

ONCOGÈNE ET GENE SUPPRESSEUR DE TUMEURS

I. Introduction

II. Les cancers dérivent d'un seule cellule anormale: modifications d'ADN

- 1. Origine clonale**
- 2. Modification de la séquence d'ADN dans les cellules tumorales**
- 3. La modification de l'ADN peut être indirecte**

III. Biologie moléculaire des cancers

IV. Oncogènes

- 1. Rétrovirus peuvent transférer des oncogènes (REV animaux)**
- 2. Oncogènes humains**
 - a. Le gène ras
 - b. Les protéines RAS oncogénique ont une activité GTPasique déficiente
 - c. Le proto oncogène c-myc (facteur de transcription comme jun)

3. Conclusion

V. Les gènes suppresseurs de tumeurs

- 1. Rb du gène du retinoblastome**
- 2. Les observation faite pour les gène Rb sont généralisable à d'autre gènes**

VI. Gène p53 (protéine de 53 kDa)

VII. Mise en évidence des gènes suppresseurs de tumeurs

VIII. Big Conclusion

Devenir des cellules mises en cultures

- Les cellules en culture primaire se divisent un petit nombre de fois puis meurent, ou continuent de proliférer: ce sont des cellules transformées.
- L'immortalisation correspond à une division infinie sans perte de morphologie ni d'inhibition de contact.
- En cas de transformation cellulaire les cellules deviennent indépendant perdent l'inhibition de contact en formant un foyer
- Le phénomène de métastase correspond à un caractère mobile et possibilité de développer de nouveaux foyers.
- Le contrôle de la division cellulaire peut dégénérer, ce n'est pas un problème de nutriment.

Le cycle cellulaire:

- Phase G1: synthèse d'ARN dans le noyau, protéine dans le cytoplasme, pas de synthèse d'ADN. Il y a phase de croissance et différenciation. Il y a réparation d'anomalie éventuelle de l'ADN. Contient la phase G0, cellules bloquées avant la synthèse de l'ADN
- Phase S: synthèse de l'ADN nucléaire, avec correction des erreurs de copie de l'ADN (sur éprouvettes)
Les synthèses de l'ARN et des protéines se poursuivent: histones
- Phase G2: la quantité d'ADN est stable, synthèses d'ARN et protéines se poursuivent
- Phase M: division cellulaire, arrêt de la réplication, de la transcription, de la réparation, condensation dans les chromosomes.

La durée du cycle cellulaire est d'environ 22h (12-36h). G1 est de durée variable et peut même occuper toute la vie de la cellule (arrêt en G0)

La prolifération cellulaire est soumise à un contrôle par des signaux extra cellulaires, en leur absence, la cellule reste en G0.

Pts de contrôle:

- G1: 1 pts de restitution
- G1/S pts de contrôle
- S/G2: contrôle de l'activité à 2 ADN
- Fin G2: analyse du fuseau
- Début M: plan équatoriale.

Les protéines de régulation interviennent en phase S, G1 et métaphase. Ces kinases interagissent avec des cyclines qui ont une durée de vie assez limitée.

ONCOGÈNE ET GENE SUPPRESSEUR DE TUMEURS

Il existe trois points de contrôle du cycle cellulaire:

- Précédant la phase S (G1/S) réplication de l'ADN
- Précédant la phase M (G2/M) le contrôle de la mitose
- Précédant la cytokinèse formation du plan de division, formation du fuseau et formation de l'anneau contractil.

De facteur cytoplasmique sont responsables:

- De l'induction de la synthèse d'ADN
- De la formation de l'appareil mitotique et de la condensation chromatinienne: condensation chromosomique prématurée obtenue par incubation de noyaux interphasiques avec des extraits cellulaires de cellules en phase M

C'est ainsi qu'ont été mis en évidence les protéines kinase dont l'activité est modulée par son interaction avec une cycline (cdks: produit temporairement puis dégradées).

Rôle des kinases cyclines dépendante CDK:

- Variation cycliques d'activité des Cdk sous le contrôle des cyclines, l'activité est dépendant des interactions avec les cyclines.
- Notion d'ordre séquentiel des événements.

