

Cancer et chaos génétique : une possible implication de l'ADN polymérase β ?

La conservation du patrimoine génétique d'une cellule est un processus très fidèle. Le génome d'une cellule somatique subit en effet moins d'une altération irréversible lors de chaque division. En d'autres termes, au cours d'une vie humaine, une cellule somatique est le siège de moins d'une dizaine de mutations. Ce faible taux de modifications nucléotidiques « spontanées » ne peut donc rendre compte directement des milliers de mutations observées dans la plupart des lignées tumorales. Il y a 25 ans, Lawrence Loeb, de l'Université de Seattle (WA, USA), proposait que les cellules cancéreuses acquièrent, dès l'origine du processus de transformation tumorale, un « phénotype mutateur » [1, 2], c'est-à-dire une capacité intrinsèque de produire des mutations en quantité. Cette capacité mutagène serait susceptible de conférer aux cellules un avantage sélectif de croissance et de favoriser l'apparition de sous-populations cellulaires variantes à fort potentiel transformant.

Au cours des dernières années, plusieurs travaux, montrant le très grand désordre génétique des cellules cancéreuses, ont semblé étayer cette hypothèse « intuitive » (pour revue voir [3]). Le génome de cellules d'une forme héréditaire de cancer non polyposique du côlon (HNPCC) est ainsi le siège d'expansions et de retractions de petites séquences répétitives d'ADN appelées « microsatellites », d'un grand nombre de délétions ou d'une ségrégation chromosomique imparfaite lors de la division cellulaire. D'autres types d'anomalies génétiques ont été dépistées pour des cancers de l'ovaire ou des cancers du sein pour

lesquels environ une perte d'hétérozygotie survient chaque 5 kilobases. L'ensemble de ces résultats suggère que la cellule cancéreuse acquiert un phénotype mutateur qui permet la sélection de formes variantes capables: (1) de poursuivre le processus de transformation tumorale et/ou (2) de résister à l'action cytotoxique de médicaments anticancéreux.

Très dernièrement, une expérience menée dans le laboratoire de Jeffrey Miller, à Los Angeles (CA, USA), a montré qu'en soumettant des bactéries à plusieurs pressions de sélection successives, on sélectionnait rapidement des mutants à fort potentiel mutagène [4]. Après trois sélections successives sur des milieux contenant de la rifampicine, de l'acide nalidixique, puis du lactose comme unique source carbonée, 100 % d'une population de bactéries *Escherichia coli* initialement auxotrophes pour le lactose possédaient un phénotype mutateur. Il est donc tentant d'effectuer un raisonnement parallèle en ce qui concerne les cellules cancéreuses: soumises elles aussi à maintes contraintes sélectives au cours de la progression tumorale (carence en oxygène ou en apport sanguin, gêne stérique lors de l'invasion tissulaire, traitement chimiothérapeutique cytostatique), elles auraient, grâce à l'extrême « flexibilité » de leur support génétique, la possibilité de s'adapter à ces contraintes et de s'en affranchir.

Une déficience dans tout gène impliqué dans le maintien de la structure du génome est théoriquement susceptible d'enclencher l'émergence du phénotype mutateur et donc d'une variabilité génétique impor-

tante et « salutaire » pour la survie de la tumeur dans l'organisme. Le gène codant pour l'ADN polymérase β peut ainsi être considéré comme un excellent candidat dans le cadre de l'étude de ce phénomène.

L'ADN polymérase β

En 1995 le magazine *Science* attribuait ainsi aux protéines de réparation des mésappariements de bases le titre (très envié chez les macromolécules) de « protéines de l'année ». En effet il venait d'être mis en évidence qu'une déficience dans l'une de ces protéines était la caractéristique commune de lignées tumorales issues du cancer du côlon HNPCC [5, 6]. Les gènes contrôlant le partage des chromosomes en mitose, le cycle cellulaire ou ceux gouvernant la biosynthèse des *pools* de désoxynucléotides représentent d'autres catégories de gènes candidats puisque impliqués dans le maintien de la stabilité génétique.

