



Support de cours

Oncogenèse et développement tumoral

Destiné aux étudiants de Master 2

Spécialité : Génétique

Docteur *REZGOUN Mohamed Larbi*
Maître de conférences (A)

Année universitaire
2020 - 2021

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Préambule

Chapitre I : Cultures cellulaires	Page 01
1- Cultures cellulaires	01
2- Statuts physiologiques des cellules <i>in vitro</i>	03
2-1- Cellules normales	03
2-2- Cellules transformées	03
2-3- Cellules non transformées	04
3- Notion de lignées cellulaires	04
3-1- Lignées finies	04
3-2- Lignées indéfinies	04
3-3- Lignées clonales	04
Chapitre II : Caractéristiques générales de la cellule cancéreuse	05
1- Cellule cancéreuse	05
2- Capacités acquises par la cellule cancéreuse	05
3- Gènes impliqués dans la transformation cancéreuse	08
3-1- Oncogènes	10
3-2- Gènes suppresseurs de tumeurs	12
Chapitre III : Régulation du cycle cellulaire	14
1- Concept de régulation du cycle cellulaire	14
2- Phases du cycle de division cellulaire	14
3- Cyclines et CDK	18
4- Points de régulation importants dans la progression du cycle cellulaire	22
5- Contrôle de l'état de l'ADN	24
6- Inhibiteurs pharmacologiques du cycle cellulaire	27
Chapitre IV : Régulation de l'apoptose	28
1- Apoptose	28
2- Nécrose	29
3- Acteurs moléculaires de l'apoptose	30
3-1- Caspases	30
3-2- Protéines de la famille BCL-2	31
4- Différentes voies de l'apoptose	32
4-1- Voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque	33
4-2- Voie mitochondriale ou voie intrinsèque	33

Chapitre V : Mécanismes des altérations géniques impliquées dans la transformation	36
1- Mutations classiques	37
1-1- Définition	37
1-2- Classification	37
1-3- Conséquences des mutations	38
2- Amplification génique	38
3- Translocations	39
4- Mécanismes épigénétiques	40
4-1- Méthylation des gènes impliqués dans la carcinogenèse	40
4-2- Acétylation des histones	41
5- Inactivation bi-allélique des gènes suppresseurs de tumeurs	42
5-1- Nature des mutations inactivatrices	43
5-2- Mutations inactivatrices et perte d'hétérozygotie	43
5-3- Autres modalités d'inactivation bi-allélique	44
Chapitre VI : Différents types d'agressions génotoxiques	45
1- Cancérogenèse physique	45
1-1- Radiations ionisantes	45
1-2- Rayonnement ultraviolet	46
2- Cancérogenèse chimique	46
2-1- Carcinogènes endogènes	46
2-2- Carcinogènes exogènes	47
3- Cancérogenèse virale	49
3-1- Cancérogenèse par des virus à ADN	49
3-2- Cancérogenèse par des virus à ARN	51
Chapitre VII : Prédisposition héréditaire aux cancers	52
1- Inactivation mono-allélique germinale d'un gène suppresseur de tumeurs	52
2- Mutation germinale activatrice d'un proto-oncogène	56
3- Anomalies congénitales de la réparation de l'ADN	58
4- Polymorphismes des gènes de susceptibilité	61
Références bibliographiques	64

Liste des abréviations

8-OH-dG : 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine
Abl : Abelson leukemia virus
ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique
AIF : Apoptosis Inducing Factor
APC : Anaphase Promoting Complex
ARN : Acide Ribo-Nucléique
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP : Adénosine Tri-Phosphates
ATR : ATM- and Rad3-Related
Bcl-2 : B-cell lymphoma
BER : Base Excision Repair
BH : Bcl-2 Homology
BRCA1 et **BRCA2** : BReast CAncer 1 et 2
CDK : Cyclin-Dependent Kinase
CIP : Cyclin Inhibiting Protein
CMT : Cancer Médullaire de la Thyroïde
DSBR : Double Strand Base Repair
EBV : Epstein Barr Virus
Erb : Erythroblastosis B virus
GDP : Guanosine Di-Phosphates
GST : Glutathion S Transférase
GTP : Guanosine Tri-Phosphates
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HAT : Histones Acétyl-Transférase
HDAC : Histones DésAcétylases
HDM2 : Human Double Minute 2
HNPCC : Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer
HPV : Human Papilloma Virus
IGF1 : Insulin-Like Growth Factor-1
INK4 : INhibitory Kinase 4
KIP : Kinase Inhibiting Protein
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
MMR : Mis-Match Repair
Myc : Myelocytomatosis virus
NAT : N-Acétyl-Transférases
NEM : Néoplasie Endocrine Multiple
NER : Nucleotide Excision Repair
ORC : Origin Recognition Complex
PIKK : Phosphatidyl Inositol 3-Kinase-like Kinase
Ras : Rat sarcoma virus
Ret : Rearranged during transfection
SMC : Structural Maintenance of Chromosomes
SV40 : Simian Virus 40
TGFβ : Tumor Growth Factor β
TK : Tyrosine Kinase
TNF : Tumor Necrosis Factor
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
WT-1 : Wilms Tumor 1

Liste des figures

Figure 01 :	Caractéristiques générales de la cellule cancéreuse	06
02 :	Mode de fonctionnement des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs	10
03 :	Phases et événements majeurs du cycle de division cellulaire	15
04 :	Implication des CDKs dans le contrôle du cycle cellulaire.....	19
05 :	Régulation de l'activité des CDKs par des phosphorylations réversibles	20
06 :	Régulation de l'activité des CDKs par des inhibiteurs protéiques	21
07 :	Régulation de la progression en G ₁ du cycle cellulaire	22
08 :	Description du déroulement de la phase M du cycle cellulaire	23
09 :	Les points de contrôle de l'état de l'ADN au cours du cycle cellulaire	25
10 :	Contrôle de l'état de l'ADN au cours du cycle cellulaire par p53	26
11 :	Produits antimitotiques utilisés à des fins thérapeutiques	27
12 :	Caractérisation morphologique des événements survenant lors de la nécrose et de l'apoptose	29
13 :	Structure et activation des caspases	31
14 :	Les protéines de la famille BCL-2	32
15 :	Les deux voies principales d'activation de l'apoptose	34
16 :	Place de l'apoptose dans les destinées cellulaires possibles	35
17 :	Mécanismes de survenue du rétinoblastome	53

Liste des tableaux

Tableau I :	Principaux carcinogènes chimiques	48
II :	Principales prédispositions héréditaires aux cancers par inactivation germinale d'un gène suppresseur de tumeurs	55
III :	Prédisposition aux cancers par anomalie de la réparation de l'ADN	60

Préambule

Le présent polycopié est destiné aux étudiants de deuxième année Master de la formation académique Génétique. Il peut constituer également un fond pour tout biologiste désireux de s'initier à l'oncogénétique. Seuls sont présentés les principes et les concepts de base de cette nouvelle discipline très large, en s'appuyant le plus possible sur des données actualisées. Discipline de synthèse, l'oncogénétique s'appuie sur trois disciplines fondamentales : la physiologie cellulaire, la génomique et la biologie moléculaire ; enseignements prodigués en Licence et en première année Master.

La transformation néoplasique résulte d'une perturbation de l'homéostasie tissulaire qui est un équilibre délicat entre la prolifération qui génère de nouvelles cellules, la différenciation qui conduit la cellule vers une spécialisation irréversible et leur élimination soit par sénescence soit par apoptose. La rupture de cet équilibre, due à des anomalies des gènes qui contrôlent des processus clefs de la physiologie cellulaire, conduit à la prolifération incontrôlée qui caractérise le cancer. Comme nous le verrons dans ce polycopié, les altérations de certains gènes sont la cause de la transformation maligne des cellules. Ainsi, intrinsèquement, le cancer est une maladie de l'ADN. Cette affirmation ne veut pas dire que la part de l'environnement soit faible. La plupart des cancers naissent des interactions entre l'environnement (exposition aux carcinogènes) et la constitution génétique de l'individu. Les connaissances actuelles sur la biologie du cancer conduisent donc à considérer la prolifération maligne comme résultant d'une succession d'évènements le plus souvent rares et aléatoires dont l'accumulation permet à une cellule d'échapper au contrôle génétique exercé en permanence par l'organisme, et de se diviser de façon autonome, clonale et anarchique, acquérant au fur et à mesure de sa progression de nouvelles capacités de prolifération, d'extension, et de résistance aux tentatives de régulation endogènes et thérapeutiques.

Afin de faciliter la lecture de ce polycopié et de susciter chez le lecteur des questions et des réflexions, son attention est attirée par une organisation en plusieurs chapitres disposés selon un enchaînement cohérent. Les deux premiers chapitres abordés dans ce polycopié sont consacrés à des définitions fondamentales visant à intégrer la terminologie particulière utilisée en oncogénétique. L'intérêt de ces volets étant de permettre à l'étudiant de comprendre les caractéristiques fondamentales des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* ainsi que de saisir la notion de gène cible des altérations carcinogénétiques (oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs). Cette partie constitue une base importante aux sections suivantes.

Les chapitres III et IV qui suivent sont consacrés à des rappels physiopathologiques concernant des processus clefs impliqués dans la transformation cancéreuse (cycle cellulaire et apoptose). Les grands principes de l'oncogénétique, à savoir les mécanismes des altérations géniques impliqués dans la transformation cancéreuse (chapitre V) et les différents types d'agressions génotoxiques (chapitre VI) seront ensuite expliqués d'une manière assez exhaustive, y compris des aspects souvent peu développés dans les manuels généralisés d'oncologie.

Au cours de la précédente décennie, d'importantes découvertes de la recherche fondamentale ont permis une meilleure compréhension des mécanismes de l'oncogenèse. Les progrès de la génétique des prédispositions aux cancers en sont un exemple démonstratif. Dans ce sens, nous avons opté pour clôturer ce cours avec un chapitre consacré à cette thématique (chapitre VII) qui situe bien cette discipline par rapport aux objectifs de l'offre de formation.

Cet enseignement de cours est complété par la réalisation de travaux dirigés qui est d'une importance capitale dans la formation et l'évaluation des étudiants. Depuis quelques années, une large majorité de la communauté universitaire s'accorde à dire que le modèle du cours magistral n'est plus la méthode d'enseignement par excellence. Les uns se plaignant du manque d'implication et d'attention des étudiants, les autres réclamant plus d'interactivité et de techniques de travail. Les travaux dirigés satisferont globalement les étudiants en répondant à leurs attentes.

Nous nous efforçons chaque année de concevoir des travaux dirigés diversifiés et actualisés sous forme d'exercices, de problèmes et d'analyse d'articles en adéquation avec les objectifs de la matière. Ces TD permettent à l'étudiant d'utiliser le bagage scientifique acquis en cours pour aborder des problématiques de haut niveau en oncogénétique complétant ainsi, au mieux, sa formation dans cette discipline.

Chapitre I

Cultures cellulaires

Actuellement, le diagnostic et le suivi de patients affectés d'un cancer se font principalement en recueillant des données cliniques : taille de la tumeur, présence de ganglions lymphatiques et de métastases, et biologiques : dosage de certains marqueurs tumoraux. L'inconvénient majeur de ces méthodes est qu'elles s'appuient sur l'analyse d'échantillons fixés ou d'extraits moléculaires obtenus à partir d'une population cellulaire hétérogène. Une approche alternative est d'analyser le comportement de cellules cancéreuses vivantes.

Les cellules en culture ont été, et sont encore aujourd'hui, le modèle le plus utilisé pour étudier le cancer. Les connaissances sur les processus qui surviennent dans les cellules normales et cancéreuses proviennent de l'utilisation de plusieurs de ces lignées cellulaires permettent d'avoir une source de cellules cancéreuses illimitée à faible coût et d'évaluer l'effet de l'environnement ou d'un traitement sur la croissance ou l'expression de protéines.

1- Cultures cellulaires

Les cultures cellulaires constituent un ensemble de procédés techniques qui permettent de maintenir les cellules en survie, pendant un minimum de 24 heures, avec une activité raisonnable et un aspect relativement normal, en les plaçant dans un milieu de culture naturel, synthétique ou artificiel se rapprochant le plus possible du milieu où on les trouve naturellement. Cette définition met en valeur la démarche qui a été celle de tous les cytoculteurs : essayer de reconstituer *in vitro* les conditions environnementales et nutritionnelles fournies à la cellule *in vivo*. Elle exclut cependant des cultures de cellules, les méthodes qui permettent de maintenir en survie pendant quelques heures des tissus isolés, organes ou fragments d'organes : cœur, lambeau de vaisseau, fragment d'intestin ou de foie destinés à la réalisation de greffes. En culture cellulaire, il faut distinguer plusieurs notions fondamentales :

- **culture primaire** : mise en culture d'un prélèvement provenant directement d'un organisme vivant,
- **culture secondaire** : mise en culture d'un prélèvement provenant d'une culture préexistante. On parle alors de subculture. Le procédé de prendre un prélèvement de cellules d'une culture et de le remettre dans une autre culture est appelé explantation. On parle également de repiquage mais ce terme est réservé plutôt à un usage en microbiologie,
- **vie** : terme employé pour désigner les cellules *in vivo*,

- **survie** : terme employé pour désigner les cellules *in vitro* du fait qu'elles vont se retrouver dans un environnement différent auquel elles doivent s'adapter.

Que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, une cellule a 4 possibilités d'évolution :

- **maintenance** : activité minimale compatible avec une vie normale, ce terme décrit des cellules *in vitro*. L'équivalent fonctionnel de cet état *in vivo* s'appelle quiescence ou G₀,
- **croissance** : désigne la multiplication des cellules *in vitro*. La croissance cellulaire présente deux aspects ; l'aspect trophique ou augmentation de la masse et du volume cellulaire, ainsi que l'aspect plasique ou augmentation du nombre des cellules,
- **différenciation** : aussi appelée spécialisation, est l'expression de fonctions spécifiques d'un tissu donné. La différenciation cellulaire a une base moléculaire ; les cellules diffèrent non pas du fait qu'elles contiennent des gènes différents mais du fait qu'elles activent ou répriment l'expression de gènes différents,
- **apoptose** : mort ou « suicide » cellulaire, génétiquement programmée, conséquence, par exemple, d'une altération non réparée au niveau du génome qui diffère fondamentalement de la nécrose qui est une mort cellulaire accidentelle.

Selon la nature des cellules mises en cultures. On distingue 3 types cellulaires sur la base de deux critères ; la technique de prélèvement et les modalités de mise en culture :

- **cellules en suspension** : il s'agit de cellules naturellement en suspension dans un liquide physiologique comme les cellules du tissu sanguin (granulocytes, monocytes et lymphocytes) en suspension dans le plasma. Le prélèvement se fait par ponction à l'aiguille de quelques millilitres, la culture se fait dans des flacons en utilisant un milieu de culture liquide,
- **cellules matricielles** : dites ainsi car organisées en tissus à consistances « solides » composés de cellules et de matrice extracellulaire. Le prélèvement se fait par biopsie de quelques millimètres cubes. Du fait que ces cellules doivent adhérer à un support solide pour se multiplier, la culture se fait dans des boîtes. L'essentiel des cellules de l'organisme sont des cellules matricielles qui sont organisées en tissus. Les tissus diffèrent par la nature des cellules, la nature de la matrice extracellulaire ainsi que leurs proportions relatives.
- **cellules du liquide amniotique** : il s'agit d'un cas très particulier ; cellules qui sont à l'origine en suspension mais qui se cultivent comme des cellules matricielles. Il s'agit de cellules épithéliales (matricielles) qui proviennent de la desquamation de l'épiderme fœtal. On les utilise pour la réalisation du diagnostic prénatal : c'est une stratégie non invasive, comportant très peu de risques, utilisée pour l'obtention de cellules fœtales.

2- Statuts physiologiques des cellules *in vitro*

2-1- Cellules normales

En culture cellulaire, on appelle cellules normales, des cellules qui ne diffèrent en aucune façon de celles trouvées dans un organisme sain et intact. Par définition, des cellules normales :

- **elles ont un caryotype euploïde**, normal, ne comportant aucune anomalie chromosomique de nombre ou de structure visualisable par cytogénétique,
- **elles subissent la sénescence** ou vieillissement cellulaire après un nombre fini de divisions ; un nombre plus ou moins important, qui diffère d'un type cellulaire à un autre.

2-2- Cellules transformées

En culture cellulaire, on appelle cellules transformées des cellules qui possèdent les propriétés des cellules cancéreuses *in vivo*. Elles s'opposent en tous points aux cellules normales. On peut considérer comme cellules transformées des cellules capables de :

- **provoquer l'apparition de tumeurs malignes** quand elles sont greffées à des hôtes appropriés,
- **avoir une multiplication indépendante de l'ancrage** : très souvent les cellules transformées peuvent se multiplier sans être obligées d'adhérer à un support solide. Elles peuvent former des colonies quand on les cultive en suspension dans de l'agarose nutritive semi-molle,
- **perdre la capacité de l'inhibition de contact** : les cellules transformées cultivées en monocouche continuent à se multiplier quand elles ont atteint la confluence, état dans laquelle la totalité de la surface de culture est remplie ; les cellules normales ne le peuvent pas et cessent de se diviser dans ces conditions.

Cependant, il est important de signaler qu'il existe des exceptions à ces règles :

- il existe des cas de cellules transformées qui ne peuvent pas former de tumeurs chez l'hôte approprié. À titre d'exemple, on a les cellules lympho-blastoïdes humaines dérivées du lymphome de Burkitt,
- il existe des cas de cellules normales qui ne croissent qu'en suspension comme les lymphocytes. Les chondrocytes normaux (cellules du tissu cartilagineux) présentent une multiplication facultative vis-à-vis de l'ancrage : elles peuvent adhérer à un support solide, sans toutefois y être obligées.

2-3- Cellules non transformées

On donne le nom de « cellule non transformée » à celles qui n'ont aucune des propriétés des cellules manifestement malignes. Il n'est pas facile de tracer la frontière entre le monde des cellules transformées et celui des cellules non transformées. En effet, ces dernières présentent des propriétés intermédiaires entre cellules normales et cellules transformées. Cela suggère que la transformation cancéreuse est un processus multi-étapes dans lequel le statu « non transformée » est une étape intermédiaire avant la transformation. Ce terme s'applique aux cellules aneuploïdes et immortelles qui se multiplient indéfiniment en culture : caractéristiques des cellules transformées, mais elles ont une multiplication dépendante de l'ancrage et présentent le phénomène d'inhibition de contact : caractéristiques des cellules normales. Ces cellules acquièrent plus facilement des propriétés de cellules transformées après exposition à des cancérogènes. Elles ne provoquent pas de tumeurs même lorsqu'on les greffe à des souris « nues » avec une déficience congénitale du thymus.

3- Notion de lignées

Il s'agit d'une population cellulaire qui résulte de plus d'un passage en culture, non compris la primo-explantation et qui possède un certain potentiel à être sub-cultivée.

3-1- Lignées finies (souches cellulaires)

Une lignée finie est une lignée qui possède un potentiel important mais limité à être sub-cultivée. Les lignées finies sont constituées de cellules normales.

3-2- Lignées indéfinies (lignées établies ou lignées permanentes)

Une lignée indéfinie est une lignée qui possède un potentiel illimité à être sub-cultivée. On lui donne aussi le nom de lignée établie, ou de lignée permanente. On préférera le terme de lignée indéfinie qui indique bien le caractère illimité du potentiel de prolifération. Il s'applique aussi bien à des cellules transformées que non transformées.

3-3- Lignées clonales

Une lignée clonale est une lignée définie ou indéfinie constituée de la descendance d'une cellule unique. L'exemple le mieux connu est celui des lignées utilisées pour la fabrication d'anticorps monoclonaux. Ces anticorps reconnaissent le même épitope car ils sont issus d'une seule lignée de plasmocytes, provenant d'une seule cellule.

Chapitre II

Caractéristiques générales de la cellule cancéreuse

1- Cellule cancéreuse

Il est maintenant bien établi que la transformation de cellules humaines normales en cellules cancéreuses met en jeu plusieurs altérations géniques successives : c'est un processus multi-étapes. On préfère utiliser aujourd'hui le terme d'altération qui englobe deux types d'évènements moléculaires ; essentiellement des mutations classiques avec des changements transmissibles et irréversibles au niveau de la séquence d'Acide Désoxyribo-Nucléique (ADN), rarement des modifications épigénétiques avec des changements transmissibles mais réversibles du profil d'expression d'un gène qui ne s'accompagne pas de changements au niveau de la séquence d'ADN. Ces altérations aboutissent à des modifications qualitatives ou quantitatives d'expression : les modifications qualitatives impliquent des changements dans la séquence de la protéine synthétisée quant aux modifications quantitatives c'est la même protéine qui est synthétisée mais en quantités différentes. Ces altérations géniques aboutissent à la sélection progressive de cellules qui acquièrent des capacités de prolifération, d'adaptation à l'environnement et de survie caractéristiques du phénotype tumoral : si on réalise une co-culture de cellules normales et cancéreuses en quantité égale au départ, après 72 heures, on obtiendra beaucoup plus de cellules cancéreuses que de cellules normales.

Les pathologies cancéreuses sont-elles de simples maladies génétiques sporadiques ou bien héréditaires transmissibles à la descendance ? Dans la très grande majorité des cas, les altérations responsables de la pathologie cancéreuse sont somatiques, présentes uniquement dans les cellules tumorales. Cependant, dans de rares syndromes de prédispositions héréditaires aux cancers, une première mutation est présente dans la lignée germinale, mutation constitutionnelle portée par toutes les cellules de l'organisme, va prédisposer l'individu à la survenue de certains types de tumeurs.

2- Capacités acquises par la cellule cancéreuse

Les cellules cancéreuses acquièrent un certain nombre de caractéristiques selon une chronologie particulière initiée par des dysfonctionnements dans les mécanismes de régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose. Chacune de ces capacités lui permet de franchir une barrière physiologique qui s'oppose, normalement, à une prolifération cellulaire anarchique (**figure 1**).

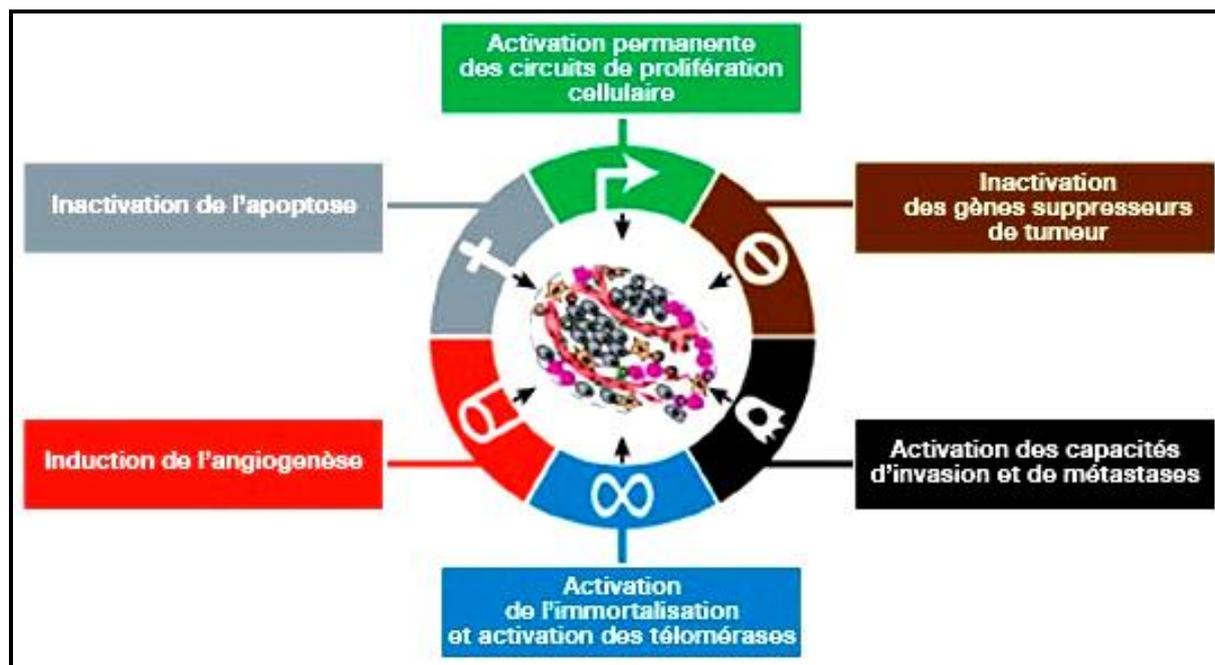


Figure 1. Caractéristiques générales de la cellule cancéreuse (Guasch, 2002).