I. Introduction

Le cancer est lié au bouleversement des mécanismes fondamentaux du comportement cellulaire. Son étude permet de mieux comprendre les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire et de découvrir et si possible bloquer les dysfonctionnements:

- Tumeur bénigne: cellule néoplasique restent groupés en une masse unique circonscrite
- Tumeur maligne: contient des cellules ayant la possibilité d'envahir le tissu environnant et de métastaser

L'étude cellulaire et moléculaire des cancers éclaire sur les mécanismes physiologiques de contrôle de la prolifération cellulaire.

II. Les cancers dérivent d'une seule cellule anormale contenant des modifications de la séquence d'ADN

1. Origine clonale

Démonstration:

- Une anomalie chromosomique présente dans toutes les cellules LMC: *translocation Ch22;9 philadelphie bcr-abl*, cette anomalie correspond à des événements moléculaires.
- Inactivation du chromosome X: le même chromosome est inactivé (démonstré par l'utilisation de gènes marqueurs). Les cellules qui sont cancéreuses expriment toute le même chromosome.

2. Modification de la séquence d'ADN dans les cellules tumorales

- L'anomalie est transmise à la descendance cellulaire
- Conséquence: la présence de clones cellulaires
- Cette modification est à l'origine du cancer
Exemple: carcinogénèse chimique (produit chimique), rayonnement ionisant, les virus introduisent des séquences étrangères d'ADN (papilloma virus)
- Plusieurs événements indépendants ou non sont cumulés
(incidence des cancers en fonction de l'âge, plusieurs mutations sont nécessaires pour provoquer un cancer, notion de progression tumorale: un cancer évolue, et plus sa durée de vie est longue, plus les remaniements génétiques sont nombreux)

ONCOGÈNE ET GÈNE SUPPESSEUR DE TUMEURS

➤ Le mécanisme s'auto-amplifie, et les mutations s'aggravent

Problèmes: quels sont les événements successifs qui ont eu lieu au moment du diagnostic clinique: présence d'une homogénéité ou hétérogénéité cellulaire:

- Leucémie aiguës chez l'enfant
- Dans le cas d'irradiation, l'apparition des leucémies a lieu après plus de cinq années, le pic est atteint de huit à dix ans plus tard.

3. La modification de l'ADN peut être indirecte

- L'exposition à un carcinogène de façon répétée et au delà d'un seuil (benzopyrènes) s'additionne à l'action des esters de phorbol activateurs de la Protéine C kinase
- Une molécule cancérogène agit comme initiateur tumoral qui par son action répétée agit plus tardivement, **il n'y a cancer que si une amplification ou sélection a lieu**
- Le cancer du nasopharynx a une incidence élevée à Hong Kong et faible au Royaume Uni. Cancer du rectum fréquent en Israël indo-européen et faible au Koweït.

III. Biologie moléculaire des cancers

Les cellules tumorales sont le siège d'une suite d'accidents génétiques aléatoires soumis à la sélection naturelle, il y a rupture des contraintes normales de la prolifération cellulaire. **Un nombre de gènes restreint est impliqué**

Les gènes de régulation de la prolifération cellulaire peuvent être regroupés en deux classes non disjointes: stimulation inhibition.

Les gènes peuvent être responsables d'une stimulation de multiplication, d'autres gènes appliquent une inhibition.

Le cancer est le résultat d'une série importante d'accidents génétiques aléatoires soumis à la sélection naturelle. On détecte les événements présents dans un pourcentage important de la population génétique.

Oncogènes:

- Création d'un **gène stimulateur hyperactif** qui présente un **effet dominant**: une seule copie modifiée suffit
- Le gène altéré est un **oncogène**, le gène sauvage est un proto-oncogène
- L'oncogène introduit dans les fibroblastes normaux induit une transformation et prolifération cellulaire
 - Effet prolifératif in vivo et in vitro
 - Perte de l'inhibition de contact
 - Croissance/division anarchique
 - Anomalies de la membrane plasmique
 - Délocalisation de la cellule à distance

Gènes suppresseurs de tumeurs

- Inactivation d'un gène inhibiteur de la prolifération cellulaire: **effet récessif**
- Les deux allèles sont soit inactivés ou éliminés ou un seul gène est modifié (**effet dose**)
- Ce sont les gènes suppresseurs de tumeurs
- Un tel gène réintroduit dans une cellule cancéreuse, portant les modifications de ce gène +/- provoque la réapparition du phénotype non cancéreux: inhibition de contact...