Notre laboratoire a mis récemment en évidence, notamment dans un modèle murin mimant la leucémie myéloïde chronique [7], des cancers de l'ovaire et de l'endomètre (non publié), un nouveau type d'événement génétique susceptible de conférer un phénotype mutateur aux lignées cellulaires qui en sont issues. Il s'agit de la surexpression d'une enzyme appelée ADN polymérase β (Pol β). Cette ADN polymérase, qui devrait plus exactement être nommée « insertase », est une des cinq ADN polymérases nucléaires de mammifères dont les ADNc ont été clonés à ce jour (α , β , δ , ϵ et ζ). Elle joue un rôle « bénéfique » pour la cellule puisqu'elle permet de com-

bler une petite brèche de l'ADN lorsqu'un nucléotide endommagé a été préalablement excisé lors du processus de « réparation par excision de bases » [8]. Pol β , dont le rôle est donc de réparer « coûte que coûte » l'ADN endommagé, n'est en revanche pas très regardante sur la légitimité des nucléotides incorporés. Tom Kunkel (*Research Triangle Park*, NC, USA) a ainsi montré qu'*in vitro* elle incorpore un désoxynucléotide erroné chaque 1500 bases répliquées environ [9]. Parmi les ADN/ARN polymérases eucaryotes, seule la transcriptase inverse du virus HIV commet autant d'erreurs. Pol β est en outre la seule ADN polymérase capable d'incorporer efficacement dans l'ADN des analogues nucléotidiques, par exemple des didésoxynucléotides antiviraux comme l'azidothymidine (AZT) ou la didésoxycytidine (ddC) [10]. L'action de cette enzyme est donc par nature source d'erreurs et de mutations, d'où son qualificatif d'ADN polymérase « infidèle ». Il n'est ainsi pas étonnant que l'expression de cette protéine soit très faible tout au long du cycle cellulaire [11].

Un excès de Pol β induit un accroissement de la fréquence de mutations spontanées

Nous avons conçu un vecteur d'expression capable d'accroître d'un facteur 7 et de façon stable l'expression de Pol β dans des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) afin d'étudier l'influence d'une augmentation « artificielle » de la concentration intracellulaire de Pol β sur la fréquence de mutagenèse spontanée [12]. Trois cibles génétiques indépendantes ont été choisies dans le but de quantifier cet effet mutagène : 1) le gène codant pour la protéine Na/K ATPase qui règle la concentration intracellulaire des ions potassium et sodium ; 2) le gène *HPRT* gouvernant une voie de récupération de la biosynthèse des purines ; 3) le gène *lacZ* codant pour la β -galactosidase. La perte de la fonction d'un de ces gènes, directement liée à la fréquence de mutations, est aisée à observer. Dans les deux premiers cas le taux de mutations est calculé après décompte des

cellules résistantes à l'ouabaine pour le gène de l'ATPase et à la 6-thioguanine pour le gène *HPRT*. En ce qui concerne l'analyse de la fonction du gène *lacZ*, le dénombrement des cellules, à l'origine bleues et qui apparaissent blanches sur un milieu de culture contenant le galactoside X-gal, permet de quantifier la mutagenèse. Selon le test utilisé, nous avons montré qu'une surexpression d'un facteur 7 de Pol β induisait une augmentation de 3 à 8 fois du taux d'apparition de mutations (*figure 1*). Un excès de Pol β confère donc un phénotype mutateur aux cellules. Nous étudions actuellement les mécanismes moléculaires susceptibles d'expliquer ce phénomène. Il est possible par exemple que l'ADN polymérase β en excès se substitue partiellement aux ADN polymérases α , δ et ϵ impliquées dans la réplication de l'ADN chromosomique. Plus globalement, Pol β surexprimée pourrait jouer un rôle majeur au cours de processus biologiques qui ne lui sont normalement pas dévolus et qui font intervenir une synthèse d'ADN, comme la réparation de brèches importantes de l'ADN après excision

d'adduits encombrants (*nucleotide excision repair*) ou bien encore la synthèse nucléique associée aux événements de recombinaison génétique. Pol β étant, nous l'avons noté, très « infidèle », ces mécanismes, indispensables à la survie de la cellule et en condition normale considérés comme « fidèles », deviendraient alors sources de multiples mutations.