- **La capacité de croissance exagérée, conséquence d'un dérèglement dans les mécanismes de régulation positive du cycle cellulaire :** en comparaison avec une cellule normale, la croissance d'une cellule cancéreuse est stimulée de façon non physiologique. Les mécanismes par lesquels la cellule cancéreuse parvient à cet état sont variables : production autocrine de facteurs de croissance, induction de la production de ces facteurs par le stroma tumoral, surexpression des récepteurs pour les facteurs de croissance, mutation et activation constitutionnelle de ces récepteurs, activation par mutation ou hyper-expression d'un ou plusieurs maillons des chaînes de transduction des signaux mitogènes. Ces mécanismes sont en général, mutuellement exclusifs et ce du fait que chacun suffit à ces cellules pour acquérir cette capacité.
- **L'insensibilité aux inhibiteurs physiologiques de la croissance cellulaire qui se traduit par des dysfonctionnements dans les mécanismes de régulation négative du cycle cellulaire :** la perte du contrôle physiologique de la prolifération cellulaire peut mettre en jeu : l'inactivation des mécanismes de contrôle physiologiques du cycle cellulaire (inhibiteurs de Cyclines/Cyclin-Dependent Kinase (CDKs), pRb et p53), l'inactivation du récepteur ou un autre maillon de la chaîne de transduction de signaux antiprolifératifs tels que le Tumor Growth Factor β (TGF β), l'échappement à la différenciation cellulaire.

- **L'échappement à l'apoptose** : les deux premières capacités acquises par la cellule cancéreuse sont dues à des altérations au niveau du génome. À l'état normal, la cellule dispose de plusieurs systèmes de surveillances capables de détecter des altérations au niveau du génome et d'enclencher, en conséquence, les mécanismes de réparation de l'ADN. Cependant, si la réparation s'avère impossible, la cellule s'oriente vers l'apoptose. Les cellules tumorales sont capables d'échapper à l'apoptose par : la sécrétion autocrine de facteurs de survie cellulaire (Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF1), IGF2 et Inter-Leukine 3 (IL-3)), l'inactivation d'activateurs physiologiques de l'apoptose tels que la protéine BCL2-associated X protein (BAX), mais, en particulier, la cellule cancéreuse parvient à échapper à cette mort par la surexpression d'inhibiteurs physiologiques de l'apoptose tels que B-Cell Lymphoma (BCL-2).

- **La capacité de se diviser de façon illimitée et d'échapper à la mort par sénescence** : Toute cellule normale a un potentiel de multiplication important mais limité. Une fois le nombre maximal de divisions préprogrammées atteint, la cellule entre en sénescence, ce qui conduit inévitablement à une mort par apoptose. La sénescence est due à un raccourcissement des télomères à chaque cycle de division jusqu'à atteindre une longueur critique initiant ainsi le phénomène de mort apoptotique. Cependant, dans les cellules souches et germinales, la longueur des télomères est maintenue par la télomérase. L'expression du gène de la télomérase est réprimée dans toutes les cellules normales de l'organisme (excepté les cellules souches et germinales). La cellule cancéreuse parvient à échapper à cette fatalité ; immortalisation par dérégulation du gène de la télomérase ou par activation de mécanismes alternatifs permettant la maintenance des télomères.

- **La capacité d'induire une néo-angiogenèse** : la néo-angiogenèse est le mécanisme, dans le cadre de la transformation cancéreuse, qui permet de créer de nouveaux vaisseaux sanguins, dans le but de nourrir les tumeurs et d'assurer leur croissance. La néo-angiogenèse ne se rapporte qu'au cancer, puisque l'angiogenèse est le mécanisme responsable de la formation des vaisseaux sanguins dans l'ensemble du corps humain (excepté pour les tumeurs). Les vaisseaux sanguins sont un élément-clé dans le développement des cellules, tumorales ou non, puisqu'ils assurent le transport du sang, véhiculent les éléments nutritifs nécessaires aux cellules et éliminent leurs déchets. Cela se fait par modification de l'équilibre entre activateurs et inhibiteurs de l'angiogenèse (impliquent essentiellement le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)).

- **Les capacités d'invasion et de métastases** : la métastase et l'invasion locale caractérisent les cellules des tumeurs malignes.

La métastase est définie par la capacité des cellules tumorales à migrer en empruntant les voies de circulation sanguine et/ou lymphatique, à s'implanter dans un site distant puis à proliférer. L'invasion désigne la capacité des cellules tumorales d'infiltrer les tissus avoisinants. Les cellules tumorales prolifèrent dans les organes atteints, formant des foyers secondaires, souvent multiples.

La métastase définit la tumeur qui est soit bénigne, soit maligne : les tumeurs malignes sont celles qui peuvent se propager par invasion et métastases tandis que des tumeurs bénignes ne peuvent que grandir sur place (localement).

3- Gènes impliqués dans la transformation cancéreuse

On estime que dans certains cancers, plus de 1000 gènes ont une expression altérée dans les cellules tumorales. L'altération de ces gènes ne résulte pas toujours d'une mutation mais peut être également le résultat d'une modification épigénétique.

- **Les mécanismes mutationnels les plus répandus observés au cours de la transformation maligne sont** : les mutations ponctuelles (substitution, délétion et insertion), amplifications, délétions, réarrangements chromosomiques (essentiellement des translocations, rarement pertes ou gains de chromosomes entiers) (cette section sera développée dans le chapitre V).
- **Les mécanismes épigénétiques** impliqués se récapitulent à deux processus :
 - **d'une part, des modifications de la chromatine et en particulier par la modulation de l'acétylation des histones** : l'hypo-acétylation conduit à une chromatine condensée, inaccessible et donc transcriptionnellement inactive alors que l'hyper-acétylation conduit à une chromatine relâchée, accessible et donc transcriptionnellement active,
 - **d'autre part, des modifications du profil de méthylation de l'ADN peuvent être impliquées dans des processus cancéreux** : l'hypométhylation des régions promotrices conduit à un état de l'ADN transcriptionnellement actif alors que l'hyperméthylation mène à un état de l'ADN transcriptionnellement inactif.

Pour qu'une altération génique puisse contribuer à une transformation cancéreuse, elle doit cibler des gènes spécifiques. Une classification a d'abord été faite selon la fonction des protéines codées par ces gènes. Il a été constaté que les principaux gènes cibles des altérations carcinogénétiques sont impliqués dans des processus cellulaires clefs tels que :

- la régulation positive et négative de la prolifération cellulaire. Autrement dit, les activateurs et les inhibiteurs de ce processus,
- la régulation de la différenciation et de la sénescence cellulaire,
- la régulation de l'apoptose,
- le contrôle du maintien de l'intégrité du génome incluant les mécanismes de réparation de l'ADN et de la surveillance du génome.

Cette classification présente, cependant, quelques lacunes. Il est très difficile de classer certains gènes impliqués dans la transformation cancéreuse dans l'un de ces 4 groupes. À titre d'exemple : la p53 dont les fonctions sont multiples, peut-être classée avec les gènes impliqués dans la régulation négative de la prolifération, dans la régulation de la sénescence, dans la régulation de l'apoptose ainsi que dans le maintien de l'intégrité du génome.

De ce fait, il a été élaboré une meilleure classification, plus simple et plus pertinente, permettant de classer ces gènes selon le mode d'action : les oncogènes qui agissent selon un mode dominant et les gènes suppresseurs de tumeurs qui agissent selon un mode récessif.

L'approche utilisée aujourd'hui est une classification fusionnant les deux notions ; tout d'abord une distinction selon le mode d'action, dominant ou récessif, suivie d'une répartition en fonction du rôle physiologique de la protéine synthétisée par ces gènes.

Les proto-oncogènes, lorsqu'ils sont altérés fonctionnent comme des accélérateurs d'une prolifération anarchique alors que les gènes suppresseurs de tumeurs, lorsqu'ils fonctionnent normalement, agissent plutôt comme des freins physiologiques à cette prolifération désordonnée. Il en découle que les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs possèdent des activités antagonistes (**figure 2**).

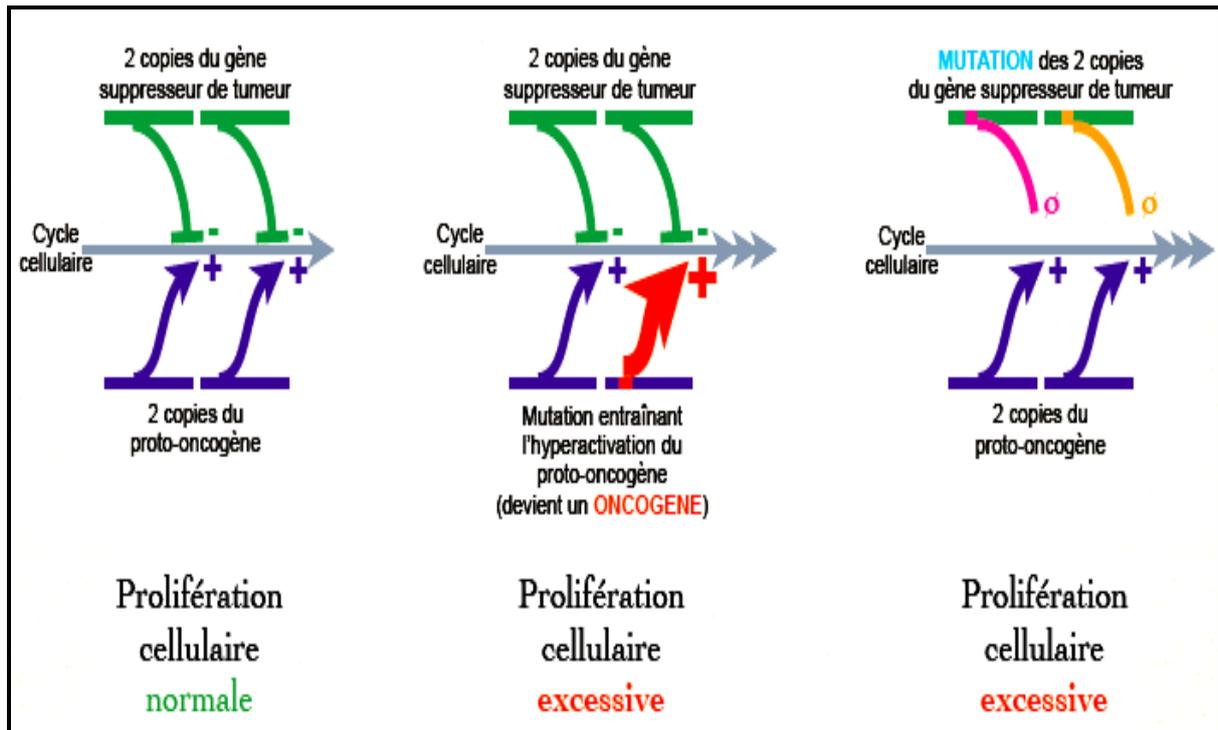


Figure 2. Mode de fonctionnement des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs (Harousseau, 2011).

3-1- Oncogènes

Le proto-oncogène (*c-onc*) est un gène cellulaire normal, susceptible de devenir, par suite d'une modification qualitative ou quantitative d'expression, un gène transformant capable de conférer le phénotype cancéreux à une cellule normale. Ces gènes sont physiologiquement impliqués dans le contrôle des processus de prolifération, de différenciation et d'apoptose et dont l'altération dite : « activation », peut entraîner la transformation cellulaire maligne. L'altération oncogénique est responsable d'un gain de fonction : la protéine altérée fonctionne plus que la protéine normale. Ces oncogènes agissent donc selon le mode dominant. En effet l'activation d'un seul des deux allèles est suffisante pour acquérir le gain de fonction.

Pour caractériser un oncogène il faut connaître l'aspect physiologique avant de passer à l'aspect pathologique et donc identifier dans l'ordre : la protéine codée par ce proto-oncogène dans les conditions normales, le rôle physiologique de ce proto-oncogène toujours dans les conditions normales, les modifications quantitatives ou qualitatives pouvant transformer cette protéine normale en une protéine oncogénique et enfin l'impact de ces modifications sur le phénotype cellulaire.

Les oncogènes sont répartis en 5 grandes classes en fonction des onco-protéines pour lesquelles ils codent. Il s'agit, en général, de molécules faisant partie de la chaîne de transduction du signal prolifératif impliquées dans la régulation positive du cycle cellulaire :

- les facteurs de croissance,
- les récepteurs aux facteurs de croissance, généralement à activité Tyrosine Kinase (TK),
- les protéines intracytoplasmiques transductrices de signaux, comme les protéines G, dont l'activité est dépendante de la phosphorylation du Guanosine Di-Phosphates (GDP) en Guanosine Tri-Phosphates (GTP),
- les facteurs de transcription,
- les gènes impliqués dans la régulation négative de l'apoptose.

Les proto-oncogènes peuvent se transformer en oncogènes suite à divers types d'altérations au niveau du génome :

- **par une mutation qui modifie la séquence d'ADN avec pour conséquence la modification de la séquence et la structure de la protéine** : la fonction de la protéine va être modifiée car celle-ci est intimement liée à sa structure qui dépend de sa séquence. C'est la conséquence, le plus souvent, d'une mutation faux-sens. Il s'agit d'une modification qualitative d'expression qui va rendre la protéine exprimée par l'oncogène plus stable ou constitutivement active,
- **par une mutation qui modifie la séquence d'ADN au niveau des régions régulatrices donc sans la modification de la séquence et la structure de la protéine** : il s'agit d'une modification quantitative d'expression qui va induire une surexpression de la protéine normale, une expression à un moment inhabituel dans le cycle cellulaire ou encore une expression ectopique dans un type cellulaire aberrant,
- **lors d'un réarrangement chromosomique, le plus souvent de type translocation** : avec deux évènements moléculaires possibles,
 - **la fusion d'un proto-oncogène avec un second gène** : conduisant à l'expression d'une protéine chimérique, anormale, de fusion. C'est une modification qualitative d'expression,
 - **la juxtaposition d'un proto-oncogène avec les séquences de régulation d'un autre gène fortement exprimé à l'état normal dans la cellule** : il en résulte l'expression en grande quantité (hyper-expression ou surexpression) de la protéine normale. Il s'agit dans ce cas de figure d'une modification quantitative d'expression,

- **lors d'une modification épigénétique** : le promoteur d'un proto-oncogène peut se retrouver hypométhylé ou la chromatine associée peut se retrouver hyper-acétylée ce qui provoquera, dans cette situation, une surexpression de la protéine normale. Il est important de mentionner qu'une altération épigénétique ne peut conduire qu'à une modification quantitative d'expression car elle n'implique aucun changement dans la séquence d'ADN.

3-2- Gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeurs, aussi appelés anti-oncogènes, sont dans les cellules normales, des régulateurs négatifs de la division cellulaire. Ils empêchent ainsi une prolifération excessive. Lorsqu'ils sont absents ou déficients, ils peuvent être à l'origine de certains cancers. Cela explique le fait que ces gènes agissent selon le mode récessif. En effet, l'inactivation des deux allèles est nécessaire pour produire la perte de fonction.

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont répartis également en 5 grandes classes en fonction des protéines pour lesquelles ils codent. Il s'agit, en général, de molécules faisant partie de la chaîne de transduction du signal antiprolifératif impliquées dans la régulation négative du cycle cellulaire :

- les inhibiteurs du cycle cellulaires : inhibiteurs de Cyclines/CDKs, pRb et p53,
- la chaîne de transduction du signal antiprolifératif : TGF β , TGF β RI et TGF β RII,
- les gènes de réparation de l'ADN organisés en grands systèmes : Mis-Match Repair (MMR), Nucleotide Excision Repair (NER), Base Excision Repair (BER) et Double Strand Base Repair (DSBR),
- les gènes de surveillance de l'intégrité du génome codant pour les protéines qui régulent le fonctionnement des points de contrôle de qualité ou "check point" situés entre G₁ et S, G₂ et M ainsi qu'entre la métaphase et l'anaphase,
- les gènes impliqués dans la régulation positive de l'apoptose.

Les gènes suppresseurs de tumeurs peuvent être inactivés suite à divers types d'altérations au niveau du génome :

- **par une mutation qui modifie la séquence d'ADN avec pour conséquence la modification de la séquence et la structure de la protéine :** il s'agit d'une modification qualitative d'expression qui va rendre la protéine exprimée non fonctionnelle conséquence, le plus souvent, d'une mutation non-sens ou d'une délétion. En effet, l'introduction d'un codon stop prématuré par mutation non-sens dans le cadre de lecture induit la synthèse d'une protéine tronquée. De même, une délétion totale ou partielle conduit, sur un plan moléculaire, à la même conséquence.
- **par une mutation qui modifie la séquence d'ADN au niveau des régions régulatrices sans modifier la séquence du gène et la structure de la protéine :** il s'agit d'une modification quantitative d'expression qui va induire une perte d'expression de la protéine normale.
- **lors d'un réarrangement chromosomique de type translocation :** il s'agit d'un évènement assez rare en comparaison avec la fréquence du même évènement dans l'activation de proto-oncogènes. Cette modification conduit, le plus souvent, au déplacement d'un gène suppresseur de tumeurs, suite à la translocation, dans un environnement transcriptionnellement inactif (ou très peu actif) avec pour conséquence une modification quantitative d'expression.
- **lors d'une modification épigénétique :** le promoteur d'un gène suppresseur de tumeurs peut se retrouver hyper-méthylé ou la chromatine qui lui est associé peut se retrouver hypo-acétylée ce qui provoquera, dans ces cas de figure, une diminution voire une absence complète d'expression de la protéine normale.

Chapitre III

Régulation du cycle cellulaire

1- Concept de régulation du cycle cellulaire

La division cellulaire est le processus fondamental par lequel une cellule-mère donne deux cellules-filles identiques entre elles et à la cellule dont elles dérivent : la mitose est un processus conservateur de l'information génétique. Le cycle cellulaire est essentiellement constitué de deux temps, l'interphase, au cours de laquelle les chromosomes sont répliqués, et la mitose, au cours de laquelle les chromosomes se répartissent équitablement entre les deux cellules-filles. La division cellulaire est un processus essentiel au développement embryonnaire, mais également vital pendant toute la vie de l'organisme adulte. Ainsi, l'être humain adulte est constitué de 10 000 milliards de cellules, provenant toutes, par mitoses successives, de la cellule initiale : l'œuf fécondé. Une fois la taille adulte atteinte, les divisions continuent. Tous les jours un milliard de cellules doivent être renouvelées pour remplacer celles qui sont perdues de façon continue, accidentellement, par usure ou sénescence, en particulier au niveau de la peau, des muqueuses et du système hématopoïétique.

Ce mécanisme de division cellulaire est extrêmement complexe et régulé par un grand nombre de protéines intervenant très transitoirement et dans un ordre précis, permettant ainsi la succession précise et harmonieuse des différentes étapes du cycle cellulaire. Il arrive occasionnellement qu'une anomalie de régulation de la division apparaisse dans une cellule en cycle. Cette anomalie transmissible libère la cellule des multiples régulations qui limitent ses capacités de division. L'apparition de ces anomalies est favorisée par les produits cancérigènes (tabac, amiante, etc.). Une fois ces anomalies établies, la cellule devient « cancéreuse ».

Tous ces travaux ont été couronnés par l'attribution en octobre 2001 du prix Nobel de physiologie et de médecine à trois acteurs essentiels du décryptage des mécanismes de régulation du cycle cellulaire, les Britanniques *Tim Hunt* et *Paul Nurse*, et l'Américain *Leyland Hartwell*.

2- Phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un événement universel permettant la division des cellules et ainsi, participe à la croissance et au développement des organismes vivants. Les eucaryotes, de la levure à l'homme, ont des cycles de division cellulaire similaires. Le cycle cellulaire est constitué d'un ensemble d'événements moléculaires et cellulaires orchestrés dans le temps et l'espace et qui doivent se réaliser suivant un ordre chronologique précis.

Il permet ainsi le maintien d'une information génétique constante, en quantité et en qualité, au niveau des chromosomes malgré la duplication des cellules de génération en génération. Chez les eucaryotes, le cycle cellulaire est divisé en deux grandes étapes : l'interphase (I), phase de croissance cellulaire continue où les chromosomes ne sont pas visibles et la mitose (M) (du mot grec *Mito* qui signifie « filet ») où les chromosomes, visibles et condensés, ségrégent pour donner deux cellules-filles génétiquement identiques. L'interphase est classiquement subdivisée en trois phases : G₁, S et G₂. Même si des modèles descriptifs différents ont été proposés : le modèle à 12 phases de *Darzynkievicz* et le modèle à 2 phases de *Smith*, le modèle commun du cycle cellulaire, le plus largement accepté, est celui d'un cycle en quatre phases de *Howard* : G₁, S, G₂ et M qui se succèdent dans un ordre immuable. Au cours de l'interphase, le noyau de la cellule est limité par une enveloppe nucléaire, alors que la mitose est caractérisée par la disparition de cette enveloppe et par l'apparition des chromosomes visibles, structurés et individualisés (**figure 3**).

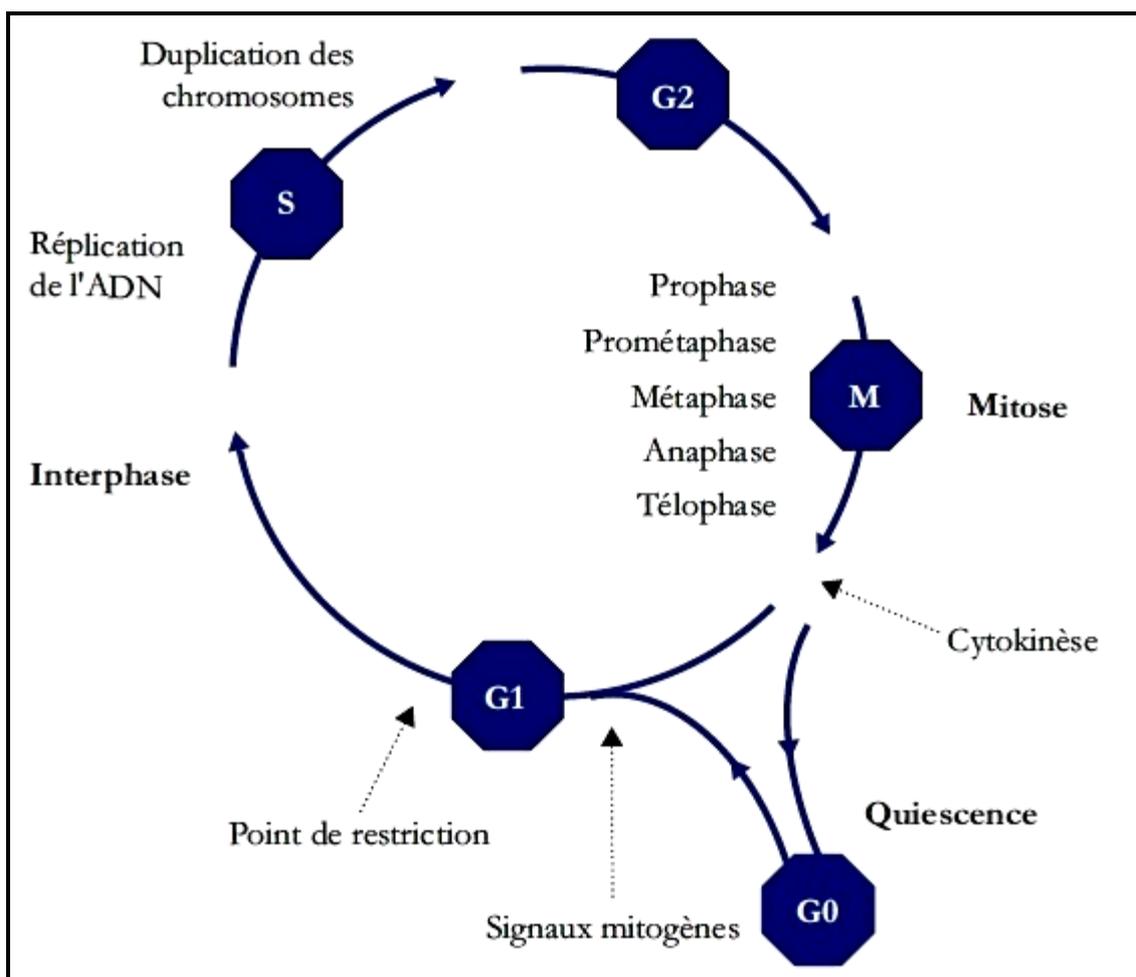


Figure 3. Phases et événements majeurs du cycle de division cellulaire (Meijer, 2006).