ONCOGÈNE ET GÈNE SUPPESSEUR DE TUMEURS

IV. Oncogènes

Gènes séquence sprésentant un effet dominant pour la transformation cellulaire:

Exp: la transformation de fibroblaste par des séquences provenant de cellules tumorales a permis d'identifier des séquences transformantes: formation de foyers de cellules en croissance active.

1. Rétrovirus peuvent transférer des oncogènes (REV animaux)

Rappel concernant les rétrovirus:

- **Le génome est un ARN comprenant des séquences répétées** terminales (LTR: insertion, activatrice de la transcription).
- Les gènes codant pour:
 - La protéine *gag* qui après un clivage va générer la protéine de Capside
 - La protéine *pol* qui est la **transcriptase inverse**
 - La protéine *env* qui correspond à la protéine de l'enveloppe.

Le virus du sarcome de Rous a été identifié chez le poulet comme induisant des sarcomes (tissu conjonctif).

Au cours de l'infection, l'ADN ds copie du génome viral ARN est inséré dans le génome de la cellule hôte.

Il est possible de reproduire la transformation tumorale par infection de fibroblastes en culture:

Découverte du premier oncogène:

- Un gène supplémentaire v-src est présent à l'extrémité 3' du virus du sarcome de Rous
- Ce gène correspond à un **oncogène** car si il est délété , le virus se réplique normalement et perd son pouvoir oncogénique
- **Ce gène ne comprend pas d'intron**
- Ce gène est **muté par rapport à son homologue** présent chez le poulet: c-src
- En effet, une sonde complémentaire cDNA révèle une séquence très proche aussi bien dans les sarcomes que dans les tissus normaux, ce gène est très conservé dans l'évolution.
- Les mutations présentes dans le gène v-src modifient la séquence d'acides aminés et en font une **tyrosine kinase à action incontrôlée**.

Ainsi un gène muté, conférant un avantage à la cellule transformée a été incorporé dans le génome viral, séquence provenant d'un produit d'épissage d'un gène cellulaire. L'incorporation du gène V-src dans le génome de la cellule infectée est à l'origine de l'apparition du fibrosarcome du poulet:

- Ce gène est sous le contrôle des LTR produisant une activité transcriptionnelle très forte et une activité enzymatique permanente. (non contrôlée par les facteurs de transcriptions).
- Le produit du gène src est une tyrosine kinase non trans-membranaire (associée) qui joue un rôle dans la transduction de signaux mitogénique
- Depuis il est démontré que ce mécanisme n'est ni unique ni cantonné aux rétrovirus.

Autre exemple:

- Le rétrovirus (Simian sarcoma virus) contient un gène muté dérivé du proto-oncogène PDGF Beta
- Autre rétrovirus contient une version mutée de EGFR
- Ces oncogènes correspondent à des versions activées de proto-oncogènes. Il peut exister plusieurs oncoogènes dérivant d'une même séquence comme K-ras et H-ras.
- Mutation peut toucher les expressions, les sites catalytiques...
- **Les proto-oncogènes sont reconnu par le préfixe c-**.

Les proto-oncogènes décrits codent pour des protéines impliqués dans la transmission de signaux mitogéniques (facteurs de croissance).

- La chaîne beta du PDGF est un facteur de croissance
- Le produit du gène c-erb B1 est le récepteur de EGF
- Les protéines Ras, Raf, Fos et jun sont impliqué dans la cascade de signal de transduction faisant suite l'action des récepteurs de facteurs de croissance (dont le récepteurs de l'EGF)
- myc code pour un facteur de transcription.

ONCOGÈNE ET GENE SUPPRESSEUR DE TUMEURS

2. Oncogènes humains

Dans les cancers humains, il existe des rétrovirus directement oncogénique HTLV1 et 2 qui sont responsable de leucémie T/sarcomes transmissibles (HIV1 et HIV2 sont indirectement oncogéniques)

Une partie des oncogènes isolés dans les cancers humains sont les mêmes proto-oncogènes:

- Mutation ponctuelle
- Amplification
- Translocation

a. Le gène ras

Les protéines codées par les gènes ras sont de petites protéines G comprenant une chaîne alpha, sa forme active rasGTP est réalisée par l'échange du GDP par le GTP. Cet échange est favorisé par les facteurs SOS lorsqu'il interagit avec ras.