Une cellule surproduisant Pol β devient résistante vis-à-vis de l'action de certains agents thérapeutiques

Nous nous sommes, dans un second temps, intéressés à l'effet de la surexpression de Pol β sur la sensibilité des cellules recombinantes vis-à-vis de médicaments couramment utilisés en chimiothérapie. Il semble, selon nos travaux, qu'un excès d'ADN polymérase β induise une résistance à l'action de molécules provoquant majoritairement des adduits intrabins bifonctionnels sur l'ADN ciblé, comme l'agent antitumoral *cis*-platine (*figure 2A*). Cette résistance est associée à un accroissement sensible du taux de mutations induites par le traitement

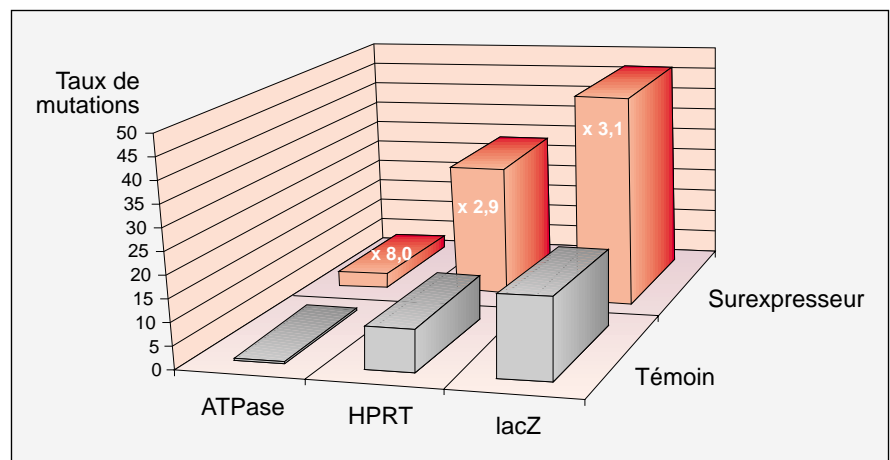


Figure 1. **Taux de mutagenèse spontanée dans des cellules surproduisant ou non Pol β .** Trois cibles génétiques indépendantes ont été utilisées pour quantifier la mutagenèse : le gène codant pour une ATPase membranaire qui règle la concentration intracellulaire d'ions sodium et potassium, le gène *HPRT* impliqué dans la biosynthèse des purines et le gène *lacZ* codant pour la β -galactosidase. Le taux de mutagenèse a été calculé en tenant compte notamment du nombre de générations cellulaires d'après les travaux de Capizzi et Jameson [15]. Il s'exprime, pour les tests ATPase et HPRT, en nombre de mutants apparus pour 10^7 cellules ensemencées, et pour le test *lacZ* en pourcentage de cellules qui apparaissent blanches sur un milieu de culture contenant le galactoside X-gal parmi l'ensemble de cellules originellement bleues.

(figure 2B). Le phénotype mutateur induit par la surexpression de Pol β paraît donc être potentialisé lorsque les cellules sont exposées au *cis*-platine. Afin de proposer un mécanisme moléculaire susceptible d'expliquer ce phénomène, nous avons mené des expériences de réplication d'une matrice d'ADN de 60 nucléotides, porteuse d'un adduit *cis*-platine et d'une amorce de réplication de 17mers (figure 3A), à partir d'extraits de cellules contenant ou non un excès de Pol β . Une incorporation en face de l'adduit est observée uniquement en présence d'extraits surproducteurs. Nous avons, en outre, montré que ce franchissement de la lésion est mutagène (figure 3B). L'analyse nucléotidique des produits de réplication montre en effet que l'ADN polymérase β est capable de répliquer l'ADN lésé (figure 3A) mais au prix de nombreuses mutations au moment du franchissement de l'adduit (figure 3B). Ce résultat pourrait indiquer que certains types de cellules tumorales soumises à un traitement chimiothérapeutique développent un pouvoir mutagène accru lié à un phénotype de tolérance vis-à-vis de ce traitement.