À l'exception des premières divisions embryonnaires chez la drosophile ou le xénope, caractérisées par une succession rapide de phases S et M, ces phases se retrouvent dans la plupart des divisions cellulaires. Les quatre phases s'enchaînent de façon coordonnée, chaque phase ne pouvant commencer que lorsque la précédente s'est déroulée correctement. De nombreux mécanismes de contrôle, appelés points de contrôle de qualité ou «check-points» assurent une sorte de « contrôle qualité » à chaque étape et bloquent le déroulement du cycle lorsqu'une anomalie est détectée : endommagement de l'ADN, ADN non complètement répliqué, chromosomes non attachés au fuseau mitotique par exemple. La durée d'un cycle est très variable selon le type de cellule et l'organisme. Les variations les plus importantes concernent la phase G₁. La durée d'un cycle est de huit minutes pour une cellule embryonnaire de drosophile et de 24 h pour une cellule somatique de mammifères. Chez la plupart des cellules de mammifères, un cycle dure entre 10 et 30 heures. Il est généralement admis que les phases S, G₂ et M possèdent des durées fixes dans les cellules normales. Seule, la durée de la phase G₁ est très variable : 6,5 heures dans les fibroblastes humains *in vitro* et 33 heures dans l'épithélium rectal humain *in vivo*. Dans le cas de cellules cancéreuses, les cinétiques sont beaucoup plus variables et peuvent être proches de la normale (carcinome épidermoïde humain) ou très différentes (carcinome basocellulaire avec une phase G₂/M très longue).

- **Phase G₁** : la phase G₁ (pour Gap 1, jonction 1), de durée variable, est définie comme la première phase traversée par la cellule après la division cellulaire. Elle succède à la division cellulaire et précède la phase S. C'est une phase au cours de laquelle la cellule choisit de proliférer, d'attendre (entrer en phase de quiescence) ou de se différencier. Deux facteurs jouent un rôle prépondérant sur le comportement de la cellule lors de cette phase : la croissance et les facteurs environnementaux et physiologiques : disponibilité en nutriments, mitogènes, hormones, augmentation de masse cellulaire. L'environnement de la cellule est primordial car c'est lui qui favorisera ou non, par la balance entre facteurs de croissance et facteurs de différenciation, la cellule à se diviser. Ces facteurs n'influencent la cellule que pendant une période définie de la phase G₁, de telle sorte que lorsque les conditions sont favorables, la cellule s'engage irréversiblement dans le cycle de division. La perte de sensibilité aux facteurs environnementaux ainsi que l'irréversibilité de « l'induction » de la cellule dans la phase de synthèse de l'ADN définit le point de restriction R chez les eucaryotes supérieurs (appelé point de transition START chez les levures). Au-delà de cette transition, la cellule achève son cycle cellulaire indépendamment des facteurs exogènes.

- **Point de restriction R :** une cellule ne peut entrer en cycle que sous l'effet de facteurs stimulateurs appelés mitogènes. Pendant la phase G_1 , la cellule « décide » si elle continue à progresser dans le cycle cellulaire, ce qui aboutira à la division cellulaire, ou si elle quitte le cycle et entre alors dans un état de quiescence (G_0) ou de différenciation. Dès 1971, *Temin* a montré que des cellules de poulet deviennent indépendantes des signaux mitogènes extérieurs plusieurs heures avant d'entrer en phase S. Cette notion a été reprise et développée plus tard par *Pardee* qui a introduit le terme de point de restriction (R ou « commitment point » en anglais). R est défini aujourd'hui comme le moment de G_1 après lequel les cellules peuvent proliférer indépendamment des stimuli extérieurs.

- **Phase S :** la phase S est la phase de synthèse de l'ADN pendant laquelle se fait répllication des chromosomes à l'identique. Le brin nouvellement synthétisé est exactement complémentaire à la matrice. Sa durée, peu variable, est principalement dépendante de la quantité d'ADN à répliquer et du nombre d'origines de répllication actives en parallèle. La synthèse de l'ADN est coordonnée avec celle des histones de manière synchrone. Cette phase se caractérise par l'arrêt de la synthèse des autres Acides Ribo-Nucléiques (ARN) (ARN messenger et ARN ribosomique).

- **Phase G_2 :** la phase G_2 est une phase courte, d'une durée de 4 à 5 heures, débutant dès que la répllication de l'ADN est achevée. La cellule contient le double de la quantité habituelle d'ADN (tétraploïdie transitoire). Il s'agit d'une phase de « sécurité » au cours de laquelle la cellule a le temps de réparer d'éventuelles erreurs commises lors de la répllication de son ADN. Cette étape de transition permet à la cellule de se préparer à la division mitotique et se caractérise par : une augmentation de la masse cellulaire ainsi que la synthèse des éléments nécessaires à la mitose. Un certain nombre de facteurs sont synthétisés en particulier les facteurs de condensation des chromosomes ou protéines SMC (Structural Maintenance of Chromosomes). Il s'agit de protéines mécano-chimiques de la chromatine qui provoquent l'enroulement de la chromatine et permet sa condensation. Au cours de cette phase, il se produit aussi des phosphorylations des histones H1 : modifications post-traductionnelles qui interviendraient également dans la condensation des chromosomes.

- **Mitose ou phase M** : il s'agit de la phase durant laquelle la cellule « réalise » sa division en deux cellules-filles. Elle est classiquement découpée en cinq périodes : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase. C'est la phase la plus courte mais la plus spectaculaire du cycle cellulaire et ce contrairement à l'interphase qui ne s'accompagne d'aucun changement morphologique observable sous microscope optique notable (excepté une légère hypertrophie à partir de la phase G_1). Brièvement, au cours de la mitose, se produisent les évènements suivants :

- **prophase** : l'enveloppe nucléaire se désagrège, les chromosomes se condensent et deviennent visibles sous la forme d'entités indépendantes,
- **prométaphase et métaphase** : les deux organisateurs des microtubules (ou corps polaires), se déplacent pour se retrouver chacun d'un côté du noyau. Des faisceaux de microtubules se développent à partir des corps polaires pour former le fuseau mitotique (fuseau achromatique). Quelques-uns de ces microtubules s'attachent aux kinétochores des chromosomes qui, ainsi attachés, s'alignent alors sur la plaque métaphasique (plaque équatoriale) dans un plan situé à mi-chemin entre les corps polaires.

La prométaphase est marquée par la rupture totale de l'enveloppe nucléaire alors que la métaphase est définie par l'alignement de tous les chromosomes sur la plaque équatoriale,

- **anaphase** : lorsque tous les kinétochores sont attachés aux microtubules et alignés sur la plaque métaphasique, un signal est donné et l'anaphase débute. Les chromosomes commencent à se déplacer vers les pôles qui s'éloignent par ailleurs l'un de l'autre. Les chromosomes regroupés aux pôles cellulaires forment une masse compacte,
- **télophase** : la reconstruction du noyau commence et l'enveloppe nucléaire se reforme. La cytokinèse achève la division de la cellule produisant deux cellules-filles. À travers ce mécanisme, les deux cellules-filles sont dotées des mêmes chromosomes que ceux de la cellule-mère. Après la division, les cellules retournent en phase G_1 (ou en G_0) terminant ainsi le cycle cellulaire. Cette succession de phases est caractéristique de tous les eucaryotes.

3- Cyclines et CDK

L'une des découvertes majeures dans le domaine du cycle cellulaire a été l'identification d'une famille de protéines kinases (enzymes phosphorylantes), les kinases cyclines dépendantes ou CDKs (Cyclin Dependent Kinases). Ces protéines kinases jouent en effet un rôle essentiel dans le déclenchement, le contrôle et la succession harmonieuse des différentes phases du cycle. Les CDKs sont actives uniquement sous forme d'un complexe entre une sous-unité catalytique (CDK) et une sous-unité régulatrice (Cycline). Les cyclines sont des protéines formées et dégradées au cours du cycle cellulaire. Elles ont été appelées ainsi car leurs concentrations varient périodiquement au cours du cycle cellulaire. D'après le séquençage du génome humain, il existerait 13 CDKs et 25 cyclines, mais toutes les possibilités de formation de complexes CDK/cyclines ne sont pas encore connues. Par ailleurs, certaines CDKs sont impliquées dans des fonctions autres que la régulation du cycle cellulaire, comme les CDK5 et CDK11 qui ont des fonctions neuronales ainsi que CDK7, CDK8 et CDK9 jouant un rôle dans la transcription (**figure 4**).

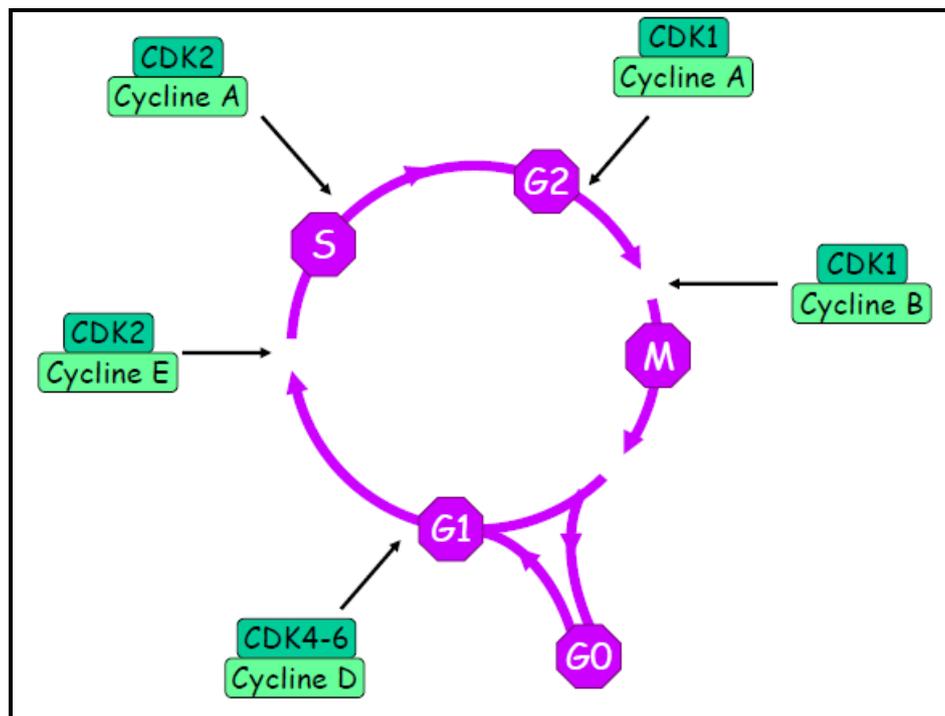


Figure 4. Implication des CDKs dans le contrôle du cycle cellulaire (Meijer, 2006).

Schématiquement, CDK4 et CDK6, associées à des cyclines de type D, régulent le déroulement de la phase G₁. Puis CDK2/cycline E prend le relais pour assurer la transition G₁/S, suivie par CDK2/ cycline A qui assure le contrôle de la phase S. CDK1/cycline A intervient en G₂, CDK1/cycline B régule la transition G₂/M et l'entrée en mitose.

Quatre niveaux de régulation contribuent à l'activité transitoire des CDKs :

- **assemblage transitoire des complexes CDKs/cyclines** : lié à une durée de vie des cyclines qui est généralement courte avec une succession rapide de synthèse, d'interaction avec une CDK et de dégradation ubiquitine dépendante,
- **modifications post-traductionnelles** : essentiellement des réactions enzymatiques de phosphorylations / déphosphorylations conduisant à l'activation ou à l'inactivation des CDKs. À titre d'exemple, les CDKs sont phosphorylées sur deux résidus adjacents (thréonine 14 et tyrosine 15 pour CDK1). Cette phosphorylation inhibitrice est levée par une famille de phosphatases très particulières, les phosphatases CDC25 A, B, C. En revanche, la phosphorylation d'un résidu thréonine 161 pour la CDK1 est essentielle à l'activation des CDKs. Cette phosphorylation est catalysée par CDK7 associée à la cycline H. En conclusion, l'activation des CDK est dépendante, en grande partie, d'un phénomène de phosphorylations réversible (**figure 5**).

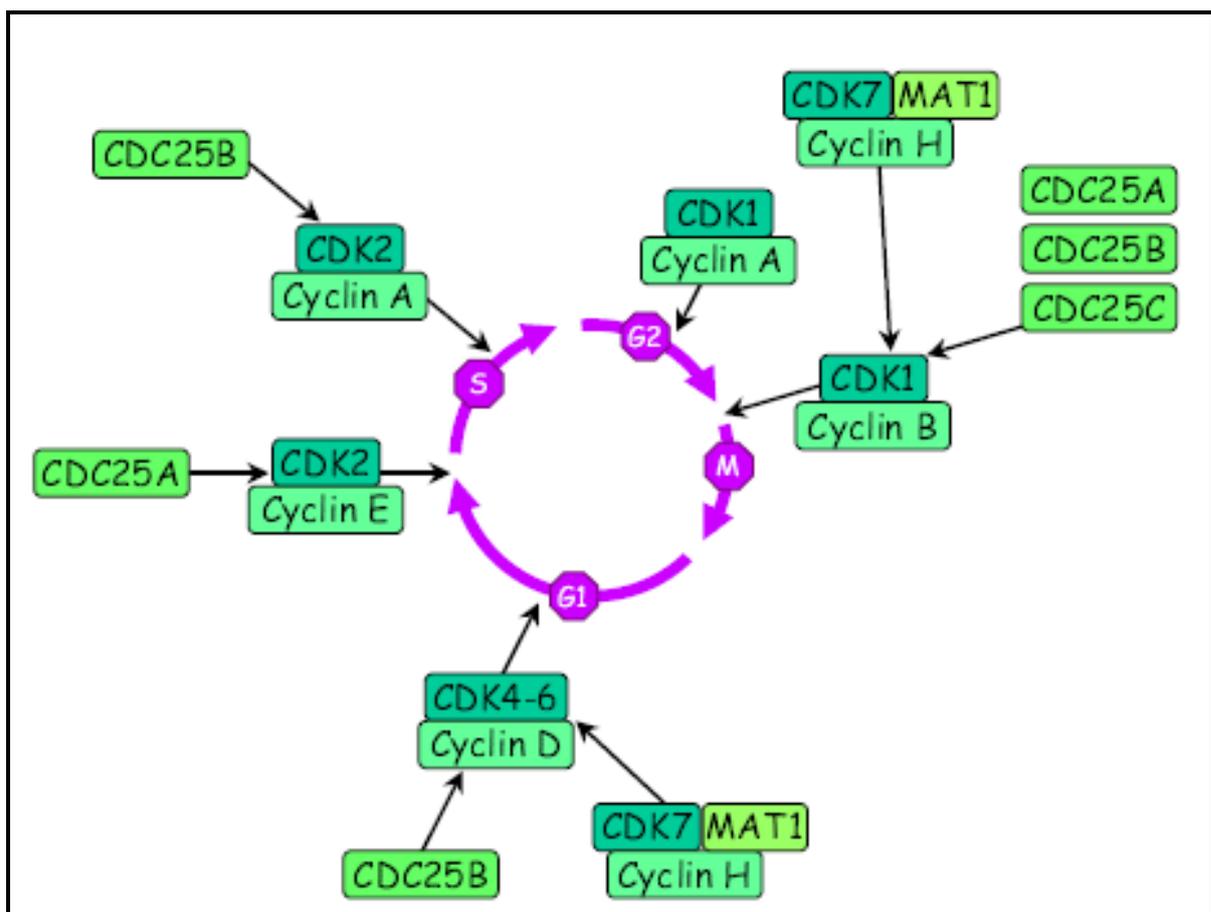


Figure 5 : Régulation de l'activité des CDKs par phosphorylations réversibles (Meijer, 2006).

- **associations transitoires avec des inhibiteurs protéiques** : il en existe deux types, la famille Inhibitory Kinase 4 (INK4), dont les membres interfèrent avec la fixation des cyclines de type D sur la CDK, et la famille Cyclin Inhibiting Protein (CIP) / Kinase Inhibiting Protein (KIP) comme p21CIP1 et p27KIP1, dont les membres se fixent sur les complexes CDK/ cyclines et les inactivent (**figure 6**).

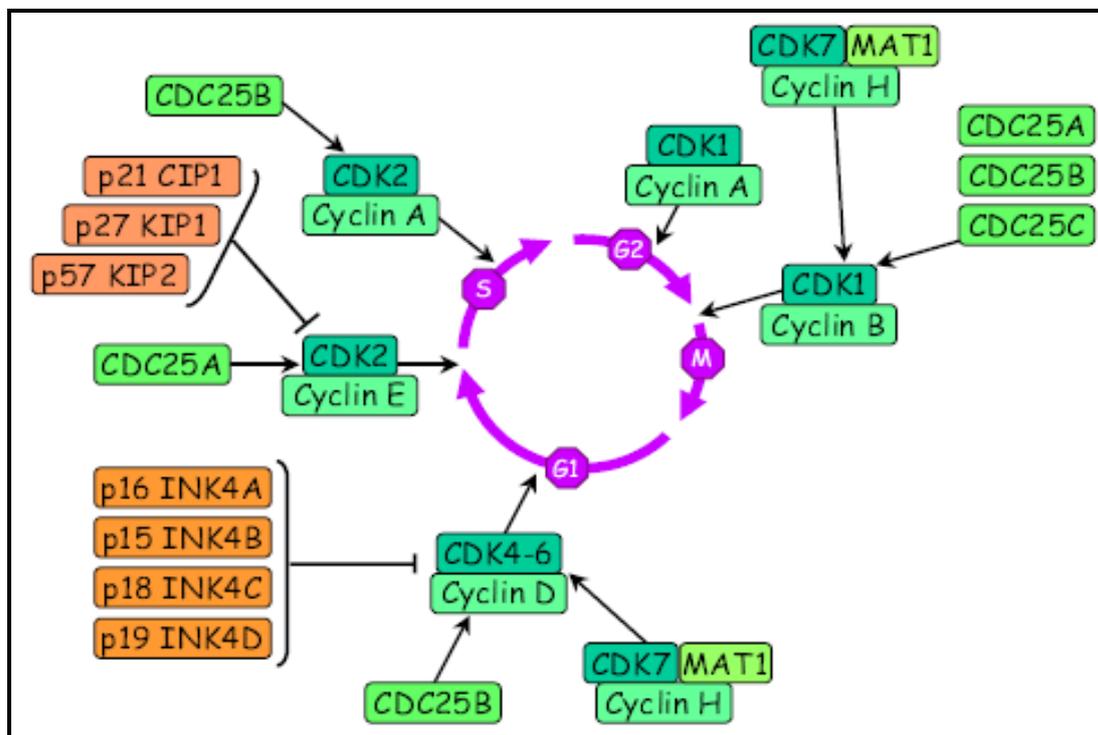


Figure 6. Régulation de l'activité des CDKs par des inhibiteurs protéiques (Meijer, 2006).

- **changements très importants de localisation intracellulaire** : la localisation des complexes cycline-CDK, au cours du cycle cellulaire, est un élément supplémentaire du contrôle de leur activité. Les mécanismes moléculaires engagés dans ce contrôle sont encore très mal connus. La localisation intracellulaire des complexes CDK/cycline dépend de la cycline elle-même. Les cyclines B et D (et peut-être d'autres cyclines) sont régulées par un contrôle qui les exporte du noyau. La cycline B qui est exportée du noyau en interphase. La phosphorylation de la cycline B pendant la mitose inhibe son interaction avec les protéines d'exports et permet son accumulation dans le noyau. De cette façon, la cellule s'assure que les complexes CDK/cycline B sont actifs seulement lors de la mitose et non pas pendant les autres étapes du cycle cellulaire. Ceci empêche une entrée prématurée en mitose ou la possibilité que les complexes CDK/cycline B active la phase S. Une expression nucléaire forcée de la cycline B et de CDK1 en G₁ déclenche la phase S.

4- Points de régulation importants dans la progression du cycle cellulaire

- **Transition G₀/G₁** : il existe une grande variété de facteurs mitogènes. Ces facteurs agissent, en général, par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires de type TK ou encore couplés à des protéines G (de type RAS (Rat sarcoma virus) et RHO (RAS homolog). En général, une cascade de signalisation conduit à la stimulation de la transcription de gènes essentiels pour l'entrée en division (en particulier la cycline D ainsi que les CDK1 et 2).
- **Progression en G₁** : le début du cycle cellulaire nécessite la transcription d'un certain nombre de gènes, tels ceux des cyclines D et E, p21, p27 ; ces gènes sous le contrôle des facteurs de transcription de la famille E2F. Les cellules sont maintenues en G₁ grâce aux protéines de la famille du rétinoblastome, pRb, p107 et p130 (pocket proteins). Ces suppresseurs de tumeurs bloquent le cycle cellulaire en s'associant avec E2F. En effet, en complexe avec pRb, les facteurs E2F, restent inactifs. Au cours de G₁, les CDKs phosphorylent pRb, ce qui conduit à la dissociation du complexe Rb/E2F, et donc à la libération de facteurs E2F actifs. Il semblerait que CDK4/6, associée aux cyclines D, initie le processus et permet une activation transcriptionnelle partielle. Une phosphorylation supplémentaire de pRb par CDK2/cycline E permet la libération complète des facteurs E2F, et donc leur action complète comme activateurs transcriptionnels (**figure 7**).