L'accrochage de *ras* à la membrane cellulaire est due à l'interaction avec un farnésyl: ceci se fait par l'action de la **farnésyl transférase**. Cette interaction est **nécessaire à l'activation de raf**, la **première kinase de la cascade MAPK**.

La désactivation est réalisée par l'hydrolyse du GTP (activité intrinsèque). Cette activation GTPasique est stimulée par une protéine GAP.

Les mutations des gènes ras dans les cancers humains sont:

- **Inactivation de l'activité GTPasique** (donc restera plus longtemps stable)
- Diminution forte de l'interaction ras/GAP par mutation du domaine d'interaction
- Dans ces cas la **quasi totalité** des protéines Ras sont sous forme de **RasGTP**, la cellule va se **diviser plus fréquemment** que les cellules voisines qu'il y ait ou non présence de facteurs de croissance extra-cellulaire
- rasGTP va **activer** la voie **MAPK** qui à leur tour vont activer les CDK: progression en G1, passage à la phase S
- La cellule cancéreuse a acquis une autonomie vis à vis des signaux extra-cellulaire

b. Les protéines RAS oncogénique ont une activité GTPasique déficiente

Lors de mutation de RAS, il y a activation permanente de cette protéine et la voie de signalisation est activée de façon systématique.

c. Le proto oncogène c-myc (facteur de transcription comme jun)

Mode d'activation: **amplification**, translocation. L'augmentation du nombre de copies du gène entraîne l'augmentation de la quantité de protéine *myc* **sans qu'elle soit anormale**.

Ce réarrangement quoique moins fréquent que les mutations du gène ras est fréquemment retrouvé dans les cancers humains.

Exemple du lymphome de Burkitt: il y a translocation du gène c-myc du Ch8 au Ch14 localisé dans une région de régulation des chaînes lourdes d'IgG, ceci dans les lymphocytes B.

Dans les lymphocytes B: cette translocation induit une augmentation de la division cellulaire des lymphocytes B (myc agit entre MAPK et CDK)

- Tous les proto-oncogènes véhiculés par les rétrovirus ne sont pas retrouvés sous une forme activée dans les cancers humains (ex: c-src)
- Certains oncogènes n'ont pas été retrouvés associés aux rétrovirus. Dans la famille ras: N-Ras n'a pas été retrouvé dans un rétrovirus. Idem pour N-Myc et L-Myc

ONCOGÈNE ET GÈNE SUPPESSEUR DE TUMEURS

Il y a une concomitance entre une infection virale et des mutations. La translocation et l'amplification de c-myc ne suffisent pas à transformer une cellule normale en cellule cancéreuse:

- **Plus de deux événements sont nécessaires**

Dans le cas du Lymphome de Burkitt, il y a infection par un virus à ADN (pas un rétrovirus). Ce virus d'Epstein Barr contient un oncogène viral (LMP1) et non un proto-oncogène cellulaire modifié. Ce virus est également impliqué dans les cancers du nasopharynx.

3. Conclusion

Dans les cancers un ou des proto-oncogènes peuvent être activés, un seul proto-oncogène activé ne suffit pas. Ce n'est pas la situation la plus fréquente ni suffisante.

L'action des proto-oncogènes est complétée par **l'action de gènes suppresseurs de tumeur vraisemblablement plus importante.**

V. Les gènes suppresseurs de tumeurs

Contrairement aux proto-oncogènes, c'est l'inactivation de ces gènes qui est retrouvée dans les cellules cancéreuses (anti-oncogène).

Approche expérimentale lourde, car la perte d'une copie ne suffit généralement pas à entraîner un cancer. Le plus fréquemment on observe la perte d'une copie et la mutation de la copie existante.

1. Rb du gène du rétinoblastome

Le rétinoblastome est une tumeur de l'enfance qui se développe à partir de cellules immatures de la rétine. Ces cellules comportent un faible nombre de mutations.

Il existe une forme héréditaire dans laquelle des tumeurs multiples indépendantes affectent les deux yeux:

- Dans cette forme familiale, il y a transfert d'anomalie à partir d'un des génomes parentaux (mutation somatique)
- Par cytogénétique, dans certains cas, il y a eu déletion d'une bande du bras long et du chromosome 13.
- Dans les cellules tumorales, le chromosome 13 est touché, ce remaniement est concomitant aux deux types de tumeurs

Cette déletion a été retrouvée dans les cellules tumorales de patients présentant une forme sporadique

Il y a eu clonage et séquençage du gène Rb.