Instabilité génétique lors des phases non prolifératives du processus tumoral

Entre l'étape initiale de transformation cellulaire et le stade ultime du développement néoplasique, au cours de ce processus de cancérogénèse qui peut s'étendre sur des décennies, la cellule est soumise à de nombreux arrêts de croissance. Ces étapes de non prolifération peuvent être dues à un encombrement stérique lors de l'invasion tissulaire, à une carence en oxygène, à un apport sanguin insuffisant lors de l'angiogenèse ou bien encore au traitement chimio- ou radiothérapeutique. Il est probable que lors de ces ralentissements de la progression tumorale, les ADN polymérases responsables de la réplication du génome deviennent peu actives et qu'alors Pol β , *Dr Jekyll* spécialisé normalement dans la réparation de bases endommagées, se transforme en *Mr Hyde* aux fonctions beaucoup plus larges mais aussi beau-

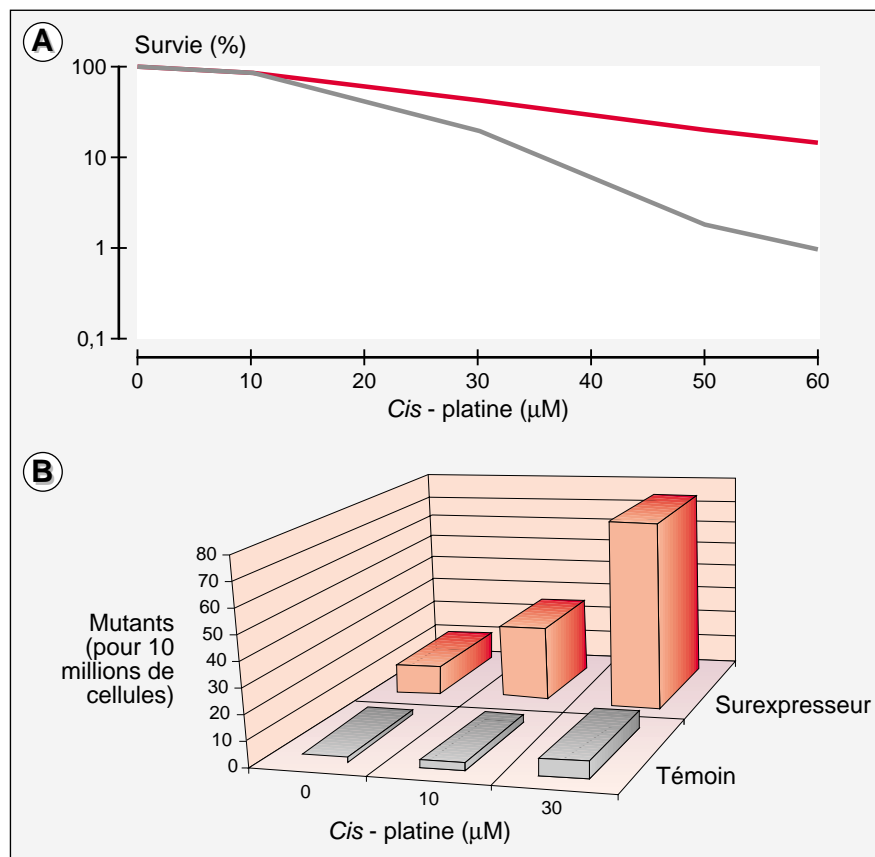


Figure 2. **A.** Survie des cellules CHO surproduisant Pol β après traitement par le *cis*-platine (courbe rouge) comparée à celle des cellules témoins (courbe noire). **B.** Taux de mutagenèse induite par un traitement subléthal des cellules par le *cis*-platine.

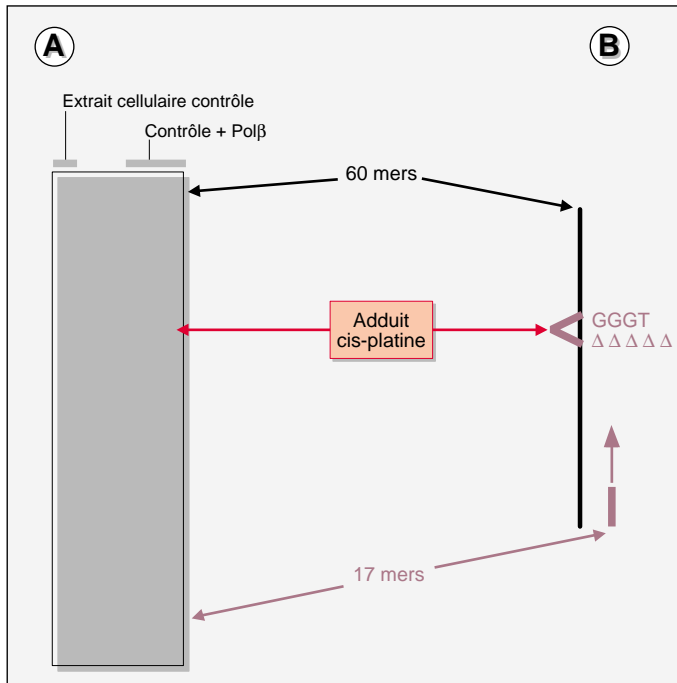
coup plus délétères. La mutagenèse dépendante de Pol β pourrait, en effet, lors des arrêts de croissance cellulaire, permettre l'émergence de formes variantes multiples (figure 4 A-D) dont certaines auront la capacité d'échapper aux causes de cet arrêt, de poursuivre l'expansion clonale et même de devenir résistantes à l'action thérapeutique.