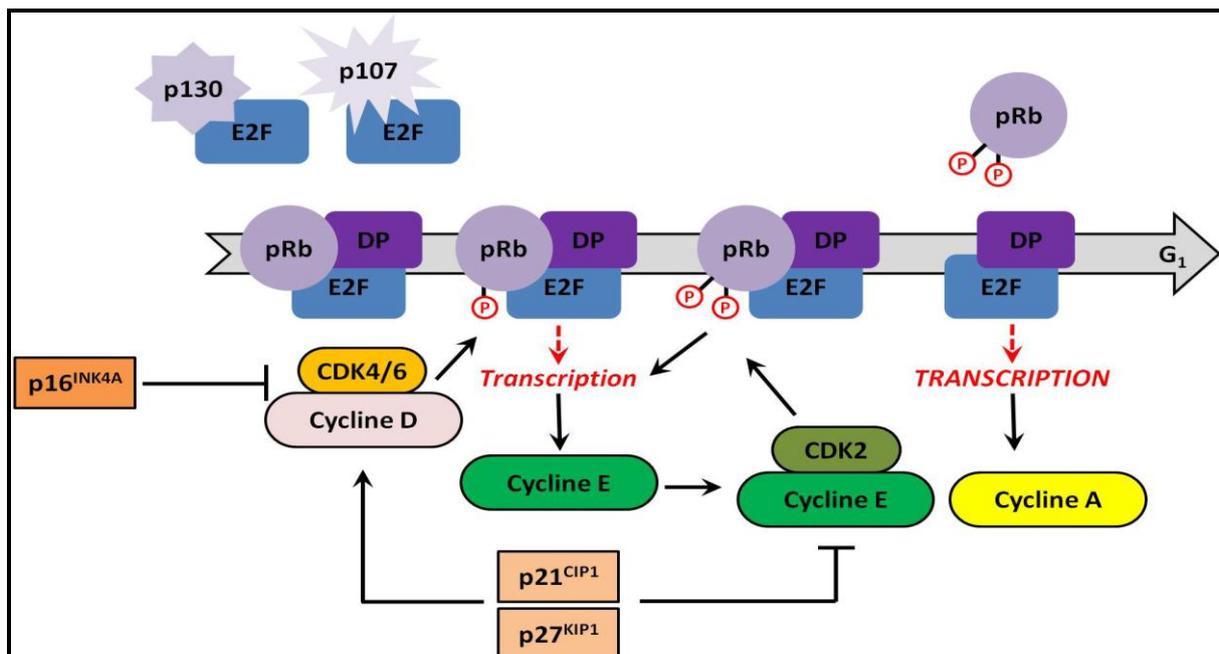


Figure 7. Régulation de la progression en G₁ du cycle cellulaire (Meijer, 2006).

- **Fin de G₁ et la préparation à la transition G₁/S** : la préparation à la transition G₁/S commence tout d'abord par l'assemblage d'un complexe pré-répliatif (pre-RC). L'ORC (Origin Recognition Complex), complexe de six sous-unités (Orc1-6), lie l'Adénosine Tri-Phosphates (ATP), puis se fixe sur l'ADN au niveau des origines de réplication.
- **Phase M** : la phase M comporte des 5 étapes, décrites il y a plus de cent ans de cela, essentiellement sur la base de la morphologie des chromosomes et de l'enveloppe nucléaire. Une nouvelle nomenclature, s'appuyant également sur les événements moléculaires qui contrôlent et accompagnent ces événements morphologiques, a été proposée récemment. Elle comporte 5 transitions, chacune étant caractérisée par l'activité de protéines kinases particulières et par la succession de destructions protéolytiques de certains substrats (**figure 8**).

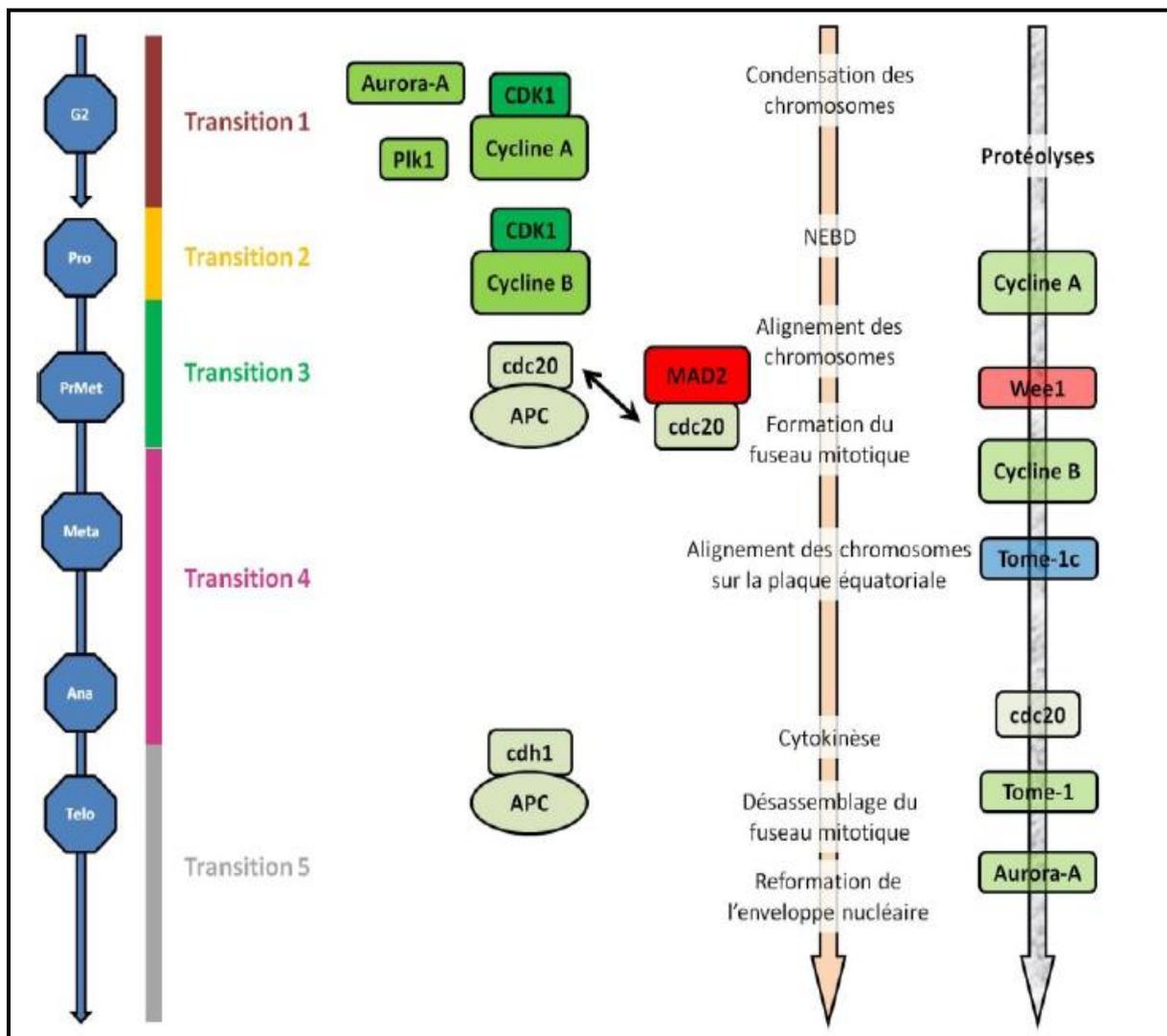


Figure 8. Description du déroulement de la phase M du cycle cellulaire (Meijer, 2006).

- **Transition 1 :** chevauche la fin de G₂ et, est la plus grande partie de la prophase. Elle est caractérisée par l'activité des kinases CDK/ cycline A, PLK1, AURORA-A. Pendant cette période, CDK1/cycline B est inactive et cytoplasmique.
- **Transition 2 :** est caractérisée par l'activation de CDK1/cycline B par CDC25 et son déplacement vers le noyau, suivie par la rupture de l'enveloppe nucléaire.
- **Transition 3 :** correspond bien à la prométaphase. Un certain nombre de critères comme l'attachement des kinétochores au fuseau ainsi que l'activation de l'APC (Anaphase Promoting Complex) modulée par l'attachement des microtubules au kinétochores, doivent être satisfaits pour que la mitose se termine. La cycline A est détruite à ce stade, alors que la cycline B reste présente.
- **Transition 4 :** au cours de cette phase, les kinétochores étant tous reliés à des microtubules et l'APC est complètement activé. Il peut donc s'attaquer d'une part à la sécurine, conduisant à la disjonction des chromatides, et, d'autre part, à la cycline B, permettant l'entrée en télophase.
- **Transition 5 :** est caractérisée par le fait que, la cycline B étant détruite, CDK1 est inactivée et une nouvelle enveloppe nucléaire peut se reformer. La cytokinèse a lieu, et la cellule se retrouve en interphase.

5- Contrôle de l'état de l'ADN

Lorsque l'ADN est endommagé, des mécanismes complexes sont activés. Ils conduisent à un arrêt du cycle cellulaire et permettent à la cellule soit de réparer cet ADN endommagé, soit, si les dommages sont trop importants, d'enclencher un programme de mort cellulaire par apoptose. Plusieurs niveaux d'arrêts sont possibles. On parle ainsi des :

- « **G₁/S checkpoint** » lorsque l'entrée en phase S est bloquée jusqu'à réparation de l'ADN endommagé (blocage de CDK2),
- « **G₂ DNA damage check-point** » lorsque l'arrêt a lieu avant l'entrée en phase M (blocage de CDK1).

Ce concept de « point de contrôle du cycle cellulaire » a ensuite été étendu. Il est maintenant courant de considérer le cycle cellulaire mammalien comme une succession de points de contrôle qui doivent être franchis pour que la division puisse s'achever. Il n'y a pas d'accord clair concernant le nombre de points de contrôle qui existent dans le cycle cellulaire, ni leur position exacte.

Les mécanismes régulateurs les plus importants impliquent deux kinases appartenant à la famille des Phosphatidyl Inositol 3-Kinase-like Kinases (PIKKs) : Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) et ATM- and Rad3-related (ATR). La kinase ATM est activée en réponse aux radiations ionisantes et aux coupures double-brin, alors que le rayonnement ultraviolet et les erreurs de réplication activent plutôt la kinase ATR. Ces kinases, ATM et ATR, ont au moins deux types d'effets. Tout d'abord, elles phosphorylent et activent les kinases CHK2 et CHK1 qui, elles, phosphorylent et inactivent les phosphatases CDC25A et CDC25C. En conséquence, CDK2 et CDK1 restent inactives, et le cycle cellulaire est arrêté, respectivement, en G₁/S et en G₂/M (figure 9).

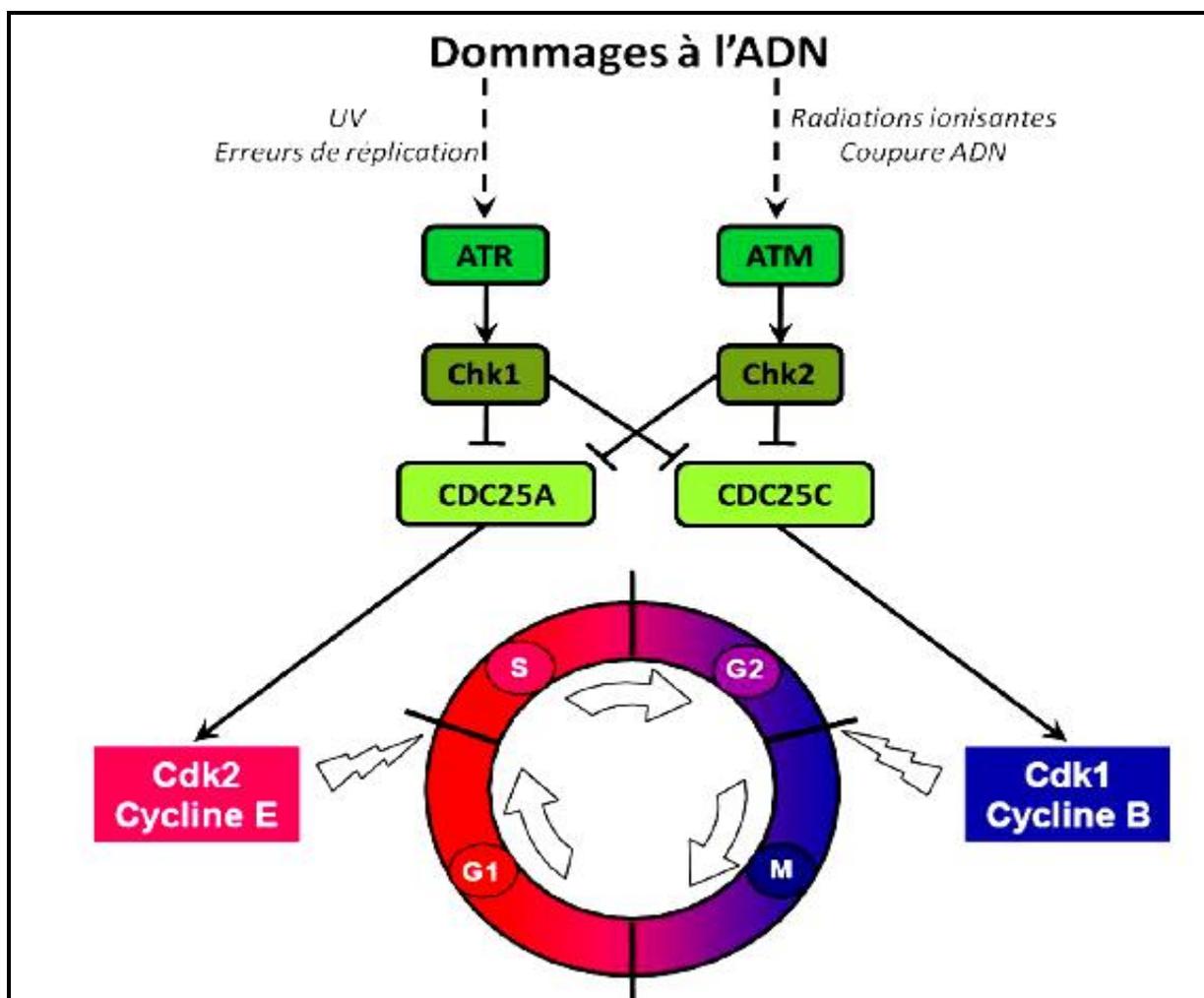


Figure 9. Les points de contrôle de l'état de l'ADN au cours du cycle cellulaire (Meijer, 2006).

Par ailleurs, ATM agit également par la voie p53-dépendante. Le suppresseur de tumeurs p53 est un facteur de transcription activé sous l'effet de multiples agressions génotoxiques : endommagement de l'ADN, hypoxie ou choc thermique. Il est responsable de l'induction d'un grand nombre de gènes conduisant à des réponses multiples et en particulier à un arrêt du cycle cellulaire ou au déclenchement de l'apoptose.

Dans les conditions normales, p53 se fixe au facteur HDM2 (Humain Double Minute 2), ce qui conduit à sa dégradation et explique la faible abondance de p53 dans les cellules en bon état. En revanche, lorsque l'ADN est endommagé, plusieurs mécanismes contribuent à une stabilisation très marquée de p53 et, en conséquence, à une forte augmentation de son activité transcriptionnelle. On comprend tout l'intérêt de rechercher des inhibiteurs de l'interaction HDM2/p53, qui devraient conduire à une stabilisation de p53, avec pour conséquence l'arrêt de la prolifération cellulaire ou l'apoptose des cellules soumises à un stress. Il a été découvert l'existence de deux autres protéines, p63 et p73, qui partagent une grande similarité de structure et de fonction avec p53 (**figure 10**).

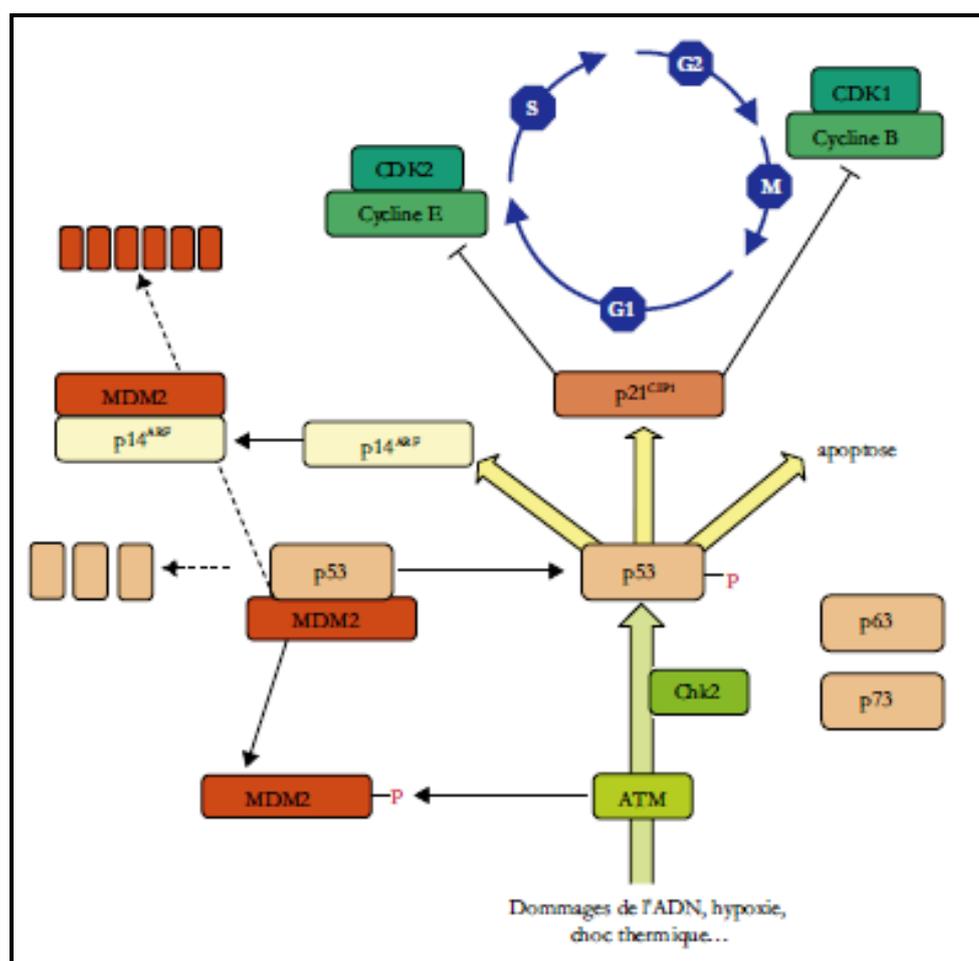


Figure 10. Contrôle de l'état de l'ADN au cours du cycle cellulaire par p53 (Meijer, 2006).

6- Inhibiteurs pharmacologiques du cycle cellulaire

La découverte des mécanismes régulant la division cellulaire a été suivie par la recherche de molécules aux propriétés antiprolifératives. De nombreux composés antimitotiques se sont révélés utiles en chimiothérapie du cancer. Ainsi, on peut classer les produits anticancéreux classiques en quatre grandes catégories :

- **agents alkylants** : bloquant la réplication (nitrouées et moutardes à l'azote),
- **antimétabolites** : se substituant aux précurseurs de la synthèse d'acides nucléiques et bloquent la réplication de l'ADN (hydroxyurée, 5-fluoro-uracile),
- **bloquants des topoisomérases I** (camptothécine) et **II** (doxorubicine, mitoxanthrone),
- « **poisons** » **du fuseau mitotique** : inhibant la dépolymérisation (colchicine, taxol et taxotère) ou la polymérisation de la tubuline (vinblastine et vincristine).

L'efficacité thérapeutique des premiers produits antimitotiques a fortement suscité la recherche de composés capables d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses (la plupart des produits utilisés en chimiothérapie du cancer proviennent de cette approche). Plus récemment, la recherche de produits antimitotiques à des fins thérapeutiques s'est appuyée davantage sur l'utilisation directe de régulateurs du cycle (**figure 11**).

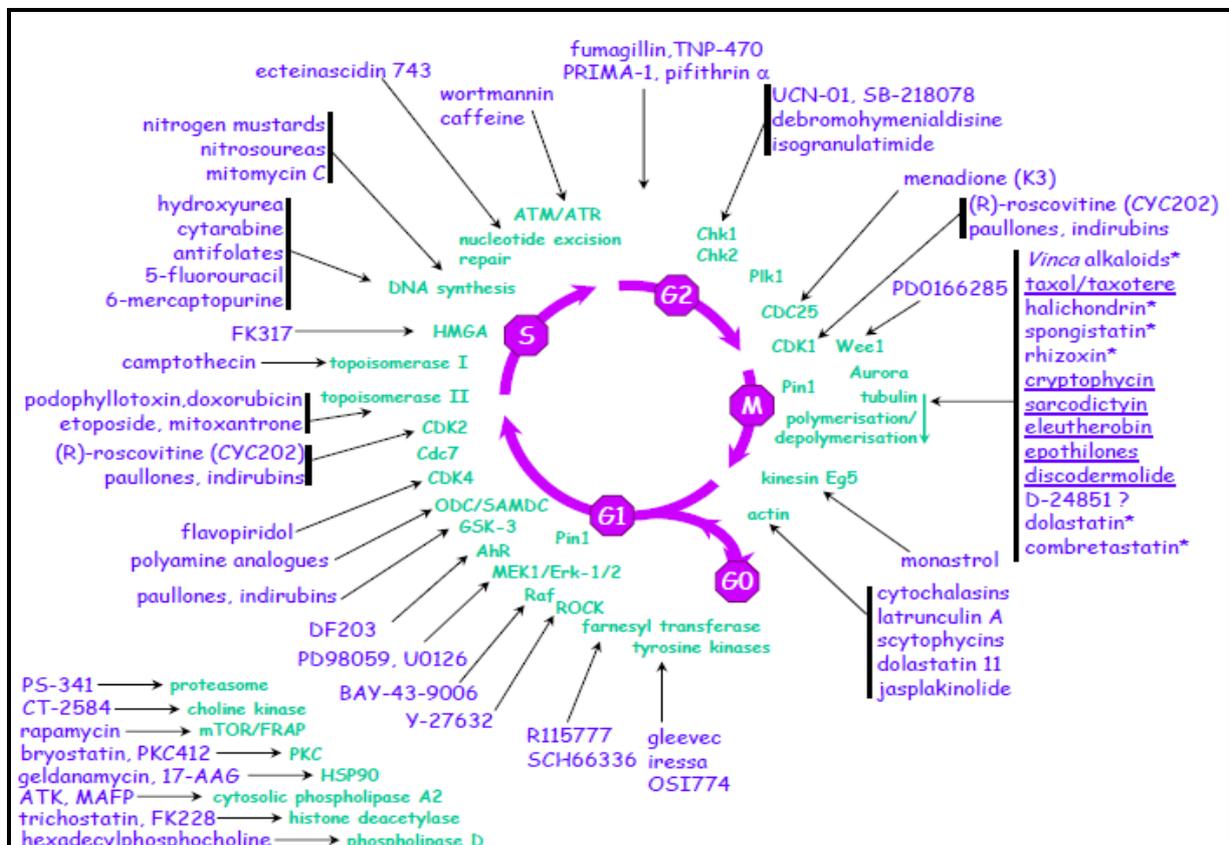


Figure 11. Produits antimitotiques utilisés à des fins thérapeutiques (Meijer, 2006).

Chapitre IV

Régulation de l'apoptose

Le terme d'apoptose ou mort cellulaire programmée a été introduit en 1972 par *Kerr et al* pour définir une forme de mort cellulaire morphologiquement, biochimiquement et moléculairement différente de la nécrose, seule forme de mort cellulaire connue jusqu'alors. Apoptose est un terme qui signifie « chute » en grec ancien et qui a été utilisé en référence à la chute des feuilles des arbres en automne, une métaphore pour une mort à la fois naturelle, inéluctable et programmée.

1- Apoptose

L'apoptose est un processus actif et physiologique de mort cellulaire, utilisée pour éliminer les cellules en excès, endommagées, infectées ou potentiellement dangereuses pour l'organisme. Lors de ce phénomène, la cellule elle-même dirige le programme de sa propre mort « suicide cellulaire ».

Une cellule en apoptose active une série d'évènements moléculaires et biochimiques conduisant à des altérations morphologiques (**figure 12**). Ces changements morphologiques sont spécifiques à l'apoptose et permettent d'identifier ce type de mort cellulaire.

