine et non les Py(6-4)Py, diminue fortement l'activité transformante de l'ADN. Ceci suggère que les dimères de pyrimidine sont essentiellement responsables de cette mutagenèse [11].

Dans l'exemple humain du XP, nous aurions donc une situation comparable à celle obtenue lors de traitements par des cancérigènes donnés chez les animaux. Nous pouvons donc en déduire un mécanisme précis d'activation des oncogènes, par mutation

ponctuelle, à partir d'un type donné de lésions sur l'ADN cellulaire.

Amplification d'oncogènes sous l'effet des ultraviolets

Il est toutefois connu que l'activation par mutation ponctuelle d'un gène *ras* n'est pas suffisante pour permettre le développement tumoral [3]. Ainsi, il a été démontré que des tumeurs bénignes de la peau (papillomes) d'animaux traités par des cancérogènes faibles contiennent déjà un gène *ras* (souvent *Ha-ras 1*)

transformant, bien que la grande majorité des ces tumeurs régressent et ne donnent jamais de cancer [12]. Il semble que des événements génétiques secondaires soient nécessaires pour promouvoir le processus tumoral à partir d'une cellule initiée. Dans cette optique, nous avons recherché dans les tumeurs épithéliales de malades XP s'il existait d'autres modifications génétiques, en particulier au niveau des autres oncogènes. Ainsi, nous avons démontré l'existence d'amplification de proto-oncogènes (*c-myc* et/ou *Ha-*

ras) dans un nombre important de tumeurs [6, 8]. En particulier, le gène *Ha-ras* est amplifié et quelquefois réarrangé dans 30-40 % des tumeurs épithéliales XP (figure 4), ce qui est significativement différent de ce qui se passe en général dans l'ensemble des tumeurs humaines, où ce chiffre est estimé autour de 1 % [3]. Il est donc intéressant de déterminer s'il existe un rapport entre le fort taux d'amplification génique observé dans les tumeurs des malades XP et le type de lésions responsables de la mutagenèse. En effet, il a été démontré que les lésions qui bloquent la progression normale de la réplication de l'ADN, induisent l'amplification non spécifique de portions d'ADN, probablement grâce à des cycles multiples de réinitiation [13]. Les dimères de pyrimidine sont particulièrement aptes à induire de tels cycles de réplication abortive. Ainsi, à nouveau la connaissance de l'agent initiateur des tumeurs (les lésions UV-induites) nous permet d'envisager un scénario de tumorigenèse chez l'homme. La présence de lésions non réparées sur l'ADN cellulaire va conduire au cours de la réplication au blocage de la synthèse d'ADN, suivi de cycle de réinitiation et donc à l'amplification de séquences probablement au hasard. Si un gène conférant un avantage sélectif (*c-myc* ou *Ha-ras*) est amplifié, entraînant ainsi la surexpression de la protéine correspondante, la cellule proliférera plus rapidement et pourra se transformer en cellule tumorale à condition qu'un second oncogène (par ex. *N-ras* activé) ait été préalablement muté suite à l'action de ces mêmes lésions UV-induites.