Nous ignorons à ce jour si la surexpression de Pol β est un événement initial du processus tumoral ou bien la conséquence d'un processus antérieur, comme un partage imparfait des chromosomes en cours de mitose, entraînant, par exemple, une augmentation numérique anormale de chromosomes 8 porteurs du gène *pol* β . Quoi qu'il en soit, nous proposons que cette surexpression joue un rôle d'accélérateur de l'instabilité génétique spécifique des cellules cancéreuses (figure 4 A-D).

Vers le diagnostic et la thérapie ?

Les initiatives thérapeutiques visant à modifier le patrimoine génétique des tumeurs se fondent essentiellement sur l'extinction d'oncogènes, *via* par exemple des stratégies antisens, ou bien sur l'introduction de gènes suppresseurs de tumeurs type p53 ou p21. Il est malheureusement à craindre que ces efforts soient mal récompensés si l'on considère que les mutations dans ces « gènes du cancer », peu nombreux (environ 0,2% des gènes de la cellule), sont la résultante d'un processus beaucoup plus précoce de désorganisation génétique. Contrecarrer ou inhiber l'action de ces gènes reviendrait en fait à poser un emplâtre sur une jambe de bois, à agir bien trop « en aval » du processus de cancérogénèse. S'il est possible, en revanche, de diagnostiquer, chez un patient apparte-

Figure 3. Mécanisme moléculaire gouvernant la mutagenèse induite par l'agent cisplatine et dépendante de l'ADN polymérase β . Une matrice d'ADN de 60 nucléotides porteuse d'une lésion Pt-d(GpG), la lésion majoritaire formée par l'agent antitumoral cisplatine, est hybridée avec une amorce de 17 nucléotides. Ce substrat est répliqué *in vitro* par des extraits cellulaires contenant ou non un excès d'ADN polymérase β . **A.** Les produits de réplication sont analysés sur gel de polyacrylamide après électrophorèse. Un produit de pleine taille (60 nucléotides), résultant du franchissement de la lésion Pt-d(GpG), est observable uniquement en présence de l'excès d'ADN polymérase β . **B.** Ces produits ont été séquencés et des mutations ont été observées au niveau de la lésion (Δ : délétion; N: substitution de base).



nant à une population à risque, par exemple, un facteur d'instabilité génétique précoce tel un excès intracellulaire de Pol β , il est envisageable de prévoir un traitement chimiothérapique anticipé afin de ralentir l'apparition de mutations. Cette thérapie « de retard » permettrait un gain d'environ 20 ans en termes de survie chez un patient atteint par un cancer si l'on parvenait à réduire de moitié le taux de mutagenèse spontanée de ses cellules tumorales [13]. Ce traitement pourrait, en outre, être adapté à la situation; dans le cas d'une surexpression de Pol β , les molécules utilisées devront, par exemple, concerner des agents de la famille des antimétabolites (AraC, AZT, ddC, etc.) susceptibles d'être incorporés *via* cette ADN polymérase dans l'ADN tumoral (figure 4 E, F) plutôt que de molécules type cis-platine qui, nous l'avons noté, sont moins toxiques vis-à-vis des cellules considérées.

Au-delà de ces aspects de diagnostic et de prévention de l'instabilité génétique dépendante de l'ADN polymérase β , le

caractère particulier de cette enzyme, capable par exemple d'incorporer efficacement des analogues structuraux nucléotidiques dans l'ADN synthétisé type AZT [10], nous a conduits à proposer son utilisation en tant qu'«ADN médicament». Surexprimée grâce à une vectorisation adéquate dans des cellules tumorales, Pol β peut alors être considéré comme le produit d'un gène «suicide» d'un type nouveau, capable de transformer un composé atoxique comme l'AZT en un produit très toxique une fois incorporé dans l'ADN cible [10]. Ce concept a été breveté récemment par le Cnrs [14]. Il s'agit, en fait, de mettre à profit les activités délétères, «désorganisatrices», de cette enzyme afin de détruire certains types de tumeurs dans lesquelles la concentration endogène de Pol β est normale, c'est-à-dire faible.