- **Un des premiers changements observables est la réduction du volume cellulaire :** la cellule se déshydrate suite à une perte de l'eau intracellulaire. Cette déshydratation conduit à la condensation du cytoplasme modifiant ainsi la forme et de la taille cellulaire. Au cours de cette étape, la cellule perd le contact avec les cellules avoisinantes. Malgré la rétraction cellulaire progressive, les organites intracellulaires restent intacts et gardent leur aspect normal jusqu'à la phase terminale de l'apoptose.
- **Le noyau présente lui aussi des modifications :** on assiste à une condensation de la chromatine qui débute à la périphérie de la membrane nucléaire. Puis, cette enveloppe nucléaire se désintègre et la chromatine se fragmente en petites masses distinctes. Parmi les changements morphologiques les plus remarquables survenant lors de l'apoptose, c'est la fragmentation de l'ADN, qui survient lors de la condensation de la chromatine. Cette fragmentation génère des multiples de 180 pb. Ce profil n'est pas retrouvé lors de la nécrose où la dégradation de l'ADN est moins importante et induit des fragments de tailles hétérogènes. Les fragments d'ADN réguliers, générés au cours de l'apoptose, résultent de l'activation d'une endonucléase qui coupe l'ADN entre les nucléosomes.

- **Formation de corps apoptotiques** : après cette phase de condensation, la cellule présente à sa surface des vésicules renfermant des amas de chromatine et des fragments cytoplasmiques entourés de membranes plasmiques. Ces vésicules vont se détacher de la cellule pour former les corps apoptotiques, qui sont libérés dans le milieu. Ces corps apoptotiques sont rapidement phagocytés *in vivo*, par les cellules voisines ou les macrophages, sans provoquer de processus inflammatoire dans les tissus.

2- Nécrose

La nécrose est une mort « désordonnée » et accidentelle (pathologique). Elle aboutit à un éclatement de la cellule. Cette mort survient accidentellement lorsque la cellule a subi des dommages importants, irréparables, qui peuvent être produits par l'exposition à de très fortes doses d'agents cytotoxiques. La mort nécrotique est un phénomène passif et catabolique caractérisé par une perméabilisation membranaire précoce et un gonflement de la cellule, suivi par la rupture de la membrane plasmique. Les constituants cytoplasmiques sont alors déversés dans le milieu extracellulaire et sont à l'origine d'une réaction inflammatoire. Contrairement à l'apoptose, au cours de la nécrose, la chromatine n'est pas fragmentée mais lysée : karyolyse. De plus, les organites cellulaires sont détruits très tôt lors de ce processus (**figure 12**).

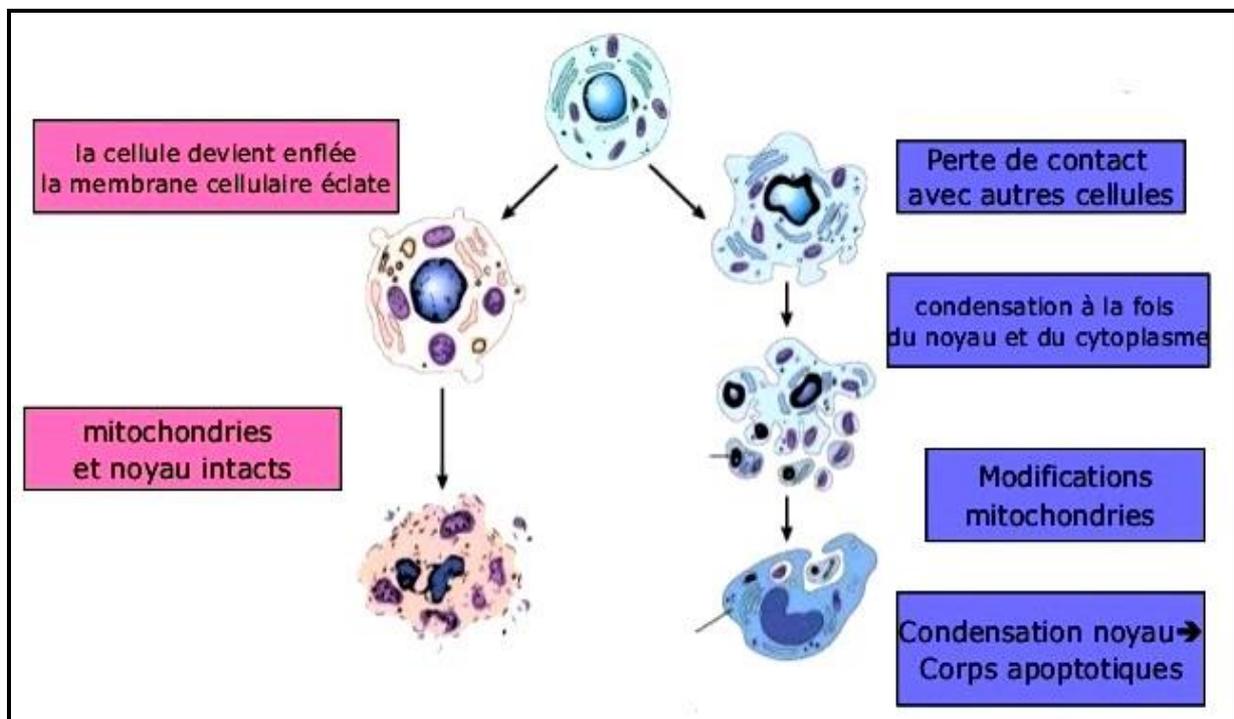


Figure 12. Caractérisation morphologique des événements survenant lors de la nécrose et de l'apoptose (Guasch, 2002).

3- Acteurs moléculaires de l'apoptose

3-1- Caspases

Les caspases sont des cystéines protéases pouvant intervenir dans le processus de mort cellulaire après stimulation des cellules par différents facteurs : des molécules chimiques, des signaux physiques (rayonnement ultraviolet et radiations ionisantes), ou la privation de facteurs de croissance. Elles ont un rôle primordial dans l'initiation et dans l'exécution de l'apoptose.

Le terme caspase a été proposé en 1996 par *Alnemri et al.* Le « C » représente la cystéine du site actif et « aspase » définit la spécificité stricte de clivage des substrats de cette famille de protéases après un acide aspartique. Une autre protéase connue pour avoir la même spécificité est le granzyme B, une sérine protéase contenue dans les granules des cellules cytotoxiques qui initie la mort par apoptose des cellules-cibles. Toutes les caspases ont une structure conservée et sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes. Les caspases sont constituées d'un prodomaine de taille et de séquence variables localisé dans la partie amino-terminale de la protéine, d'une grande sous-unité (20 kDa) située au milieu de la molécule et d'une petite sous unité (10 kDa) localisée dans la partie carboxy-terminale.

L'activation des caspases passe par le clivage protéolytique de la forme zymogène au niveau de deux sites consensus, permettant de couper le prodomaine et de séparer les deux sous-unités. Les caspases peuvent s'auto-cliver et activer d'autres caspases ou substrats formant alors une cascade enzymatique permettant d'amplifier et d'intégrer les signaux pro-apoptotiques (**figure 13**).

Bien que la grande sous-unité contienne le domaine catalytique, son activité nécessite la liaison à la petite sous-unité. Les caspases actives sont sous forme de tétramères formés par l'association de deux hétérodimères, contenant deux sites catalytiques indépendants. L'activation des caspases est un évènement précoce se produisant au cours de l'apoptose et l'inhibition de ces caspases par des protéines virales ou par des peptides spécifiques empêche l'apparition des caractéristiques morphologiques de l'apoptose alors que l'administration de caspases recombinantes dans des cellules induit leur mort par apoptose.

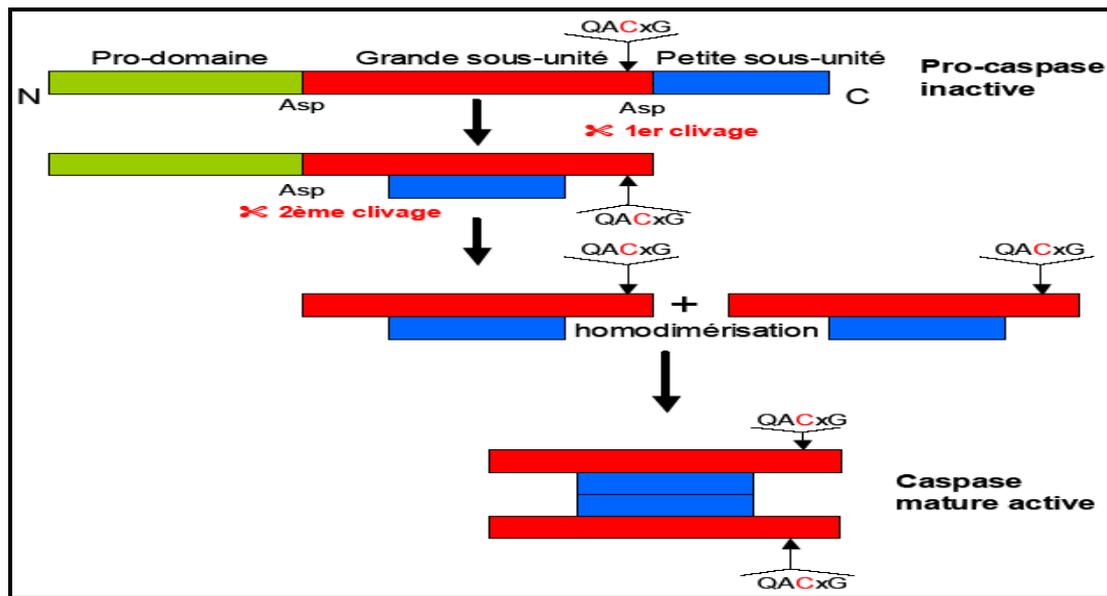


Figure 13. Structure et activation des caspases (Robert, 2010).

3-2- Protéines de la famille BCL-2

La protéine BCL-2 a d'abord été identifiée comme proto-oncogène dans les lymphomes B folliculaires, où une translocation chromosomique conduit à une expression constitutive de ce gène. Puis, il a été montré que cet oncogène était responsable d'une inhibition de l'apoptose plutôt que d'une activation de la prolifération cellulaire.

Les membres de la famille BCL-2 sont des régulateurs de l'apoptose. Cette famille, contenant environ 15 membres, peut être divisée en 2 groupes : les protéines possédant une activité anti-apoptotique et les protéines possédant une activité pro-apoptotique. Ces deux groupes diffèrent par leur structure mais quatre régions sont communes et conservées, il s'agit des domaines BH (BCL-2 Homology). Les régions BH1, 2 et 3 forment la poche hydrophobe capable de lier un domaine BH3 appartenant à une autre protéine.

- Les membres de la famille BCL-2 qui sont anti-apoptotiques comme BCL-2, BCL-XL et BCL-W contiennent les domaines BH1, 2, 3 et 4.
- Les membres pro-apoptotiques se divisent en 2 sous-groupes, ceux qui possèdent les trois domaines (BH1, 2 et 3) comme BAX, BAK, et ceux qui possèdent uniquement le domaine BH3 comme BID, BAD, BIK encore appelés BH3-Only proteins. Cette région BH3 semble être fortement impliquée dans l'activité pro-apoptotique. La région BH4 et les séquences proches, présentes dans les protéines anti-apoptotiques uniquement, peuvent être phosphorylées. Par assemblage avec d'autres protéines, comme la calcineurine, ce domaine permet d'établir un lien avec d'autres voies que l'apoptose.

Toutes les protéines de la famille BCL-2 contiennent un domaine carboxy-terminal hydrophobe de 20 acides aminés permettant leur ancrage dans la membrane intracellulaire en majorité au niveau de la mitochondrie mais aussi au niveau du réticulum endoplasmique et du noyau (**figure 14**).

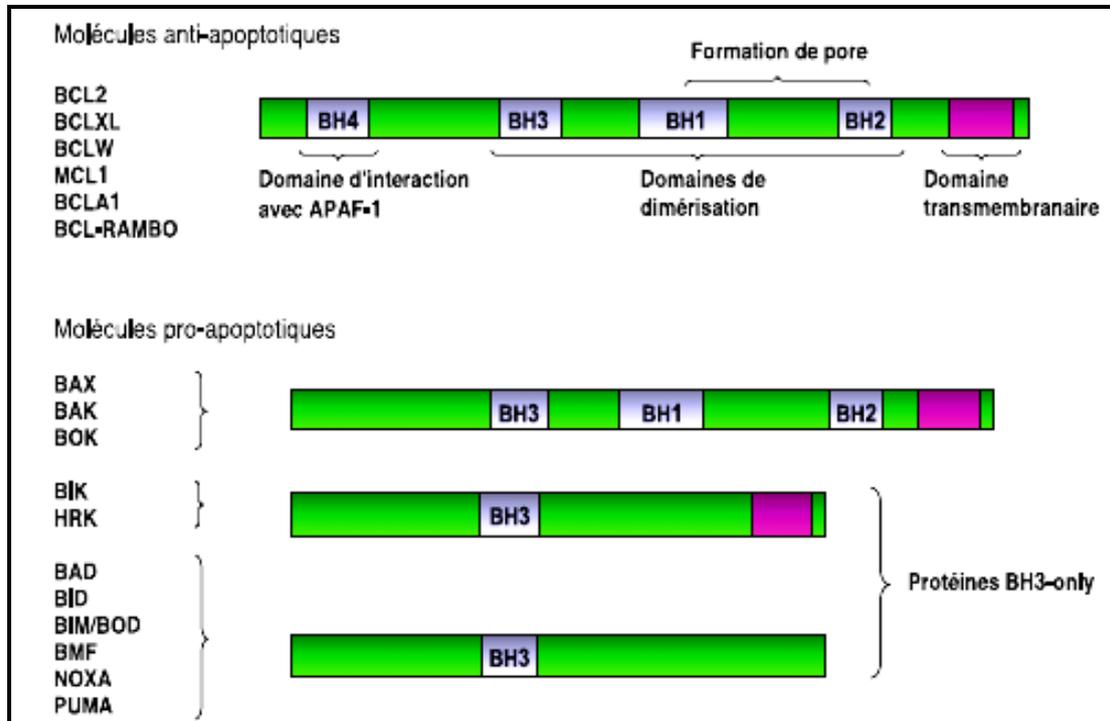


Figure 14. Les protéines de la famille BCL-2 (Robert, 2010).

4- Différentes voies de l'apoptose

La phase d'initiation de l'apoptose est un phénomène réversible au cours duquel le signal apoptotique, intra ou extracellulaire, est transmis à des caspases initiatrices par des molécules adaptatrices. Il existe deux principales voies caspases-dépendantes de signalisation de l'apoptose : la voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque et la voie mitochondriale ou voie intrinsèque. Elles semblent être bien distinctes, cependant la voie des récepteurs de mort peut provoquer l'apoptose par la voie mitochondriale grâce à la protéine Bid, membre de la famille BCL-2.

Récemment, la voie du réticulum endoplasmique dépendante de la caspase-12 a été mise en évidence ! Une autre voie apoptotique caspase-indépendante est initiée par la mitochondrie grâce à la libération de l'AIF (Apoptosis Inducing Factor).

4-1- Voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque

Les ligands, membres de la famille du Facteur Nécrosant des Tumeurs (TNF), jouent un rôle important dans la prolifération, la différenciation, l'apoptose, la modulation de la réponse immunitaire et l'induction de l'inflammation. 16 ligands membres de la famille du TNF ont été identifiés : $\text{TNF}\alpha$, FasL, TRAIL, lymphotoxine α , lymphotoxine β , CD27L, CD30L, CD40L, CD137L, OX40L, RANKL, LIGHT, TWEAK, APRIL, TL1 et BAFF. La plupart des ligands sont synthétisés sous forme de précurseurs transmembranaires avant que leurs domaines extracellulaires soient clivés par des métalloprotéases pour former des formes solubles. Les ligands sont produits sous forme de trimères et se lient à des récepteurs de la famille du récepteur au TNF qui sont des protéines transmembranaires caractérisées par un motif extracellulaire riche en cystéines et un domaine de mort intracellulaire (Death Domain). Par conséquent, la mort cellulaire initiée par ces ligands requiert la trimérisation des récepteurs. La mort induite par les membres de la famille des récepteurs au TNF conduit à l'activation de caspases et en est dépendante (**figure 15**).

4-2- Voie mitochondriale ou voie intrinsèque

- **la voie mitochondriale dépendante des caspases :** de nombreux stimuli, comme les agents thérapeutiques, le rayonnement ultraviolet, les molécules du stress, le manque de facteurs de croissance, semblent induire l'apoptose par la voie mitochondriale ou voie indépendante des récepteurs de mort.

La mitochondrie est un organite constitué d'une membrane externe, d'un espace transmembranaire, d'une membrane interne et d'une matrice. La membrane interne possède de nombreuses protéines comme l'ATP synthétase, la chaîne de transport des électrons et le transporteur de nucléotide adénylique. Dans des conditions physiologiques normales, ces trois protéines permettent la formation d'un gradient électrochimique (ou potentiel membranaire) par la chaîne respiratoire. L'espace intermembranaire contient le cytochrome c, certaines procaspases (-2, -3 et -9), l'AIF et les endonucléase G. La membrane externe possède un canal anionique voltage-dépendant dont la perméabilisation provoque le relargage de toutes ces protéines dans le cytoplasme et la perméabilisation de la membrane interne conduit à un changement du potentiel membranaire mitochondrial. La libération de cytochrome c'est l'une des étapes majeures dans l'induction de l'apoptose par la mitochondrie (**figure 15**).

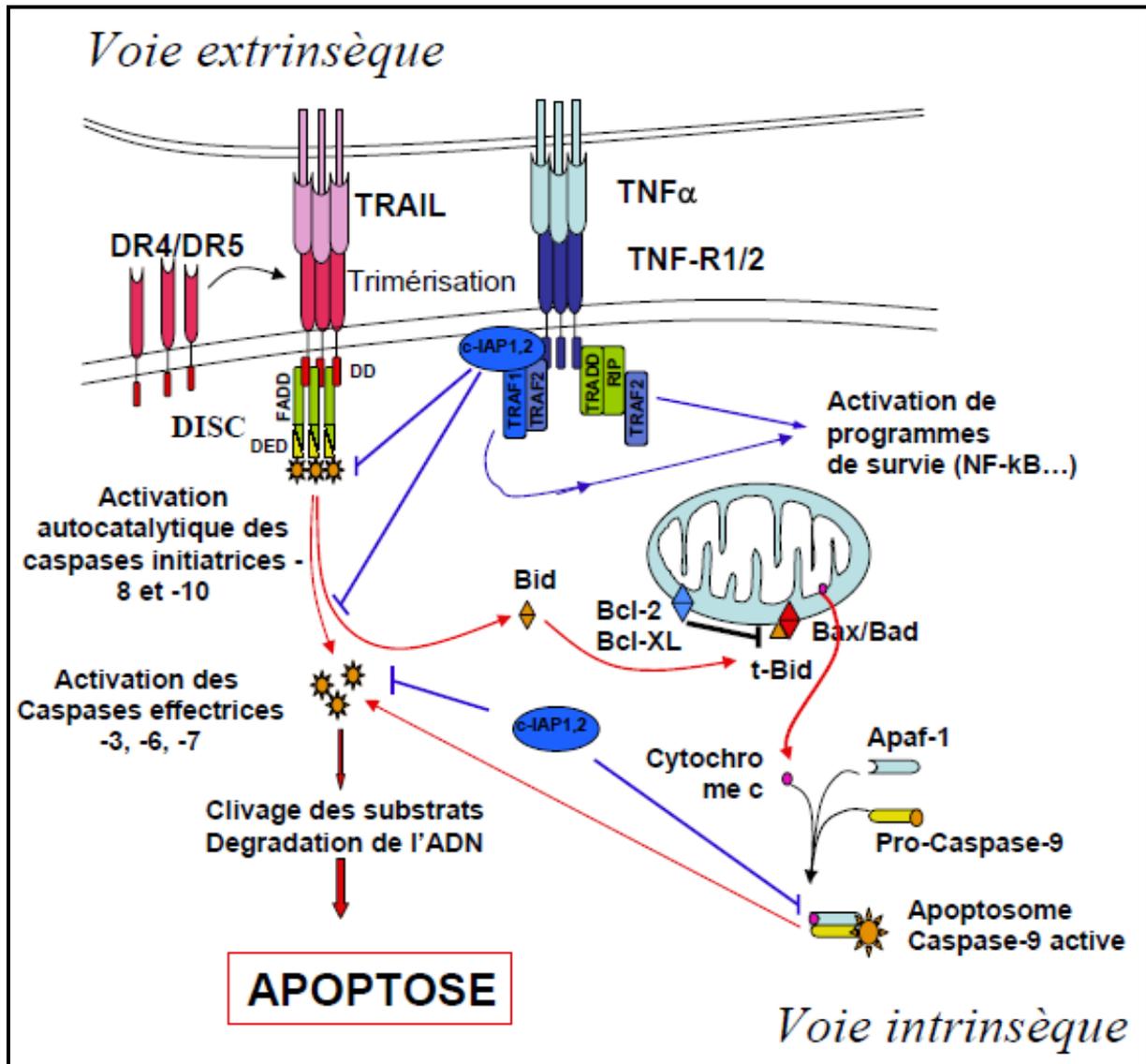


Figure 15. Les deux voies principales d'activation de l'apoptose (Robert, 2010).

La voie extrinsèque est initiée à la surface cellulaire par des ligands de la famille du TNF α et se propage à travers l'activation d'un complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex). La voie intrinsèque est initiée au niveau de la mitochondrie par la perméabilisation de la membrane mitochondriale, le relargage de protéines pro-apoptotiques et l'activation d'un complexe apoptosome. Dans ces 2 complexes, les caspases initiatrices (caspases 8, 9, et 10) sont activées et activent à leur tour les caspases effectrices responsables du clivage des différents substrats cellulaires conduisant à l'apoptose.

- **la voie mitochondriale indépendante des caspases :** plusieurs protéines contenues dans l'espace intermembranaire peuvent induire l'apoptose directement sans activation des caspases. C'est le cas du facteur d'induction apoptotique (AIF) et de l'endonucléase G qui, une fois libérés de la mitochondrie, sont transloqués dans le noyau provoquant une condensation de la chromatine et une coupure de l'ADN générant de larges fragments d'ADN.

En résumé :

Les organismes multicellulaires ont besoin d'une communication inter et intracellulaire finement régulée afin de garantir une organisation correcte des différents tissus et organes pendant le processus d'embryogenèse, et de maintenir les différentes fonctions cellulaires au cours de la vie adulte. Ces organismes ont donc développé des systèmes complexes afin d'intégrer différentes informations, internes et externes et permettre aux cellules de répondre de manière appropriée (**figure 16**).