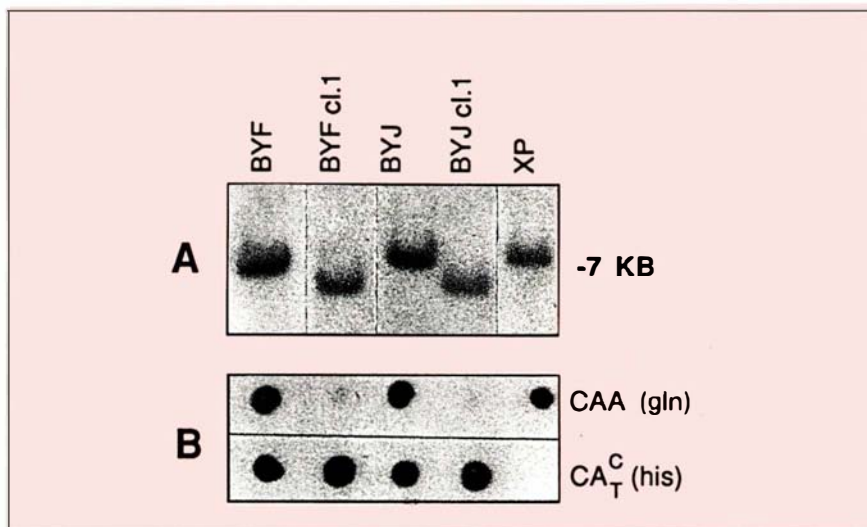


Figure 2. **Activation du gène N-ras dans les tumeurs XP.** A. L'ADN isolé de tumeurs épithéliales XP est transfecté dans les cellules de souris NIH 3T3. La présence d'un oncogène activé est détectée par l'apparition de foyers cellulaires (transfectants primaires) correspondant à des cellules transformées par l'oncogène. L'ADN de deux tumeurs XP (BYF et BYJ), de deux transfectants primaires (BYF cl. 1 et BYJ cl. 1) et de fibroblastes normaux, non transformés de XP (XP) est analysé pour la présence de l'oncogène N-ras par la technique de Southern. 20 µg d'ADN de haut poids moléculaire sont digérés par *EcoRI*, séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % et hybridés à différentes sondes d'oncogènes marquées au ³²P afin de déterminer lequel est transféré et donc activé dans les tumeurs primitives. L'oncogène N-ras humain est le seul oncogène détecté dans les cellules de souris transformées, indiquant ainsi qu'il est responsable de la transformation cellulaire. B. Hybridation différentielle d'ADN avec des oligonucléotides synthétiques spécifiques du codon 61 du gène N-ras normal (CAA) ou muté (CAC/CAT) (voir figure 3). Les ADN génomiques sont amplifiés par la réaction en chaîne de polymérase (30 cycles) (PCR, voir m/s n° 8, vol. 4, p. 515), déposés sur filtre de nitrocellulose, puis hybridés avec des oligonucléotides (20 mères) marqués au ³²P [7, 8]. Ces résultats montrent que les cellules transformées de souris contiennent un gène humain N-ras avec une mutation (A → C ou A → T) sur le codon 61. L'utilisation d'oligonucléotides synthétiques purs complémentaires du codon CAC ou CAT a montré que la mutation ponctuelle est en fait une transversion A → T. Les tumeurs XP initiales (BYF et BYJ) contiennent un allèle normal du gène N-ras (CAA) et un allèle muté du gène N-ras activé (CAC/CAT). gln = glutamine ; his = histidine.

Conclusion

Nos résultats concernant le *Xeroderma pigmentosum* suggèrent que les hypothèses effectuées à partir des expériences de cancérogenèse chez l'animal traité par des agents mutagènes bien déterminés sont applicables à l'homme. Ainsi, lorsque l'on connaît de façon précise l'agent causal du développement tumoral, il est possible de corréler le type de lésions primaires sur l'ADN à la nature des modifications génétiques impliquées dans la cancérogenèse. Il est évident que dans la plupart des cancers hu-

RÉFÉRENCES

8. Suarez HG, Daya-Grosjean L, Schlaifer D, *et al.* Activated oncogenes in skin tumors from a repair deficient syndrome, *Xeroderma pigmentosum*. *Cancer Res* 1988 (sous presse).
9. Bourre F, Sarasin A. Targeted mutagenesis of SV40 DNA induced by UV light. *Nature* 1983 ; 305 : 68-70.
10. Bredberg A, Kraemer KH, Seidman MM. Restricted ultraviolet mutational spectrum in a shuttle vector propagated in *Xeroderma pigmentosum* cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 8273-7.
11. Van der Lubbe JLM, Rosdorff HJM, Bos JL, *et al.* Activation of *N-ras* by ultraviolet irradiation *in vitro*. *Oncogene Res* 1988 (sous presse).
12. Balmain A, Ramsden M, Bowden GT, *et al.* Activation of the mouse cellular Harvey-*ras* gene in chemically induced benign skin papillomas. *Nature* 1984 ; 307 : 658-60.
13. Lavi S. Carcinogen-mediated amplification of viral DNA sequences in simian virus 40-transformed Chinese hamster embryo cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 ; 78 : 6144-8.
14. Taparowsky E, Shimizu K, Goldfarb M, *et al.* Structure and activation of the human *N-ras* gene. *Cell* 1983 ; 34 : 581-6.

Remerciements

Nous tenons à remercier C. Drougard, P. Nardeux et J.-A. Duvillard pour leur excellente aide technique. Nous sommes particulièrement reconnaissant aux Drs A. Margulis, Y. Decroix, J.-P. Cesarini, M. Vuillaume et J. Coppey pour l'obtention de pièces opératoires. Ce travail a été possible grâce à l'aide de l'ARC, la LFNCC, le GEFLUC et la CEE (contrat n° B10-163F).

ADRESSES

A. Sarasin : *directeur de recherche au Cnrs*.
L. Daya-Grosjean : *chargée de recherche au Cnrs*.
H.G. Suarez : *directeur de recherche au Cnrs*.
Laboratoire de génétique moléculaire, Institut de recherches scientifiques sur le cancer, BP n° 8, 94802 Villejuif Cedex, France.
B. Chrétien : *chef de clinique*.
Clinique chirurgicale infantile, hôpital Necker — Enfants-Malades, 149, rue de Sèvres, 75015 Paris, France.
M.-F. Avril : *chef de service*.
Service de dermatologie, Institut Gustave-Roussy, rue Camille-Desmoulins, 94805 Villejuif, France.

TIRÉS A PART

A. Sarasin.

m/s n° 10 vol. 4, décembre 88