En conclusion, nous pensons avoir mis en évidence un événement génétique gouvernant le désordre génétique de certaines lignées tumorales. Nous proposons que ce désordre soit responsable de l'émergence de formes cellu-

lares variantes capables de s'affranchir des contraintes endogènes ou exogènes s'opposant à la progression tumorale. Nos études actuelles visent à comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires liés à ce phénomène, mais aussi à rechercher les moyens pharmacologiques capables d'inhiber l'action de Pol β afin de ralentir l'instabilité génétique tumorale. Nous avons ainsi conçu au laboratoire des modèles murins transgéniques exprimant fortement Pol β afin de tenter de résoudre ces problématiques ■

Remerciements

Nous remercions le Comité départemental (Haute-Garonne) de la ligue nationale contre le cancer pour sa participation au financement de nos travaux.

RÉFÉRENCES

- Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 1991; 51: 3075-9.
- Sirover MA, Loeb LA. Erroneous base-pairing induced by a chemical carcinogen during DNA synthesis. *Cancer Res* 1974; 252: 414-6.
- Hoffmann JS, Cazaux C. DNA synthesis, mismatch repair, and cancer. *Int J Oncology* 1998; 12: 377-82.
- Mao EF, Lane L, Lee J, Miller JH. Proliferation of mutators in A cell population. *J Bacteriol* 1997; 179: 17-22.
- Jiricny J. Mismatch repair and cancer. *Cancer Surveys* 1996; 28: 47-68.
- Thomas G. Dix ans de recherche sur les prédispositions génétiques au développement des tumeurs. *Med Sci* 1995; 11: 336-48.
- Canitrot Y, Lautier D, Laurent G, Fréchet M, Ahmed A, Thurán AG, Salles B, Cazaux C, Hoffmann JS. Mutator phenotype of BCR-ABL transfected Ba/F3 cell lines and its association with enhanced expression of DNA polymerase beta. *Oncogene* 1999 (sous presse).
- Dantzer F, de Murcia G. Quelles sont les ADN polymérases requises dans la réplication et la réparation de l'ADN chez les eucaryotes? *Med Sci* 1998; 14: 704-12.
- Kunkel TA. The mutational specificity of DNA polymerase-beta during *in vitro* DNA synthesis. Production of frameshift, base substitution, and deletion mutations. *J Biol Chem* 1985; 260: 5787-96.
- Bouayadi K, Hoffmann JS, Fons P, Tiraby M, Reynes JP, Cazaux C. Overexpression of DNA polymerase β sensitizes mammalian cells to 2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Cancer Res* 1997; 57: 110-6.