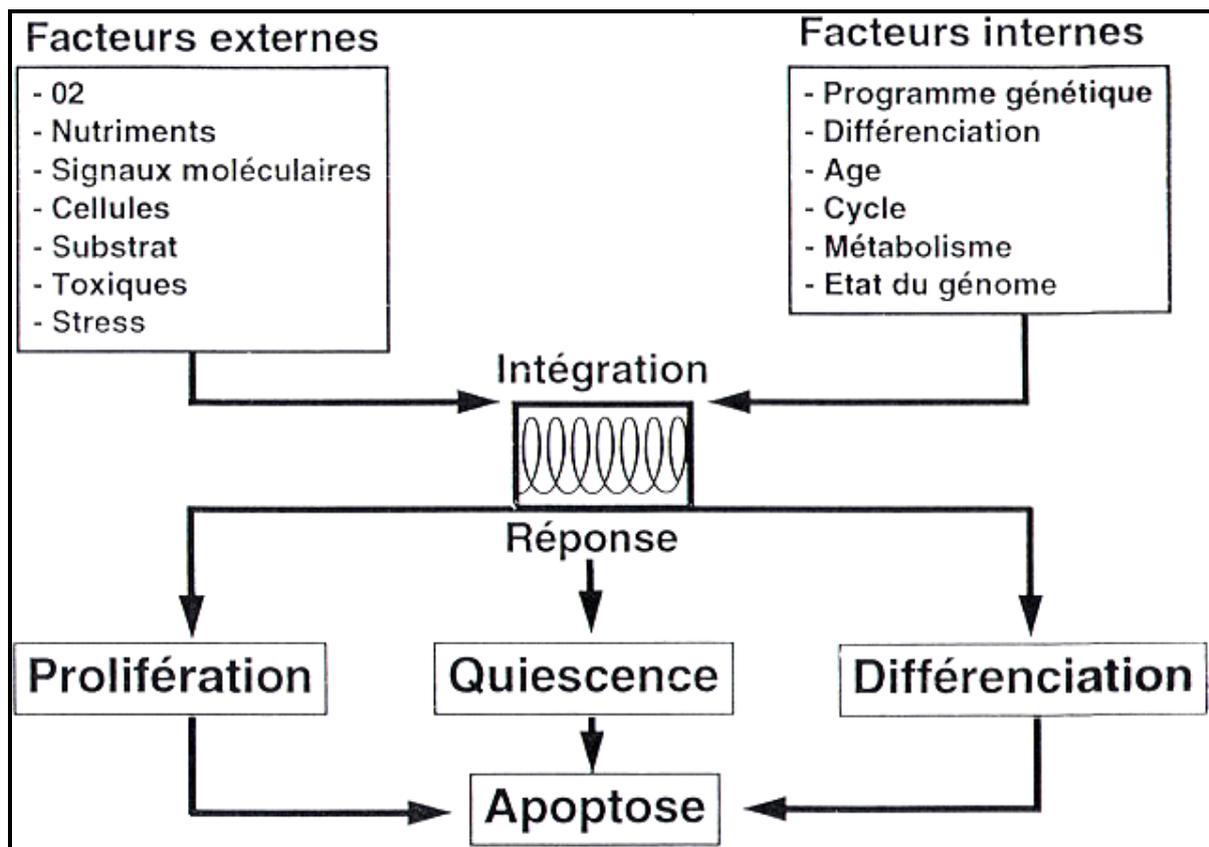


Figure 16. Place de l'apoptose dans les destinées cellulaires possibles (Guasch, 2002).

L'apoptose est régulée par plusieurs voies de signalisation différentes. La dérégulation de l'apoptose peut se traduire par une croissance cellulaire désordonnée et ainsi contribuer à la cancérogenèse. L'induction sélective de l'apoptose dans les cellules tumorales compte parmi les stratégies actuelles de développement.

Chapitre V

Mécanismes des altérations
géniques impliquées
dans la transformation

La naissance d'un clone cellulaire dit « transformé » résulte de l'accumulation dans une seule cellule d'évènements rares et non liés entre eux, appelés « altérations » : mutations et modifications épigénétiques. Chaque altération permet à la cellule le franchissement d'un des obstacles qui s'opposent, physiologiquement et en permanence, au développement d'une prolifération cellulaire anarchique. C'est un processus « multi-étapes », constitué en 3 phases critiques : initiation, promotion et progression. Ces trois phases ont été définies par cancérogenèse expérimentale.

La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans les cancérisations repose sur l'étude de deux grands types de gènes : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Au niveau moléculaire, la cascade d'évènements conduisant à la transformation maligne comporte donc non seulement des étapes d'activation d'oncogènes impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire, mais aussi, des phénomènes de suppression de blocages cellulaires de sécurité exercés en permanence par l'environnement cellulaire ou par la cellule elle-même par l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Les altérations de la structure par modification qualitative ou de l'expression par modification quantitative des gènes impliqués dans la carcinogénèse peuvent être en rapport avec des :

- **agressions génotoxiques** : par des carcinogènes exogènes aériens ou alimentaires, ou endogènes, par des radicaux libres, ou par des radiations ionisantes,
- **infections virales,**
- **erreurs « spontanées » et non réparées de réplication de l'ADN.**

Plusieurs mécanismes moléculaires sont impliqués dans l'activation des oncogènes et/ou de l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs. Ces différents types d'altérations du génome susceptibles d'aboutir à la modification de la structure ou de l'expression du produit d'un gène au cours de la cancérogenèse peuvent être des :

- **mutations « classiques »** : substitution, insertion ou délétion,
- **amplifications,**
- **translocations,**
- **mécanismes épigénétiques** par la méthylation des séquences promotrices et l'acétylation des histones,
- **mécanismes de l'inactivation bi-allélique des gènes suppresseurs de tumeurs.**

1- Mutations classiques

1-1- Définition

Les mutations dites « classiques » sont des erreurs de copie se reproduisant par exemple lors de la réplication de l'ADN en regard de bases azotées dont la structure a été modifiée par des carcinogènes, et non réparées.

1-2- Classification : on distingue différents types de mutation :

- **les mutations par substitution** qui conduisent au remplacement d'une purine par une autre purine, ou d'une pyrimidine par une autre pyrimidine (transition) (ex : G→A) ou au remplacement d'une purine par une pyrimidine, et inversement (transversion) (ex : A→T),
- **les mutations par délétion de bases**, avec perte d'une ou plusieurs bases,
- **les mutations par insertion de bases**, avec ajout d'une ou plusieurs bases.

1-3- Conséquences des mutations : on distingue :

- **les mutations sans changement du cadre de lecture :**
 - **mutations silencieuses** : où le codon modifié code pour le même acide aminé en raison de la dégénérescence (redondance) du code génétique,
 - **mutations faux-sens** : modifiant la signification d'un codon et entraînant le remplacement d'un acide aminé par un autre. La substitution d'un acide aminé par un autre dans des sites critiques de certaines molécules peut modifier considérablement leur activité. Par exemple :
 - **substitutions** : des changements au niveau des acides aminés en position 12, 13, 59 ou 61 peuvent activer les proto-oncogènes *c-H-ras*, *c-N-ras* ou *c-K-ras*. Les oncogènes activés diffèrent du proto-oncogène normal par des mutations dans le domaine de liaison au GTP, aboutissant à une perte de l'activité GTPasique de la molécule et à l'accumulation de la protéine RAS sous sa forme activée liée au GTP.
 - **mutations ponctuelles impliquées dans l'activation d'autres oncogènes** : dans le cas du proto-oncogène *c-erbB2* (Erythroblastosis B virus) une mutation activatrice changeant un acide aminé au niveau de la région transmembranaire de la protéine peut transformer le récepteur à activité tyrosine kinase ligand dépendante en une tyrosine kinase d'activité constitutive ligand-indépendante.

- **mutations ponctuelles faux-sens** : ces mutations sont également impliquées dans l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs tels que *WT-1* (Wilms Tumor 1) et *p53*.
 - **mutations non-sens** : elles transforment le codon d'un acide aminé en codon stop, entraînent la terminaison prématurée de la traduction et la production d'une protéine tronquée. Des mutations de ce type sont fréquemment rencontrées dans l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs tels que *Rb*, *APC* (Adenomatous Polyposis Coli), *BRCA1* (BReast CAncer 1) et *BRCA2*.
 - **mutations au niveau d'un intron** : suivant leur localisation, elles peuvent entraîner des anomalies d'excision-épissage et conduire à une protéine anormale.
 - **mutations au niveau des séquences régulatrices** : des mutations de la zone promotrice peuvent être responsables d'une absence complète d'expression.
- **mutations avec changement du cadre de lecture (ou Frameshift mutation)** : dues à l'insertion ou à la délétion d'un ou plusieurs nucléotides dont le nombre est différent d'un multiple de 3, entraînant un décalage de la lecture des triplets et la production d'une protéine aberrante ; souvent l'apparition d'un codon stop conduit à l'expression d'une protéine tronquée. La protéine anormale exprimée est souvent instable et difficilement détectable. Des mutations aboutissant à la production de protéines aberrantes et tronquées sont fréquemment observées au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs dans les cellules tumorales.

2- Amplification génique

Elle met en jeu la production anormale par la cellule de multiples copies d'une portion d'ADN comportant un ou plusieurs gènes. La multiplication des copies d'un proto-oncogène qui peut aller jusqu'à plusieurs centaines d'exemplaires, aboutit à la production excessive de la protéine correspondante et donc à une activité oncogénique. Les gènes amplifiés peuvent être localisés au site normal du gène ou être regroupés au niveau d'un autre chromosome, ou encore apparaître sous forme de petits chromosomes supplémentaires libres surnommés « chromosomes double minute ». En pathologie humaine on connaît par exemple l'amplification de *c-myc* (Myelocytomatosis virus) dans certaines leucémies aiguës myéloïdes et tumeurs solides, de *c-erbB2* dans les cancers du sein et de l'ovaire, de *HDM2* dans les sarcomes ainsi que de la *Cycline D1* dans les cancers du sein et certains cancers épidermoïdes.

3- Translocations

Les translocations peuvent conduire à l'activation de proto-oncogènes par 2 mécanismes principaux :

- **la fusion d'un proto-oncogène avec un second gène : ce phénomène conduit à la production d'une protéine chimérique anormale et d'activité augmentée.**

L'exemple le mieux connu est celui de la leucémie myéloïde chronique : la translocation t(9;22)(q34;q11) observée au cours des LMC déplace un fragment distal du bras long du chromosome 22 au niveau du bras long du chromosome 9. Le petit chromosome 22 amputé de ses bras longs est appelé chromosome Philadelphie. Cette translocation entraîne la juxtaposition aberrante du gène *BCR* (pour Breakpoint Cluster Region) apporté par le fragment du chromosome 22 et du proto-oncogène *c-abl* (Abelson leukemia virus), qui est présent sur le chromosome 9 et code normalement pour une tyrosine kinase cytoplasmique de 145 kDa. Dans cette translocation, les points de cassure habituellement observés dans le gène *BCR* intéressent une région relativement limitée (major breakpoint cluster) ; au niveau du gène *c-abl*, ils intéressent une région assez large de 100 kb environ. Cette translocation entraîne une fusion de gènes qui aboutit à l'expression d'un ARNm chimérique porteur d'une séquence hybride *BCR-ABL* et codant pour une protéine de fusion BCR-ABL de 210 kDa, qui présente une activité tyrosine-kinase augmentée. Les mécanismes des effets transformants de la protéine de fusion BCR-ABL p210 sont encore mal connus, et pourraient s'expliquer au moins en partie par une activation de la voie de transduction des signaux mitogènes. Le chromosome Philadelphie fût la première description d'une anomalie cytogénétique acquise et caractéristique d'une pathologie tumorale en 1973. Au cours de certaines leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL), une translocation t(9,22)(q34;q11) peut également être observée mais celle-ci implique une autre région du gène *BCR* et aboutit à une protéine de fusion plus courte de 190 kDa. La protéine chimérique p190 présente également une activité tyrosine-kinase augmentée et fait preuve d'activité transformante plus importante que celle de la p210 *in vitro*.

- la juxtaposition d'un oncogène et des séquences régulatrices d'un autre gène fortement exprimé dans la cellule.

Des translocations aboutissant à la juxtaposition de la séquence d'un proto-oncogène d'une part et de séquences régulatrices des gènes d'immunoglobulines, ou des gènes du récepteur T d'autre part sont très fréquemment observées dans les lymphomes respectivement de type B et T. Dans ces cas le fait qu'une translocation donnée soit spécifique d'une variété de tumeurs bien précise s'explique par le fait que la translocation ne peut être « transformante » que si le proto-oncogène se trouve déplacé au voisinage de séquences régulatrices actives dans la cellule considérée : à titre d'exemple les gènes des immunoglobulines dans les lymphocytes B, gènes du récepteur T dans les lymphocytes T. Les lymphomes de Burkitt sont caractérisés par des translocations impliquant le chromosome 8 d'une part et les chromosomes 2, 14 ou 22 d'autre part et qui déplacent le proto-oncogène *c-myc* au voisinage des gènes codant pour les molécules d'immunoglobuline. La translocation la plus fréquemment observée est la translocation t(8;14) déplaçant le proto-oncogène *c-myc* porté par le chromosome 8 au voisinage du gène des chaînes lourdes d'immunoglobulines ; des translocations t(8;2) impliquant le gène de la chaîne légère *Kappa* sur le chromosome 2, t(8;22) impliquant le gène de la chaîne légère *Lambda* sur le chromosome 22, sont plus rarement observées. Toutes ces translocations aboutissent à une surexpression de *c-myc*.

4- Mécanismes épigénétiques

La modification de l'expression ou de l'activité d'un gène peut également relever d'un mécanisme épigénétique. Deux processus majeurs peuvent être cités :

4-1- Méthylation des gènes impliqués dans la carcinogenèse

Dans les cellules humaines 2 à 5 % des résidus cytosine de l'ADN génomique sont méthylés sous forme de 5-méthyl cytosine. Cette méthylation de la cytosine se fait après la réplication de l'ADN. Elle est catalysée par un ADN méthyltransférase qui utilise la S-adenosyl-méthionine comme donneur de radical méthyle. La fonction de cette méthyltransférase, appelée Dnmt1, est de méthyler le nouveau brin d'ADN synthétisé de façon à maintenir un profil de méthylation identique à celui de l'ADN qui vient d'être répliqué, et qui est caractéristique de chaque type de cellule différenciée. D'autres ADN méthyltransférases (DNMT2, DNMT3a et DNMT3b) semblent fonctionner comme des méthylases *de novo* capables de méthyler l'ADN non méthylé.

Environ 70 à 80 % des résidus 5-méthyl cytosines se trouvent au niveau de séquences CpG ; lorsque ces séquences CpG sont fréquemment répétées dans le génome, les régions correspondantes sont appelées îlots CpG. Les îlots CpG des gènes de maintenance (gènes de ménage ou « housekeeping ») exprimés dans toutes les cellules ne sont pas méthylés, alors que les îlots CpG des nombreux gènes tissus-spécifiques sont méthylés à l'exception des tissus dans lesquels ils sont exprimés. Une déméthylase spécifique, dont les substrats sont des séquences CpG de l'ADN, a également été identifiée. La méthylation de l'ADN semble inhiber la transcription soit en interférant directement avec la fixation des facteurs transcriptionnels au niveau des séquences promotrices de gènes considérés, soit par l'intermédiaire de protéines qui se fixent préférentiellement au niveau des promoteurs méthylés et empêchent la fixation de facteurs transcriptionnels correspondants.

La méthylation de l'ADN est impliquée dans le développement embryonnaire qui implique l'activation et la désactivation séquentielle de différentes classes de gènes, dans l'inactivation de gènes spécifiques du chromosome X, dans la sénescence cellulaire, dans l'inactivation des séquences virales intégrées dans le génome et également dans l'oncogenèse.

L'impact de la méthylation de l'ADN dans la cancérogenèse est encore mal connu. S'il semble avéré que les tissus cancéreux sont globalement hypométhylés, il n'en demeure pas moins que l'hyperméthylation semble être un processus très répandu d'inactivation de gènes spécifiques au cours de l'oncogenèse. Divers gènes suppresseurs de tumeurs sont des cibles de cette inactivation par méthylation dans les cancers humains essentiellement des :

- gènes de réparation de l'ADN (instabilité génomique),
- gènes suppresseurs de l'invasion et de la métastase,
- gènes impliqués dans la détoxification des carcinogènes,
- inhibiteurs de l'angiogenèse.

4-2- Acétylation des histones

La régulation de la transcription des gènes chez les eucaryotes se joue en grande partie dans la chromatine. L'unité de base de ce compactage du matériel génétique est le nucléosome, où l'ADN est enroulé autour d'un octamère protéique composé de 2 copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4. Avec le concours, de l'histone H1, des états chromatiniens encore plus condensés, allant jusqu'au chromosome mitotique, peuvent se former. Ces différents états chromatiniens modulent l'accessibilité de l'ADN aux divers processus biologiques nucléaires : réplication, transcription et réparation.

Les mécanismes qui concourent à l'ouverture et à la fermeture de la chromatine mettent en jeu deux types d'activités enzymatiques : celles utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour altérer les liens histone-ADN à l'intérieur du nucléosome, et celles qui modifient de façon covalente certains résidus des histones, aboutissant à une chromatine plus ouverte ou plus condensée suivant le type des modifications subies. Les principales modifications post-traductionnelles connues des histones sont : l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitination.

Les histones peuvent être acétylées par les Histones Acétyl-Transférase (HAT). De nombreuses enzymes ayant une activité HAT. Il existe aussi toute une famille d'enzymes, les Histones DésAcétylases (HDAC), capable de désacétyler les lysines des histones. Les HAT et les HDAC font généralement partie de complexes multi protéiques dont les sous-unités accomplissent des fonctions essentielles, comme l'interaction avec des facteurs transcriptionnels liés à l'ADN ou pour coupler le complexe à des promoteurs spécifiques, ou encore pour la reconnaissance du substrat chromatinien.

Les histones sont susceptibles d'être acétylées sur des lysines spécifiques dans leur domaine amino-terminal. Ces changements donnent naissance à une chromatine plus flexible, où l'ADN est plus accessible. À l'échelle cellulaire, le niveau d'acétylation délimite topographiquement l'euchromatine et l'hétérochromatine au moyen d'un gradient d'acétylation/ désacétylation. L'acétylation des histones joue aussi un rôle dans la progression du cycle cellulaire, la recombinaison et la réparation de l'ADN, ainsi que dans l'apoptose.

La modification la plus fréquente associée à des processus tumoraux est une altération du profil d'acétylation de certains gènes suppresseurs de tumeurs.

5- Inactivation bi-allélique des gènes suppresseurs de tumeurs

Le concept de gène suppresseur de tumeurs est né d'études de réversion du phénotype transformé dans lesquelles l'hybridation des cellules normales avec des cellules tumorales en culture faisait perdre à ces dernières leurs caractères de cellules transformées et en particulier leur propriété tumorigénique chez l'animal. Ces études ont suggéré qu'il existait dans les cellules normales une classe de gènes, perdus ou inactivés dans certaines cellules tumorales, et capables de restaurer le contrôle de la prolifération cellulaire lorsqu'ils étaient réintroduits dans ces cellules tumorales. La perte de l'activité de ces gènes suppose généralement l'inactivation successive des 2 allèles du gène.

5-1- Nature des mutations inactivatrices

Pour la plupart des gènes suppresseurs de tumeurs, les mutations inactivatrices sont des mutations non-sens ou des délétions qui aboutissent à la formation de protéines tronquées ou instables. Il en est ainsi des mutations inactivatrices de *Rb*, *APC*, *BRCA1* et *BRCA2*. Les mutations inactivatrices de p53 sont au contraire le plus souvent des mutations faux-sens aboutissant à la production de protéines où seul un acide aminé est substitué.

5-2- Mutations inactivatrices et perte d'hétérozygotie

L'inactivation des 2 allèles d'un gène suppresseur de tumeurs observée au niveau des cellules tumorales résulte le plus souvent de la mutation inactivatrice d'un allèle associé à la perte de l'autre allèle. On observe dans ce dernier cas une perte d'hétérozygotie pour le gène concerné dans les cellules tumorales où l'on ne retrouve plus que l'allèle anormal. Cette perte du deuxième allèle peut mettre en jeu la délétion d'une portion plus ou moins grande du chromosome correspondant avec perte d'hétérozygotie au niveau des gènes adjacents. Ces pertes d'hétérozygotie sont fréquentes dans les cancers humains, et servent de repère pour la recherche et l'identification de gènes suppresseurs de tumeurs. Les différents mécanismes qui peuvent être mis en jeu dans la perte d'hétérozygotie en regard d'un gène suppresseur de tumeurs muté sont les suivants :

- perte complète du chromosome porteur de l'allèle normal avec duplication du chromosome porteur du gène muté,
- perte du chromosome porteur de l'allèle normal, le chromosome mutant restant seul définissant ainsi une monosomie,
- délétion d'une portion plus ou moins étendue du chromosome non muté, emportant l'allèle normal du gène suppresseur de tumeurs,
- recombinaison mitotique, échange entre chromosomes homologues de mécanisme complexe, et qui aboutit au remplacement sur le chromosome non muté d'un fragment chromosomique porteur de l'allèle normal par un fragment identique à celui du chromosome muté.

Dans les rétinoblastomes, 70 % des tumeurs présentent une mutation inactivatrice d'un allèle du gène suppresseur de tumeurs *Rb* avec une perte d'hétérozygotie au niveau du deuxième allèle, et 30 % des tumeurs portent une mutation inactivatrice indépendante de chaque allèle.

5-3- Autres modalités d'inactivation bi-allélique

Il s'agit d'un ensemble de mécanisme d'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs très rarement rapportés dans la littérature et qui consistent en :

- mutations inactivatrices, indépendantes, des 2 allèles d'un même gène suppresseur de tumeurs,
- délétion homozygote : plus rare, résulte de la délétion des 2 allèles du gène,
- haplo-insuffisance : un seul allèle est inactivé par mutation alors que l'autre est inactivé par un mécanisme épigénétique comme, par exemple, l'hyperméthylation des séquences promotrices du gène,
- absence d'expression d'un gène suppresseur de tumeurs peut exister en l'absence de toute mutation. L'hyperméthylation des promoteurs des 2 allèles du même gène suppresseur de tumeurs semble le mécanisme le plus fréquemment en cause dans ces cas de figure.

Chapitre VI

Différents types d'agressions génotoxiques

Plusieurs types d'éléments sont impliqués dans la survenue de « mutations » responsable de l'activation d'oncogènes ou l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs ; plusieurs paramètres sont utilisés pour les classifier :

- endogènes ou exogènes,
- biologiques ou non biologiques,
- chimiques, physiques ou biologiques.

1- Cancérigènes physiques

Les cancérigènes physiques sont représentés essentiellement par les radiations ionisantes et les rayonnements ultraviolets qui peuvent être incriminés dans la survenue de cancers.

1-1- Radiations ionisantes

Les radiations ionisantes occasionnent plusieurs types de dommages à l'ADN :

- **cassures simples brin et double brin** au niveau du squelette phospho-carboné de l'ADN,
- **altérations (modification de la structure) ou pertes de bases,**
- **formation de cross links ADN-ADN ou de ponts entre ADN et protéine chromosomique,**
- **génération par radiolyse de l'eau et la formation de radicaux libres oxygénés** tels que le radical hydroxyle (OH), l'oxygène singulet, le peroxy-nitrite (ONO₂) dérivé de l'oxyde nitrique (NO).

On estime qu'il se produit environ 105 ionisations par cellule et par Gray de dose absorbée (le Gray est l'unité de mesure de la dose de radiation absorbée par les organismes vivants), conduisant à environ 200 cassures simples brins et 25 à 50 cassures doubles brins de l'ADN. L'irradiation de cellules normales en culture *in vitro* montrent que le taux de transformation cellulaire par cellule irradiée augmente de 0 à 4 Gray puis diminue au-delà en raison de la mortalité cellulaire. À l'échelon cellulaire, trois types d'effets peuvent être observés au niveau des cellules irradiées :

- mutation d'un ou plusieurs gènes autres que ceux impliqués dans la transformation cancéreuse,
- mort cellulaire,
- apparition de plusieurs clones cellulaires transformés, de phénotype malin.

Le taux de transformation cellulaire est strictement corrélé au nombre de divisions cellulaires qui s'effectue après l'irradiation. Cela suggère que l'étape initiale de la carcinogénèse consiste en des altérations qui touchent un grand nombre de gènes dans une forte proportion de cellules irradiées et que le ou les événements ultérieurs responsables de la transformation sont un événement « rare » qui survient au hasard et responsable d'altérations génétiques spécifiques ultérieures, imputables à une instabilité génétique induite par l'irradiation et les divisions cellulaires ultérieures.