- **Cas familial:** Les cellules tumorales sont déficientes dans les **deux copies du gène** (déletion et mutation). **Les cellules non cancéreuses sont déficientes pour une copie du gène.**
- **Cas sporadique:** aucune anomalie des cellules non tumorales, **les cellules cancéreuses ont un déficit des deux copies**

Dans les 2/3 de cas, il y a une déletion, ce qui donne une hétérozygotie et donc une perte de cette région chromosomique. On a donc les loci du gène Rb.

Il y a une perte d'hétérozygotie dans 70% des cas.

- Le gène Rb est perdu dans différents types de cancers comme les carcinomes du poumon, seins, et vessie.
- **Le gène Rb est normalement exprimé dans presque toutes les cellules de l'organisme.**
- **A chaque cycle cellulaire, il y a phosphorylation puis déphosphorylation.**
- **Il est nécessaire à la régulation du cycle cellulaire.**
- 80% des mutations sont des déletions ou présence de codons stop.
- 20% des mutations sont ponctuelles: La conséquence est la non fixation d'E2F qui libre entraîne la perte du contrôle G1/S plus de contrôle par le complexe cycline/Cdk4 et p16

ONCOGÈNE ET GÈNE SUPPESSEUR DE TUMEURS

2. Les observations faites pour les gènes Rb sont généralisables à d'autres gènes

Forme familiale de cancer et gène de susceptibilité: Sein (BRCA1/BRCA2) ; Colon (LYNCH)
Forme sporadique de cancer et gènes suppresseurs de tumeurs: p53 ; p16

3. Gène p53 (protéine de 53 kDa)

Les individus ne disposant que d'une copie fonctionnelle du gène p53 ont tendance à développer des cancers indépendants.

Ce sont des caractéristiques correspondant aux gènes suppresseurs de tumeurs. **La surexpression de ces gènes entraîne l'arrêt de la prolifération.**

La protéine p53 se lie à l'ADN sous forme tétramérique, induit la transcription de la **p21** (CDK I), se lie au complexe **cycline G1** protéine **CDK2** (pts de contrôle en G1).

L'absence ou la présence de gène muté, entraîne la diminution de la p21 et l'absence du frein exercé sur le cycle cellulaire par les CDK I.

Contrairement à Rb, on trouve très peu de protéine p53 dans une cellule normale. P53 n'est pas nécessaire au développement normal.

L'exposition de cellules normales aux UV ou radiations ionisantes entraîne une élévation de la quantité de p53 nucléaire (stabilisation). Il en résulte un arrêt du cycle empêchant le passage en phase S.

Les cellules déficientes en p53 entrent en division, elles meurent ou prolifèrent, présentant un caryotype instable (les chromosomes n'ont pas le temps de se réparer).

La protéine p53 lie l'ADN: site de fixation de l'ADN au milieu. À l'extrémité C-terminale permet l'oligomérisation. L'extrémité N terminale comporte des séquences de signalisation.

L'altération de la p53 (perte ET mutation) est retrouvée dans de nombreuses tumeurs (70% poumon et 50% colon...) Le transfert d'un gène normal surexprimé dans une lignée cellulaire mutée, redonne un phénotype non prolifératif.

VI. Mise en évidence des gènes suppresseurs de tumeurs

Méthode: localisation des pertes d'hétérozygotie et des gènes qui sont contenus fréquence significative inter-tumoral, puis mutation (knock out).

C'est ainsi qu'a pu être identifié le gène APC très fréquemment remanié dans la polypose colique, comme le gène DCC dans 70% des carcinomes coliques.

Il y a accumulation d'événements mutationnel au cours du temps, plusieurs gènes suppresseur de tumeurs peuvent être modifiés: ces événements sont compliqués par la transformation de proto-oncogène en leur forme activé comme ras et myc.

VII. Big Conclusion

Il y a des tumeurs, concomitamment présence d'événement faisant suite à l'activation de proto oncogène ET modification des gènes suppresseurs de tumeurs. La séquence et la nature de ces événements permettent de classer les tumeurs. La cancérologie moléculaire permet de mettre en évidence les mécanismes de contrôle de la division et de la prolifération cellulaire modifiés et donc de caractériser et suivre le processus tumoral.