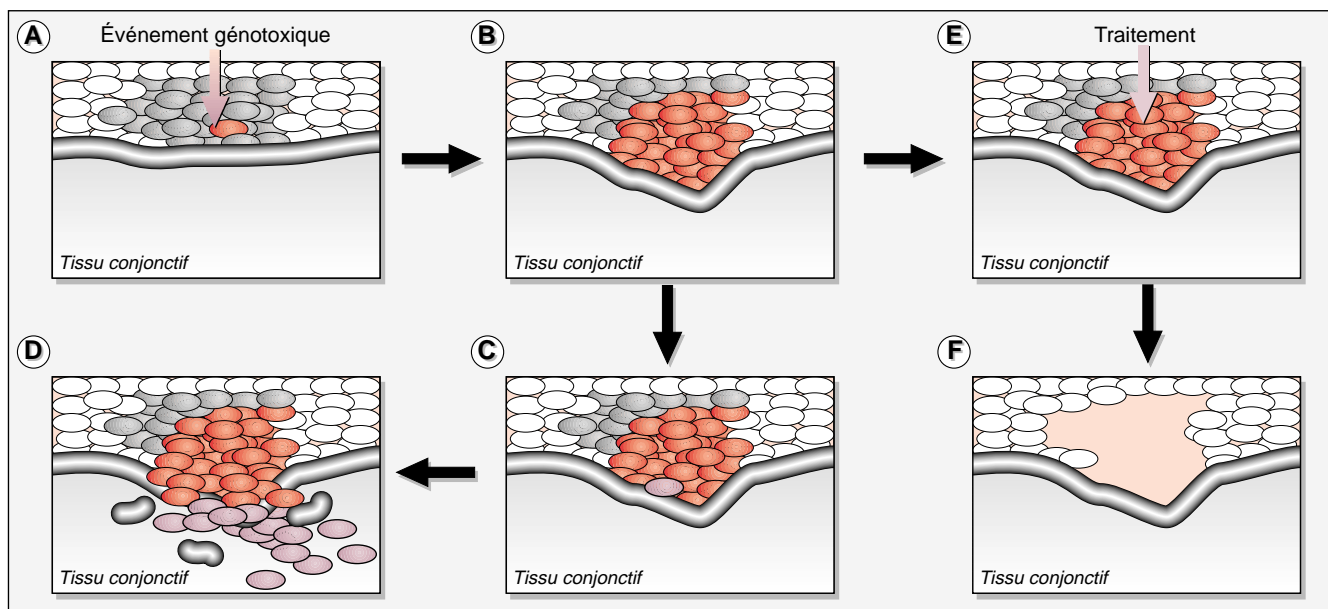


Figure 4. **Rôle supposé de l'ADN polymérase β dans le processus de cancérogenèse et de l'expansion clonale (A-D).** Cellules blanches: cellules saines; cellules grises: cellules surexprimant Pol β (donc à fort potentiel mutateur); cellules rouges: cellules variantes à fort pouvoir clonal; cellules bistres: cellules vivantes invasives. **A-D.** un événement génotoxique (spontané ou provoqué par la thérapie) (A) donne lieu à une prolifération clonale (B); l'émergence d'une cellule invasive (C) conduit à l'envahissement du tissu conjonctif environnant (D). La surexpression du gène pol β pourrait jouer un rôle d'accélérateur de l'instabilité génétique spécifique des cellules cancéreuses. **Stratégie thérapeutique visant à éliminer les cellules tumorales surexprimant Pol β (E-F).** Le traitement par des molécules de la famille des antimétabolites (E) susceptibles d'être incorporées par l'ADN polymérase β dans l'ADN tumoral devrait permettre la guérison (F).

RÉFÉRENCES

11. Zmudzka BZ, Fornace AJ, Collins J, Wilson SH. Characterization of DNA polymerase beta mRNA: cell-cycle and growth response in cultured human cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 9589-96.

12. Canitrot Y/Cazaux C (équiv. contrib.), Fréchet M, Bouayadi K, Lesca C, Salles B, Hoffmann JS. Overexpression of DNA polymerase beta in cell results in a mutator phenotype and a decreased sensitivity to anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 12586-90.

13. Loeb L. Communication personnelle au congrès de l'AAACR. Endogenous sources of mutations. Fort Myers: AACR, novembre 1998.

14. Hoffmann JS, Fons P, Tiraby G, Cazaux C. Utilisation d'un vecteur exprimant l'ADN polymérase beta comme médicament. *Brevet CNRS n° 9615343 (France) et FR9702274 (International)* 1996.

15. Capizzi RL, Jameson JW. A table for the estimation of the spontaneous mutation rate of cells in culture. *Mutat Res* 1973; 17: 147-8.

TIRÉS À PART

J.S. Hoffmann et C. Cazaux.

m/s n° 3, vol. 15, mars 99

Yvan Canitrot

Attaché temporaire d'enseignement et de recherche. Université Paul-Sabatier, Toulouse, France.

Mathilde Fréchet

Doctorante. Ministère de l'Éducation nationale, de la recherche et de la technologie.

Laurence Servant

Doctorante. Ministère de l'Éducation nationale, de la recherche et de la technologie.

Jean-Sébastien Hoffmann

Chargé de recherche Inserm. Équipe « Instabilité génétique et cancer », Institut de pharmacologie et de biologie structurale, Cnrs UPR 9062, 205, route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex 4, France.

Christophe Cazaux

Maître de conférences à l'Université Paul-Sabatier (Toulouse). Équipe « Instabilité génétique et cancer », Institut de pharmacologie et de biologie structurale, Cnrs UPR 9062, 205, route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex 4, France.