1-2- Rayonnement ultraviolet

Les UV induisent des lésions spécifiques au niveau de l'ADN qui sont la formation de liaisons covalentes entre 2 molécules pyrimidiques adjacentes sous forme de dimères de pyrimidines. Cette dimérisation provoque la rupture des liaisons hydrogènes avec les bases opposées et, en l'absence de réparation, l'incorporation de bases erronées lors de la réplication suivante. Ainsi les dimères de cytosine induisent des transitions CC → TT, mutations très rarement observées en dehors d'expositions de l'ADN aux UV. Plus de 50 % des cancers cutanés portent des mutations inactivatrices de *p53* avec ces doubles transitions CC → TT.

2- Cancérogenèse chimique

2-1- Carcinogènes endogènes

Molécules très réactives générées par le métabolisme cellulaire oxydatif, ces radicaux très réactifs peuvent réagir directement avec l'ADN, ou indirectement par la génération d'autres métabolites intermédiaires. Les radicaux libres sont des composés caractérisés par une structure électronique déséquilibrée qui leur confère une grande réactivité. Ce sont des molécules destructrices et instables, elles prennent un électron aux molécules voisines (ADN, protéines et lipides) et se stabilisent en les endommageant, les molécules ne peuvent plus, alors, jouer leur rôle. Elles vont tenter de se stabiliser en récupérant un électron sur une autre molécule, c'est ce qu'on appelle l'effet de propagation.

Le génome d'une cellule humaine subit environ 200 000 lésions oxydatives par jour de type extrêmement varié qui sont réparées. La lésion oxydative la mieux caractérisée est la production de 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) et qui sert de bio marqueur pour la mesure du dommage oxydatif cellulaire. La 8- OH-dGTP incorporée dans l'ADN peut conduire lors de la réplication à un mésappariement de base avec l'adénine et conduire à une transversion G → T.

2-2- Carcinogènes exogènes

Plusieurs types de molécules environnementales : naturelles ou synthétiques peuvent avoir un effet génotoxique sur les cellules de l'organisme aboutissant à des altérations génétiques responsables de la cancérogenèse (**tableau I**). Parmi ces molécules on peut citer :

- **nitrosamines et les agents alkylants** : les dialkyl nitrosamines et les agents alkylants conduisent à l'addition d'un radical alkyle ($R-CH_2^+$) à un site nucléophile de l'ADN. Les nitrosamines peuvent dériver du métabolisme endogène de nitrates alimentaires. Elles sont abondantes dans la fumée de tabac, ainsi que l'aflatoxine. L'aflatoxine est une mycotoxine produite par des champignons (*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*) proliférant sur des graines conservées en atmosphère chaude et humide.
- **dérivés nitrés aromatiques** : retrouvés dans l'industrie du colorant, la vulcanisation, l'industrie pharmaceutique, la fumée du tabac impliquée dans la genèse des cancers de la vessie et les amines hétérocycliques retrouvés dans les produits de la pyrolyse des viandes et des poissons. Ces produits se lient à l'ADN suite à la génération de radicaux aryl-nitronium ($Ar-NH^+$) extrêmement réactif,
- **Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)** : sont essentiellement impliqués dans les cancers du poumon, de la vessie et de la peau. Les principales sources d'exposition environnementale sont la fumée du tabac, la pollution industrielle, et certains dérivés du pétrole, les lubrifiants et certains colorants.

Le benzopyrène (ou benzo[a]pyrène), hydrocarbure aromatique polycyclique, retrouvé dans les goudrons en particulier de tabac forme de gros adduits au niveau de l'ADN. Devant des adduits volumineux, l'ADN polymérase peut s'arrêter, ou placer une base inadéquate en regard du site non instructif. Les gros adduits dérivés des HAP se fixent préférentiellement (> 50 % des cas) au niveau des résidus guanine de dinucléotides CpG méthylés par méthylation endogène, et conduisent préférentiellement à des transversions de type $G \rightarrow T$. De telles transversions sont responsables de mutations activatrices de *K-ras* et de mutations inactivatrices de *p53* au cours des cancers du poumon induit par le tabac chez l'homme.

Tableau I. Principaux carcinogènes chimiques (AFSSET-INSERM, 2008).

Facteurs d'exposition	Localisation
Aflatoxines	Foie
Agents alkylants	Vessie et leucémies
Aluminium (production)	Poumon et vessie
Amiante, erionite et talc contenant des fibres asbestiformes	Poumon, plèvre et péritoine
Amines aromatiques	Vessie
Arsenic	Foie, poumon et vessie
Benzène	Leucémies
Bis-chloro-méthyle-éther et chloro-méthyl- éther	Poumon
Boissons alcoolisées	Bouche, pharynx, larynx œsophage, foie et sein
Caoutchouc (industrie)	Leucémie et vessie
Chique (bétel plus tabac)	Bouche
Chlornaphazine	Vessie
Chlorure de vinyle	Foie
Chrome	Poumon
Contraceptifs oraux combinés	Foie
Contraceptifs oraux séquentiels	Endomètre
Fabrication de l'alcool isopropyl	Nez
Fonderie fer et acier	Poumon
Gaz moutarde	Poumon
Hydrocarbures polycycliques	Peau, larynx, bouche et poumon Rein et vessie
Immunosuppresseurs (azathioprine et ciclosporine)	Lymphomes non hodgkiniens. Maladie de Kaposi, foie et peau
Magenta (fabrication)	Vessie
8-Méthoxypsoralène + UV	Peau
Nickel	Sinus nasal, ethmoïde et poumon
Œstrogènes post ménopause	Endomètre
Œstrogènes (exposition <i>in utero</i>)	Vagin, col de l'utérus et testicule
Phénacétine	Rein
Poussière de bois	Sinus nasal et ethmoïde
Poussière de cuir	Leucémie
Stéroïdes anabolisants	Foie
Tabac	Bouche, larynx et pharynx
	Poumon et œsophage

3- Cancérogenèse virale

Plusieurs virus humains sont directement ou indirectement associés à des cancers. Certains de ces virus sont relativement endémiques et dans pratiquement tous les cas nécessitent l'intervention de cofacteurs ou d'éléments prédisposant pour donner lieu à une prolifération tumorale. Le rôle de l'environnement est particulièrement souligné dans des pathologies comme le lymphome de Burkitt, le carcinome du nasopharynx, la leucémie lymphome T de l'adulte associée à HTLV1 et le carcinome hépatocellulaire sur foie sain en zone endémique. D'autres virus sont associés à des proliférations cancéreuses et semblent agir de manière indirecte comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) en promouvant l'immunodépression et le virus de l'hépatite C en induisant une inflammation chronique et une cirrhose hépatique, élément préalable au carcinome hépatocellulaire dans la majorité des cas. Plusieurs mécanismes par lesquels l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire peut aboutir à la transformation cancéreuse :

- expression d'une protéine virale qui pourrait être :
 - un oncogène viral qui dérive d'un proto-oncogène cellulaire modifié par un mécanisme mutationnel et activé,
 - un facteur transactivateur viral stimulant la production d'un proto-oncogène cellulaire,
 - une protéine virale inhibant l'activité des produits de gènes suppresseurs de tumeurs cellulaires.
- activation de l'expression d'un proto-oncogène cellulaire normal : cela se fait sous l'influence des séquences régulatrices du génome viral intégré à proximité de ce gène ; il s'agit d'une mutagenèse insertionnelle.
- disruption et l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs par l'intégration du génome viral. Là aussi, il s'agit également de mutagenèse insertionnelle.

3-1- Cancérogenèse par des virus à ADN

Les oncovirus à ADN présentent le gène oncogène dans leur génome et vont pouvoir l'exprimer en s'intégrant partiellement ou entièrement et de façon aléatoire dans le génome de la cellule hôte infectée. Les produits de ce gène oncogène vont modifier le développement normal de la cellule et la transformer. Ces produits peuvent intervenir dans la réplication, être des répresseurs transcriptionnels, se lier à d'autres protéines de la cellule...etc.

- **virus SV40 (Simien Virus 40)** : virus simien oncogénique chez le hamster. Il n'est pas impliqué dans les cancers chez l'homme. Les cellules transformées expriment une protéine appelée antigène T, codée par l'ADN viral intégré, capable de se lier aux protéines p53 et Rb et de les inactiver. L'antigène T est également capable de se lier aux protéines cellulaires p107 et p130 analogues de la protéine Rb. la liaison de l'antigène T à la protéine Rb libère le facteur transcriptionnel E2F qui active les gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire,

- **adénovirus** : virus responsables d'infections respiratoires et intestinales chez l'homme. Quelques souches (12,18 et 31) sont oncogéniques chez le rongeur nouveau-né, et transforment les cellules murines en culture. Les cellules transformées expriment la protéine virale E1A capable de de se lier et d'inactiver Rb, p107 et p130, ainsi que la protéine virale E1B qui se lie à la protéine p53 et l'inactive.

Dans des expériences de transfert de gène, l'expression d'E1A suffit à immortaliser les cellules, et l'apport d'un proto-oncogène *c-ras* activé conduit à la transformation maligne. L'expression conjointe d'E1A et E1B suffit à transformer les cellules murines. Cela suggère un effet coopératif entre les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs.

- **virus des papillomes humains (HPV)** : les HPV n'infectent que les cellules épithéliales et entraînent essentiellement des lésions muqueuses et cutanées bénignes chez l'homme. Certaines souches HPV 6, 10 et 11 infectent les muqueuses génitales et peuvent entraîner des condylomes et des néoplasies intra-épithéliaux de bas grade (proliférations bénignes). Les souches HPV 16, 18, 31, 33 ou 45 sont retrouvées dans près de 90 % des cancers du col utérin. Dans ce cas, l'ADN viral est intégré dans le génome cellulaire et les cellules malignes expriment les protéines E6 et E7. La protéine E6 se lie à la protéine p53 et entraîne sa dégradation par protéolyse ubiquitine-dépendante. E7 se lie à Rb, p107, p130 et à la cycline A et les inactive,

- **virus Epstein Barr (EBV)** : virus de la mononucléose infectieuse humaine, fortement associé au lymphome de Burkitt Africain, au carcinome rhino-pharyngé et à un moindre degré à la maladie de Hodgkin. Il infecte les lymphocytes B et les cellules épithéliales par le biais du récepteur pour le C3d (CD21). Il immortalise les lymphocytes B humains *in vivo* et en culture (lignée lympho-blastoïdes). Le génome de l'EBV code pour une centaine de gènes dont une dizaine au moins sont exprimés dans les cellules lympho-blastoïdes, et codent pour plusieurs protéines virales impliquées dans le processus d'immortalisation. Le lymphome de Burkitt est caractérisé par la translocation t(8;14) qui aboutit à une surexpression de *c-myc* .

- **virus de l'hépatite B** : les carcinomes hépatocellulaires humains contiennent souvent des séquences virales de l'HBV intégrées dans le génome. Seuls 2 gènes viraux *HBx* et *preS2/S* restent habituellement intacts après intégration. Le gène *HBx* a un potentiel oncogénique démontré par expériences de transfert de gènes.

3-2- Cancérogenèse par des virus à ARN

Les virus oncogènes à ARN sont appelés oncornavirus, ils font partie de la famille des rétrovirus. Le génome viral comprend toute l'information nécessaire à la réplication du virus: une transcriptase inverse, une RNase, une protéase, une intégrase, les protéines de structure, les LTR (Long Terminal Repeat). On en distingue deux types :

- **rétrovirus à pouvoir transformant rapide « aigu »** : ils contiennent dans leur génome un oncogène viral. L'oncogène viral dérive d'un proto-oncogène cellulaire de l'hôte qui a été "capturé" par le virus, et dont la séquence est souvent modifiée par plusieurs mutations en raison de l'infidélité de la réplication virale. Cet oncogène remplaçant souvent des séquences virales nécessaires à une réplication complète, ces virus sont presque toujours défectifs. L'oncogène viral, placé sous le contrôle du promoteur fort présent dans les séquences LTR du provirus intégré, est fortement exprimé ; il ne contient pas d'intron et peut fusionner avec des séquences d'origine virale aboutissant à l'expression de protéines chimériques d'activité accrue. Les tumeurs résultantes sont polyclonales. Comme exemple, on a le virus responsable d'une leucose aiguë myéloblastique aviaire ainsi que le virus de la leucémie murine d'Abelson.
- **rétrovirus à pouvoir transformant lent** : ces virus ne comportent pas d'oncogène mais peuvent transformer les cellules infectées par mutagenèse insertionnelle. L'intégration du provirus peut entraîner l'activation aberrante de l'expression de proto-oncogènes cellulaires adjacents. Dans les lymphomes B induits par le virus de la leucémie aviaire, les cellules tumorales contiennent un provirus intégré au voisinage du gène *c-myc*. Les ARN transcrits sont hybrides et contiennent à la fois des séquences virales et la séquence de *c-myc* et sont présents à des taux 30 à 100 fois supérieurs à celui de l'ARNm de *c-myc* dans les tissus normaux. Les transcrits hybrides codent pour une protéine MYC normale, surexprimée. La transformation maligne de ces cellules suppose la survenue d'événements oncogéniques supplémentaires. Comme l'intégration du provirus se fait au hasard, et que des événements génétiques supplémentaires sont nécessaires à la transformation tumorale, les tumeurs induites par ce virus apparaissent lentement et sont clonales, à la différence de celles induites par les virus transformants aigus.

Chapitre VII

Prédisposition héréditaire aux cancers

La notion de prédisposition héréditaire aux cancers est une notion relative qui correspond à une augmentation du risque de cancers ou d'un cancer donné d'une personne mesurée par rapport au risque moyen de la population générale ou plus précisément par rapport aux personnes non porteuses d'un marqueur génétique donné. Il s'agit de la mesure d'un risque relatif. Autrement dit, si on revient au processus biologique de la transformation cellulaire, il s'agit de situations où le quota de mutations nécessaires à la transformation cellulaire est atteint plus rapidement par rapport à la moyenne générale. Ainsi lorsqu'une mutation d'un gène clé du processus tumoral est constitutionnelle, une étape est déjà franchie. La prédisposition héréditaire aux cancers relève essentiellement de 4 types de mécanismes :

1- Inactivation mono-allélique germinale d'un gène suppresseur de tumeurs

L'ensemble des cellules de l'organisme de l'individu prédisposé présente une mutation inactivatrice au niveau de l'un des allèles d'un gène suppresseur de tumeurs soit par héritage d'un allèle muté de l'un des parents porteur de la tare, soit par néo-mutation survenue au niveau des cellules germinales de l'un des parents. La perte de fonction d'un gène suppresseur de tumeurs suppose la survenue de mutations inactivatrices au niveau des 2 allèles. Si les deux mutations sont somatiques, leur chance de survenue dans une même cellule est très faible. Par contre, lorsque la première mutation est germinale, la présence d'un allèle muté dans l'ensemble des cellules de l'organisme augmente considérablement la probabilité de perte de fonction du gène à l'occasion d'un deuxième événement somatique.

L'exemple type en est le rétinoblastome ; tumeur embryonnaire intraoculaire dont l'incidence est d'environ 1 cas pour 15 000 à 25 000 naissances. Il atteint préférentiellement les enfants de moins de 3 ans, et est rare au-delà de 5 ans (5 % des cas). L'existence de cas familiaux est connue depuis longtemps et les études épidémiologiques ont permis de conclure à l'existence de 2 types de rétinoblastomes, les rétinoblastomes héréditaires d'une part et les rétinoblastomes sporadiques d'autre part. Environ 15 % des enfants atteints de rétinoblastome présentent des antécédents familiaux de rétinoblastome mais les formes héréditaires *de novo*, imputables à une mutation germinale, au niveau d'un gamète parental, sont fréquentes. Au total 30 à 40 % des rétinoblastomes sont héréditaires et transmissibles à la descendance, 60 à 70 % des cas sont sporadiques et non transmissibles. La transmission de la maladie est de type autosomique dominant, avec toutefois une pénétrance incomplète, de l'ordre de 90 %, et une expressivité parfois variable.

- **Formes héréditaires** : dont l'âge médian de survenue plus précoce, de 12 à 14 mois, avec une fréquence élevée des formes multifocales ou bilatérales (85 % des cas),
- **Formes sporadiques** : surviennent plus tardivement (âge médian de 24 à 30 mois) et sont toujours unilatérales et unifocales.

Ces observations ont permis à *Knudson* de proposer dès 1971 l'hypothèse des « 2 coups » selon laquelle le rétinoblastome était la conséquence de deux événements mutationnels :

- **le premier évènement, germinal**, porté par toutes les cellules de l'organisme,
- **le deuxième, somatique**, survenant dans une cellule dont le premier allèle est déjà muté.

Le risque que 2 mutations inactivatrices touchent les 2 allèles d'un même gène dans une même cellule somatique normale est très faible et explique que les rétinoblastomes sporadiques sont toujours uni-focaux. Par contre, dans les formes héréditaires la première mutation est germinale, transmise par un parent porteur de la tare (30 % des cas) ou survenue *de novo* dans l'un des gamètes parentaux, et est présente dans toutes les cellules de l'organisme ; tous les rétinoblastes contiennent donc la première mutation et le risque qu'une deuxième mutation survienne au niveau de certains d'entre eux est donc beaucoup plus élevé et explique la forte pénétrance et le caractère multifocal de la maladie.

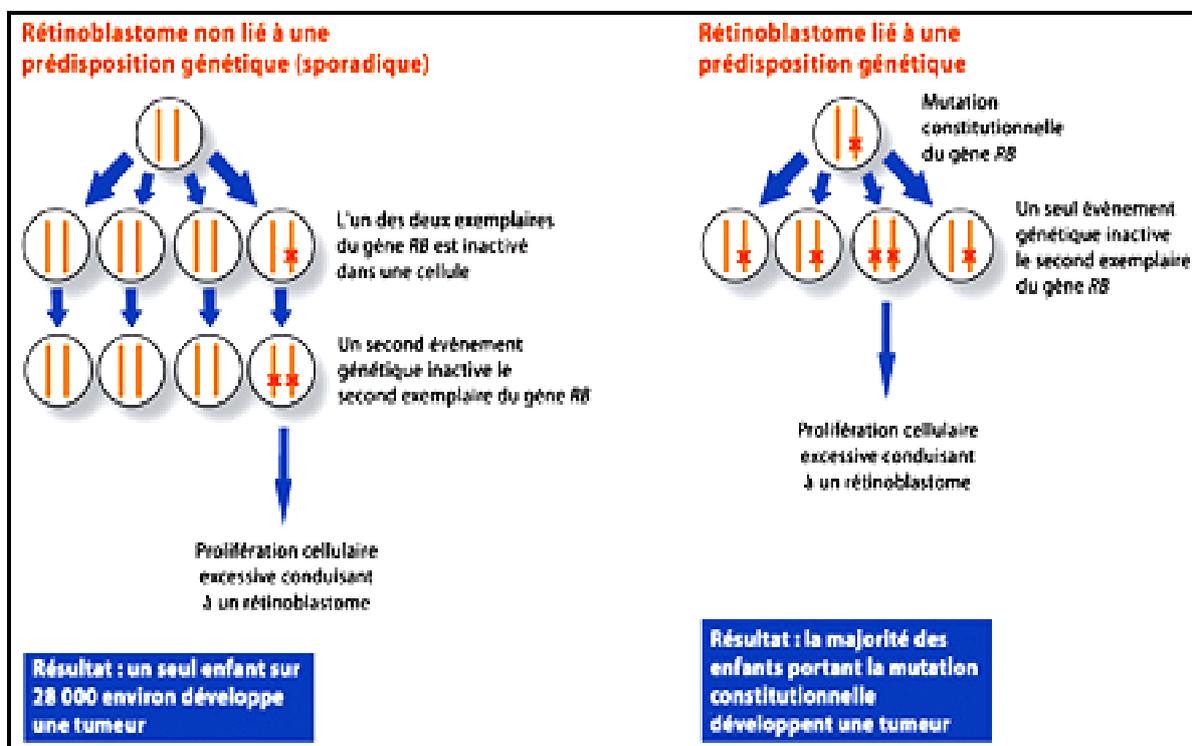


Figure 17. Mécanisme de survenue du rétinoblastome (Stoppa-Lyonnet et al., 2010).

L'approche moléculaire a permis d'étayer ces hypothèses et de préciser le locus (13q14), puis d'identifier et de caractériser le gène du rétinoblastome. *Rb* est un grand gène mesurant plus de 200 Kpbs et qui contient 27 exons. Le produit du gène, la protéine Rb, est une phosphoprotéine nucléaire de 110 kDa impliquée dans la régulation négative du cycle cellulaire. L'étude du génotype constitutionnel des patients atteints de rétinoblastome héréditaire a permis de décrire plusieurs modifications structurales inactivatrices du gène : mutations ponctuelles non-sens, délétions, la plupart d'entre elles entraînent des anomalies transcriptionnelles majeures aboutissant à la non-production de la protéine Rb ou à la production d'une protéine tronquée et inactive par l'allèle anormal. En comparant le génotype constitutionnel de ces patients à celui de leur tumeur, il a été possible de montrer que le deuxième événement génétique, survenu au niveau des cellules tumorales uniquement, était une délétion du locus *Rb* de l'allèle homologue réalisant ainsi une perte d'hétérozygotie au niveau de ce locus, ou parfois au niveau d'une portion plus large de l'allèle de part et d'autre du locus *Rb* du chromosome en entier. De ce fait, la plupart des rétinoblastomes n'expriment pas du tout la protéine Rb ou expriment une protéine inactive généralement tronquée. Les études familiales ont permis de montrer que l'allèle anormal présent dans la tumeur était d'origine parentale, retrouvé dans le génome de l'un ou l'autre parent, le deuxième allèle étant délété. Dans les cas de mutations germinales *de novo*, il a pu être montré que ces dernières sont produites le plus souvent sur le chromosome 13 provenant du père reflétant vraisemblablement le plus grand nombre de divisions cellulaires aboutissant à la production des gamètes chez l'homme que chez la femme avec en corollaire un taux de mutation plus élevé.

Le fait que ce type de mutations conduise à l'apparition de rétinoblastomes chez l'enfant jeune plutôt qu'à d'autres tumeurs reflète vraisemblablement le rôle fonctionnel de la protéine Rb dans la différenciation des rétinoblastes à cet âge. À un âge plus avancé l'ensemble des rétinoblastes embryonnaires sont vraisemblablement différenciés en photorécepteurs matures, incapables de se multiplier et insensibles aux mutations de *Rb*. En fait, les enfants survivants de rétinoblastome héréditaire présentent un risque accru de développer ultérieurement des tumeurs mésoenchymateuses telles que des ostéosarcomes, des fibrosarcomes et des mélanomes. De surcroît des altérations structurales acquises du gène *Rb* et des pertes d'hétérozygotie ont été décrites au niveau de tumeurs sporadiques telles qu'ostéosarcomes, cancers bronchiques à petites cellules, cancers de la vessie, du sein, etc.

Depuis la découverte du gène *Rb*, un certain nombre de prédispositions génétiques par mutation germinale d'un gène suppresseur de tumeurs ont été décrites (**tableau II**).

Tableau II. Principales prédispositions héréditaires aux cancers par inactivation germinale d'un gène suppresseur de tumeurs (Stoppa-Lyonnet et al., 2010).

Prédisposition	Incidence	Sites tumoraux	Locus	Gène concerné	Propriétés de la protéine
Cancer du sein héréditaire	1/500	Sein, ovaire	17q 13q	<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i>	Multiple Mitose
Neurofibromatose de type 1 (Recklinghausen)	1/3500	Système nerveux, leucémie	17q	<i>NF1</i>	Contrôle de l'activité de ras
Polypose colique familiale	1/10000	Côlon, rectum et duodénum	5q	<i>APC</i>	Régulation de la β -caténine
Mélanome héréditaire	1/10000	Peau, pancréas	9p	<i>p16</i>	Inhibiteur des CDK
Sclérose tubéreuse de Bourneville	1/10000	Système nerveux, Rein	16p	<i>TSC2</i>	Homologie avec Gap2
Syndrome de Li-Fraumeni	1/30000	Sein, sarcome, leucémie, SNC et corticosurrénales	17p	<i>p53</i>	Réparation de l'ADN et apoptose
Neurofibromatose de type 2 neurinome bilatéral	1/35000	Gliomes, épendyomes	22q	<i>NF2</i>	Interaction cytosquelette-membrane
Rétinoblastome héréditaire	1/40000	Rétine, os, tissus mous, mélanome	13q	<i>Rb</i>	Régulation cycle cellulaire
Néoplasie Endocrine Multiple de type I (NEMI)	1/40000	Pancréas, parathyroïde et hypophyse	11q	<i>NEM1</i>	?
Maladie de Von-Hippel-Lindau	1/40000	Rein, système nerveux	3p	<i>VHL</i>	Régulateur de la transcription
Tumeur de Wilms (WAGR-, Denys-Drash)	1/100000	Rein et autres	11p	<i>WT1</i>	Facteur de transcription
Syndrome des cancers basocellulaires	-	Peau et médulloblastomes	9p	<i>PCTH</i>	?
Cancer gastrique familial	-	Estomac	16q	Cadhérine E	Molécule d'adhérence

2- Mutation germinale activatrice d'un oncogène

Un exemple bien connu est le proto-oncogène *RET* (REarranged during Transfection). Les Cancers Médullaires de la Thyroïde (CMT) sont des cancers développés aux dépens des cellules C qui sont des cellules neuroendocrines sécrétrices de calcitonine présentes dans la thyroïde. Ce sont des tumeurs rares, sporadiques dans environ 80 % des cas, familiales et à transmission autosomale dominante dans 20 % des cas. Il existe 3 formes familiales de CMT :

- **CMT Familial sans autres anomalies associées (CMTF)**,
- **Néoplasie Endocrine Multiple de type 2A (NEM-2A)** associant CMT et phéochromocytome surrénalien et/ou adénome parathyroïdien,
- **Néoplasie Endocrine Multiple de type 2B (NEM-2B)** associant CMT, des anomalies morphologiques : neurofibromes de la muqueuse buccale et ganglio-neuromes intestinaux, aspect marfanoïde avec arachnodactylie, avec ou sans phéochromocytome surrénalien, mais sans atteinte des parathyroïdes.

Les analyses de liaison puis les techniques de biologie moléculaire ont montré que les 3 syndromes étaient en rapport avec des mutations germinales du gène *RET* situé en 10q11.2 sur le bras long du chromosome 10. Le gène *RET* mesure 80 kb et contenant 21 exons, codant pour un récepteur à activité tyrosine kinase. La protéine comprend plusieurs domaines fonctionnels dont un domaine extra-cytoplasmique de liaison au ligand Cadherine-like, un domaine extra-cytoplasmique juxta-membranaire très riche en cystéine, un domaine transmembranaire, et deux domaines tyrosine kinase TK1 et TK2 intracytoplasmiques. L'activation de RET ne passe pas par la fixation directe des ligands sur le récepteur. Les ligands de la famille du GDNF (Glial Derived Neurotrophic Factor) se lient à une famille de récepteurs membranaires (GFR alpha 1 à 4) qui n'ont pas de domaine transmembranaire, ni de domaine intracytoplasmique et qui servent d'adaptateurs pour l'activation de RET. Lorsque les complexes GDNF-GFR alpha s'unissent au récepteur celui-ci se dimérise et subit une autophosphorylation qui lui confère son activité de tyrosine kinase responsable de la transmission du signal mitogène.

Mulligan a montré en 1993 que les individus atteints de prédisposition héréditaire au CMTF et à la NEM-2A portaient une mutation germinale mono-allélique de *RET* responsable d'une activation constitutive du récepteur. Les mutations portant sur les cystéines 609, 611, 618, 620 et 634 portant sur le domaine extracellulaire juxta-membranaire prédisposent au CMT et à la NEM2A.

La prédisposition au phéochromocytome surrénalien en plus du CMT est fortement corrélée aux mutations portant sur la cystéine 634 qui représentent 85 % des mutations rencontrées dans les familles NEM 2A. L'existence d'une hyperparathyroïdie est fortement corrélée à la mutation spécifique cystéine 634 en arginine. Ces mutations entraînent une dimérisation constitutive du récepteur qui devient capable d'induire un signal mitogène en l'absence de ligand. D'autres mutations activatrices, cette fois au niveau du domaine tyrosine kinase intracellulaire ont été décrites au niveau des codons 768, 804 et 891 dans des familles de CMT, et au niveau des codons 883 et 918 dans des familles de NEM 2B. Ces diverses mutations sont également rencontrées dans les CMT sporadiques et il s'agit alors de mutations somatiques rencontrées au niveau des cellules tumorales uniquement. On a découvert par ailleurs que des mutations inactivatrices du récepteur RET, mutations faux-sens au niveau du domaine extracellulaire ou au niveau du site catalytique (TK1 et TK2), ou des mutations non-sens produisant une protéine tronquée étaient en cause dans la maladie de Hirschsprung ou mégacôlon congénital. En effet, il a été trouvé que la protéine RET est impliquée dans la migration et la différenciation des cellules du système nerveux parasymphatique de la crête neurale dans le tube digestif au cours de l'organogénèse chez l'embryon.

En résumé

Le gène *RET* est impliqué dans plusieurs modèles de cancérogenèse humaine ainsi que dans des anomalies du développement embryonnaire :

- des mutations ponctuelles germinales activatrices de *RET* sont à l'origine des formes familiales de cancers médullaires de la thyroïde, ainsi que des NEM de type 2A et 2B ; la spécificité de la mutation au niveau d'un même codon peut entraîner des expressions phénotypiques différentes de la même maladie,
- des mutations identiques sont observées dans les cellules tumorales de formes sporadiques de CMT ; il s'agit alors de mutations acquises, somatiques,
- d'autres types de modifications activatrices du récepteur RET ont été observés dans certains cancers papillaires sporadiques de la thyroïde ; il s'agit de réarrangements chromosomiques acquis aboutissant à des fusions de gènes et à la production de récepteurs chimériques à activité tyrosine kinase augmentée,
- enfin des mutations germinales inactivatrices de *RET* sont responsables de la maladie de Hirschsprung.

Peu de syndromes de prédispositions congénitales au cancer par mutation germinale activatrice d'un oncogène sont connues chez l'homme. Outre *RET* pour le CMTF et les NEM2A et 2B, on peut citer :

- les rares cas de prédisposition familiale au mélanome par mutation germinale activatrice du gène *CDK4*,
- les rares cas de prédisposition familiale au cancer papillaire du rein par mutation germinale de *c-met*.

3- Anomalies de la réparation de l'ADN

L'intégrité du matériel génétique est continuellement remise en cause par une variété d'agents génotoxiques d'origine exogène ou endogène. Un ensemble de mécanismes complexes de réparation permet à la cellule de détecter et d'éliminer les lésions délétères induites par ces agents sur l'ADN afin de sauvegarder l'intégrité de son génome. Ces mécanismes sont classiquement regroupés en 4 grands systèmes au sein des cellules eucaryotes : la réparation par excision de bases (BER) ou de nucléotides (NER), la réparation des mésappariements (MMR) et la réparation des cassures double brin (DSBR).

L'acquisition de mutations dans les gènes oncogènes ou suppresseurs de tumeurs peut être secondaire aux erreurs de réplication de l'ADN survenant lors de chaque division cellulaire ; elle est naturellement favorisée par l'exposition aux agents mutagènes. On comprend ainsi que des mutations dans les gènes de réparation de l'ADN, mais aussi dans les gènes impliqués dans la stabilité des chromosomes, aient également un rôle-clé, bien qu'indirect, dans le processus tumoral, en augmentant le taux de mutations, et donc la probabilité de voir émerger un processus tumoral. Le syndrome de Lynch est l'exemple type.

À l'origine était appelé « cancer family syndrome », ce cancer décrit pour la première fois en 1916, a été réétudié en 1971 par *Lynch* qui a proposé d'appeler ce syndrome HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer), acronyme pour cancer colorectal héréditaire sans polypose. Cette pathologie est transmise de manière autosomique dominante, caractère confirmé par l'augmentation du risque de 2 à 4 fois de développer un cancer pour les individus possédant une histoire familiale positive : présence de cancers chez les parents au premier degré.

Le syndrome de Lynch est le plus fréquent des cancers colorectaux avec une incidence de 1 à 2 pour 1000. Il représenterait de 0,5 à 5 % de la totalité des cancers colorectaux. Plusieurs études ont montré que la prévalence de cette pathologie était due à la fois aux facteurs génétiques, mais également à des facteurs environnementaux et notamment l'alimentation.

Le syndrome de Lynch se caractérise par une carcinogenèse accélérée avec apparition d'un carcinome en 2 à 3 ans, au lieu de 8 à 10 ans chez les autres patients. En effet, dans ce syndrome, une cellule adénomateuse avec une déficience en protéine MMR acquiert des mutations 2 à 3 fois plus rapidement qu'une cellule sans ce déficit. Il en résulte une accumulation de mutations dans les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs, ce qui va mener à une progression rapide de la malignité. En règle générale, le syndrome de Lynch est caractérisé par un âge précoce de survenue du cancer (inférieur à 45 ans pour 80 % des patients), même si le cancer colorectal peut parfois se développer à un âge plus tardif. Les individus atteints de ces cancers colorectaux, pauvrement différenciés, familiaux, présentent un risque accru de développer d'autres cancers tels qu'un second cancer colorectal (risque de 70 à 85 %), un cancer de l'endomètre (risque de 50 %) et d'autres cancers (risque inférieur à 15 % ; cancer des ovaires, de l'estomac, de l'intestin grêle, des reins/uretère, du cerveau, des voies hépatobiliaires, de la peau).

Les premiers gènes qui ont été associés à ce syndrome sont les gènes *MSH2* et *MLH1*, localisés sur les chromosomes 2p16 et 3p21 et qui appartiennent à la famille des gènes de réparation des mésappariements de l'ADN. Cette association a été découverte grâce à une analyse de liaison réalisée dans une famille, confirmant la transmission mendélienne de ce syndrome. Une autre étude a montré cette association grâce à la perte allélique d'un marqueur microsatellite localisé en 2p16 qui est lié à la susceptibilité aux cancers colorectaux. De récentes études ont montré que le syndrome de Lynch peut être expliqué dans 30 à 80 % des cas par la présence d'une mutation germinale héréditaire dans l'un des 4 gènes principaux du système MMR mis en cause dans cette pathologie cancéreuse : *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2*. Les autres gènes de ce système, *MLH3*, *MSH3* et *PMS1* n'ont pas encore une implication très claire dans ce syndrome, même si dans de rares cas des mutations causales ont pu être identifiées.

Jusqu'à l'identification des gènes *hMLH1* et *hMSH2* dans le syndrome de Lynch, on pensait que les prédispositions aux cancers associées à une anomalie de la réparation de l'ADN ne concernaient que des enfants atteints de maladies rares transmises selon le mode récessif et caractérisé le plus souvent par des anomalies chromosomiques acquises et spécifiques. Il s'agit principalement de l'ataxie télangiectasie, de la maladie de Fanconi et du syndrome de Bloom.

Aujourd'hui, on peut retenir qu'avec les prédispositions aux cancers du côlon dans le cadre du syndrome de Lynch ainsi que dans le cadre de la polypose atténuée liée aux mutations bi-alléliques de *MYH* et les prédispositions aux cancers du sein et de l'ovaire avec les mutations *BRCA1* et *BRCA2*, la majorité des formes héréditaires de cancers fréquents de l'adulte sont liés à des anomalies de réparation de l'ADN (**tableau III**).

Tableau III. Prédisposition aux cancers par anomalie de la réparation de l'ADN (Stoppa-Lyonnet et al., 2010).

	Clinique	Gènes altérés	Caractéristiques cellulaires
Syndrome de Lynch (HNPCC)	Autosomique dominant Incidence accrue des cancers du côlon, endomètre, estomac, urothélium, etc.	<i>HMSH2</i> <i>HMLH1</i> <i>PMS1</i> et <i>PMS2</i>	Déficit du système de réparation MMR
Xéroderma pigmentosum	Autosomique récessif Sensibilité aux UV, agents alkylants Forte incidence des cancers cutanés	<i>XPA</i> <i>XPG</i>	Déficit des systèmes de réparation NER et BER
Ataxie Télangiectasie	Autosomique récessif Ataxie cérébelleuse, télangiectasie conjonctivales Déficit immunitaire Sensibilité aux radiations ionisantes Lymphomes, leucémies, sein	<i>ATM</i> (11q)	Déficit de la réparation des dommages induits par les radiations ionisantes
Anémie de Fanconi	Autosomique récessif Retard de croissance et anomalies squelettiques et rénales Aplasies médullaires Leucémies aigues myéloïdes	Multiple (<i>AF1</i> → 8)	Anomalie de la réparation de l'ADN et cassures chromosomiques
Syndrome de Bloom	Autosomique récessif Retard de croissance et photosensibilisation Leucémies aigues, lymphomes et adénocarcinomes	<i>BS</i>	Fragilité chromosomiques et dans les échanges entre chromatides

4- Polymorphisme de gènes de susceptibilité

Au cours des 20 dernières années, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle de facteurs génétiques dans la survenue de cancers. Les premières études se sont tournées vers l'identification de mutations rares à forte pénétrance, dans des familles présentant une fréquence très élevée de sujets atteints de cancers. Le rôle des mutations sur les gènes *BRCA1* et *BRCA2* dans les cancers de l'ovaire ou du sein chez la femme avant la ménopause illustre bien ce champ de recherche. On considère néanmoins que la part attribuable à ces mutations dans les cancers familiaux n'excède pas 20 %. Bien que de nouvelles mutations à forte pénétrance puissent être découvertes pour expliquer la part restante, d'autres modèles considèrent cependant comme plus probable l'existence de mécanismes polygéniques, mettant en jeu de nombreux allèles, conférant chacun un risque faible de cancer. Cette hypothèse dépasse le seul cadre du cancer du sein et s'applique vraisemblablement à de nombreuses localisations cancéreuses. L'hypothèse polygénique permettrait d'expliquer la grande variabilité du risque de cancer d'un individu à l'autre, dépendant en particulier du nombre d'allèles délétères.

Chacun de nos gènes comporte des variations nucléotidiques communément appelées « Single Nucleotide Polymorphisms » (SNPs) pouvant modifier leur efficacité biologique. Une diminution de cette efficacité pourrait donc moduler le risque de cancer associé à une exposition à des agents toxiques. L'étude de leurs effets dans le développement de cancers, et leurs interactions avec l'exposition aux toxiques, représentent une part importante de la recherche actuelle en épidémiologie des cancers. Ces polymorphismes peuvent avoir un impact important au niveau de la population si leur fréquence est élevée. Ces variations interindividuelles de l'activité de certaines voies métaboliques peuvent jouer un rôle dans la susceptibilité à des carcinogènes environnementaux ou endogènes.

- **Polymorphisme des enzymes d'activation (phase I) et de détoxification (phase II) des pro-carcinogènes chimiques :** la superfamille du cytochrome P450 catalyse le métabolisme oxydatif d'un très grand nombre de pro-carcinogènes chimiques endogènes ou exogènes. Cette phase I d'activation peut conduire à la production de molécules intermédiaires réactives avec l'ADN et potentiellement carcinogènes. Plusieurs isoenzymes du cytochrome P450 présentent un polymorphisme génétique associé à une augmentation ou une diminution de l'activité enzymatique et du risque carcinogénétique.

Au contraire des enzymes de la phase I, les enzymes de la phase II incluant les Glutathion S Transférases (GST), les N-Acétyl-Transférases (NAT), les époxydes hydrolases et les sulfo-transférases détoxifient généralement les carcinogènes chimiques pour produire des molécules hydrophiles qui peuvent être excrétées. La délétion du gène *GST M1*, observée chez 50 % des individus de race caucasienne augmente le risque relatif de cancer du poumon chez les fumeurs. Les amines aromatiques carcinogènes sont désactivées par la NAT. Les individus présentant un génotype acétylateur « lent » présentent un risque de cancer de vessie augmenté lors de l'exposition à la 2-naphtylamine. Le risque relatif de cancers induit chez les individus est généralement faible en raison de la multiplicité et de la redondance des voies métaboliques en jeu et de l'efficacité des systèmes de réparation. Toutefois la conjonction de plusieurs anomalies chez un même individu peut entraîner un risque significatif. Ainsi dans une enquête japonaise, l'association d'un variant allélique de l'isomorphe *CYP1A1* du cytochrome P450 et d'un variant nul du gène de la glutathion transférase- μ augmente le risque relatif de cancer du poumon de 9 fois chez les non-fumeurs et de 41 fois chez les fumeurs.

- **Autres polymorphismes génétiques impliqués dans la carcinogénèse :**
le polymorphisme de centaines de gènes est impliqué dans les variations interindividuelles de susceptibilité aux différents types de cancers, et aux carcinogènes endogènes et exogènes. Nous ne citerons que quelques exemples :
 - **polymorphisme d'enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN :**
le polymorphisme des gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif tels que la *MnSOD* influencent le taux de dommages oxydatifs de l'ADN ; les activités des enzymes de réparation telles que la 06-alkyl-deoxyguanine DNA alkyl-transférase et l'uracyl DNA glycosylase peuvent varier de 1 à 200 fois selon les individus,
 - **polymorphisme génétique du métabolisme hormonal :**
 - **œstrogènes** : certains catabolites des œstrogènes, et en particulier les catéchols-œstrogènes ont des effets directement carcinogènes sur l'ADN ; les femmes présentant un variant de la catéchol-O-méthyltransférase de faible activité présentent un risque de cancer du sein augmenté,
 - **androgènes** : il existe un polymorphisme naturel dans une séquence répétée de triplets CAG, allant de 8 à 31 triplets dans une séquence codante de l'extrémité N-terminale du récepteur des androgènes ; les allèles présentant une séquence courte de poly-glutamines sont exposés à un risque de cancer de la prostate plus élevé,

- **récepteur de la vitamine D** : certains variants du récepteur pour la vitamine D, impliqués dans la différenciation cellulaire sont associés à un risque accru de cancers du sein, et également de cancers de la prostate en particulier, dans la population afro-américaine.

En résumé :

Plusieurs variants au sein d'un même gène, et plusieurs gènes au sein d'une même voie métabolique, interviennent probablement dans le développement d'un cancer. Une même personne peut ainsi être à risque élevé de cancer pour certains polymorphismes et à faible risque pour d'autres, et il est probable que la population générale comporte un très petit nombre de personnes porteuses de tous les génotypes à risque et une grande proportion de sujets ayant à la fois des génotypes à haut risque et à faible risque. La somme de leurs effets est cependant difficile à évaluer dans les études actuelles qui n'ont considéré qu'un, voire deux polymorphismes génétiques. Les avancées récentes dans l'identification de nouveaux variants et dans les techniques de génotypage à haut-débit facilitent maintenant l'analyse simultanée de plusieurs centaines de milliers de polymorphismes dans les études épidémiologiques. Cependant, l'étude simultanée de multiples variants, et des interactions complexes gène-gène et gène-environnement, nécessite des tailles d'échantillons considérables, de l'ordre de plusieurs milliers de cas. De telles études, difficilement réalisables par des équipes de recherche individuelles, sont actuellement développées au niveau international ou dans le cadre de consortiums.

Références bibliographiques

1. **AFSSET-INSERM.** 2008. Cancer et environnement (rapport d'expertise collective). *Les éditions Inserm-Paris*. Pagination multiple. ISBN : 2-8559-8868-3.
2. **BERGERAT J P.** 2003. Polycopié de cancérogenèse et développement tumoral. Cours en ligne. *Faculté de Médecine - U.L.P.-Strasbourg - France Enseignement*. <http://med.unistra.fr/fre/Supports-Cours/Cours-et-supports-de-cours-en-ligne>. Consulté le 12 Septembre 2015.
3. **CALLEN J C et PERASSO P.** 2005. Biologie cellulaire : des molécules aux organismes. 2^{ième} édition. Collection Sciences-Sup. *Dunod, Paris*. ISBN : 2-1004-9236-5.
4. **DELTOUR S, CHOPIN V et LEPRINCE D.** 2005. Modifications épigénétiques et cancer. *Médecine/Sciences*. 21 : 405-11.
5. **GRIFFITHS A, CARROLL S, WESSLER S et al.** 2013. Introduction à l'analyse génétique. 6^{ième} édition. *De Boeck Supérieur*. Pagination multiple. ISBN : 2-8041-6013-0.
6. **GRIFFITHS A.** 2001. Analyse génétique moderne. *Edition De Boeck Université, Bruxelles*. Pagination multiple. ISBN : 2-7445-0111-5.
7. **GUASCH G.** 2002. Dérégulation moléculaire et cancer : prolifération, survie et inhibition de l'apoptose. *IMGT Éducation - Université de Montpellier - France*. www.imgt.org. Consulté le 04 Septembre 2016.
8. **HAROUSSEAU JL.** 2011. Précis d'hématologie et d'oncologie. *Springer-Verlag France*. Pagination multiple. ISBN : 978-2-287-99341-1.
9. **KNOWLES M A et SELBY P J.** 2005. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. *Oxford University Press*. Pagination multiple. ISBN : 0-19-856853-3.
10. **LODISH H, BERK A, ZIPURSKY L et al.** 2005. Biologie moléculaire de la cellule. *Edition De Boeck Université, Bruxelles*. Pagination multiple. ISBN : 2-8041-4802-5.
11. **MEIJER L.** 2006. Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Springer-Verlag - Oncologie*. 5 : 311-326.

12. **MERLIN J L.** 2014. Les biomarqueurs moléculaires en oncologie. *Springer-Verlag France*. Pagination multiple. ISBN : 978-2-8178-0444-6.
13. **PASTERNAK J.** 2003. Génétique moléculaire humaine : Une introduction aux mécanismes des maladies héréditaires. *Éditeur De Boeck Supérieur*. Pagination multiple. ISBN : 2-7445-0147-6.
14. **POMMIER Y et KOHN K W.** 2003. Cycle cellulaire et points de contrôle en oncologie : nouvelles cibles thérapeutiques. *Médecine/Sciences*. 19 : 173-86.
15. **ROBERT J.** 2010. Signalisation cellulaire et cancer : un manuel pour les étudiants et les oncologues. *Springer-Verlag France*. Pagination multiple. ISBN : 978-2-8178-0027-1.
16. **SCHULZ W A.** 2005. Molecular biology of human cancers: An advanced student's textbook. *Springer*. Pagination multiple. ISBN : 1-4020-3186-6.
17. **STOPPA-LYONNET D et LENOIR G.** 2005. Prédispositions génétiques aux cancers : actualités et perspectives en 2005. *Médecine/Sciences*. 21 : 962-8.
18. **STOPPA-LYONNET D, STERN M H, SOUFIR N et al.** 2010. Prédispositions génétiques aux cancers : actualités et perspectives en 2010. *Pathologie Biologie*. 58 : 324-330.
19. **SWYNGHEDAUF B.** 2008. Aide-mémoire Biologie et génétique moléculaires. *Dunod*. Pagination multiple. ISBN : 978-2-10-053798-3.
20. **TUBIANA M.** 2008. Généralités sur la cancérogenèse. *Comptes Rendus Biologies*. 331 : 114-125.