

125

**aspects  
de la  
recherche  
1985**

**université de paris-sud**

**ups**

# activation et inactivation des gènes, incidence en cancérologie

Les théories du cancer qui ont prévalu ces vingt dernières années ont à l'origine une double conception : il faut une ou plusieurs mutations des gènes pour provoquer le cancer et, seules des substances extrêmement proches, sinon identiques des substances cancérogènes (mutagènes), seraient à même de reconnaître les cellules cancéreuses et de les détruire. Sur la base de cette conception, la chimie de synthèse a connu un essor extraordinaire en cancérologie. Mais actuellement, force est de reconnaître que la presque totalité des substances utilisées en chimiothérapie des cancers est incapable de distinguer les cellules saines des cellules cancéreuses, est hautement toxique, diminue les défenses de l'organisme vis-à-vis des agresseurs exogènes. En outre, les méfaits causés aux gènes par les agents chimiques sont fréquents et variés et se traduisent par des maladies diverses et graves. Ainsi, par exemple, la littérature cite de plus en plus souvent des cas de leucémie induite par les traitements de la maladie de Hodgkin ; certains cancérologues ont pris récemment leurs distances face à la chimiothérapie classique. Ces mêmes théories ont incité toute une génération de chercheurs à procéder à l'analyse des séquences des gènes portés par les ADN des cellules saines et cancéreuses. Etudes laborieuses et coûteuses qui n'ont pas permis d'établir la corrélation espérée entre telle mutation et tel cancer.

Actuellement, la théorie des oncogènes semble bien admise. Les oncogènes sont des gènes trouvés dans les cellules cancéreuses et dans les cellules saines, intervenant dans la différenciation cellulaire, dans l'embryogenèse et au cours de la régénération des tissus. Lors d'un processus cancéreux, ces gènes seraient activés et joueraient un rôle déterminant dans la prolifération des cellules cancéreuses. Le bouleversement quantitatif intervenant lors de la cancérogenèse, favorisé et entretenu par la destabilisation des gènes, s'accompagne d'une déprogrammation des synthèses, d'où modifications qualitatives pouvant en outre être favorisées par des aléas au niveau de la structure primaire, aléas d'autant plus fréquents que l'ADN est relaxé.

Laboratoire de Pharmacologie, Centre d'Etudes Pharmaceutiques de Châtenay-Malabry.

## corrélation entre potentiel cancérogène des molécules, destabilisation des ADN cellulaires, synthèse *in vitro* des ADN et multiplication *in vivo* des cellules cancéreuses

De nombreux travaux scientifiques montrent que dans les tumeurs humaines, plusieurs oncogènes cellulaires sont exprimés ainsi que les gènes embryonnaires, leur activité étant dans la majorité des cas simplement supérieure à celle trouvée dans les cellules des tissus normaux. La synthèse d'une protéine, normale ou pas, impose au niveau du gène correspondant, qu'il y ait accès de l'ARN polymérase et copie du gène en ARN messager. Ce processus ne peut s'effectuer sans ouverture locale de la chaîne d'ADN.

Dans notre laboratoire, nous avons trouvé qu'il existe une différence entre les ADN (gènes) des cellules saines et les ADN des cellules cancéreuses ; cette différence porte essentiellement sur la structure secondaire des ADN et sur leur efficacité matricielle lors de la synthèse d'un nouvel ADN et surtout lors de la transcription en ARN messager. Les gènes des cellules cancéreuses s'expriment davantage, plus vite et plus complètement que les gènes correspondants des cellules normales, en raison d'une destabilisation (mesurable par plusieurs critères chimiques et physiques) des doubles liaisons hydrogènes unissant les deux brins de l'ADN. Cet état «relaxé» a été constaté sur plus d'une quinzaine d'ADN isolés de cellules cancéreuses (animales, humaines, végétales) alors que les

ADN des cellules saines sont stables (figures 1 et 2).

L'état destabilisé confère à ces ADN une fragilité et une «réceptivité» extraordinaire qui fait qu'en présence d'un très grand nombre de molécules chimiques (cancérogènes, antibiotiques, antimétabolites, colorants, pesticides, certains médi-

caments...) ou biologiques (hormones, peptides, acides nucléiques...) ces ADN se destabilisent encore davantage (figure 2) sans changement de structure primaire. La synthèse excessive d'une protéine exige le maintien séparé des deux brins de la chaîne d'ADN durant une période anormalement prolongée. Cependant, des chaînes d'ADN

REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DE L'OUVERTURE ET DE LA FERMETURE DES CHAINES D'ADN EN PRÉSENCE D'UN CANCÉROGÈNE.

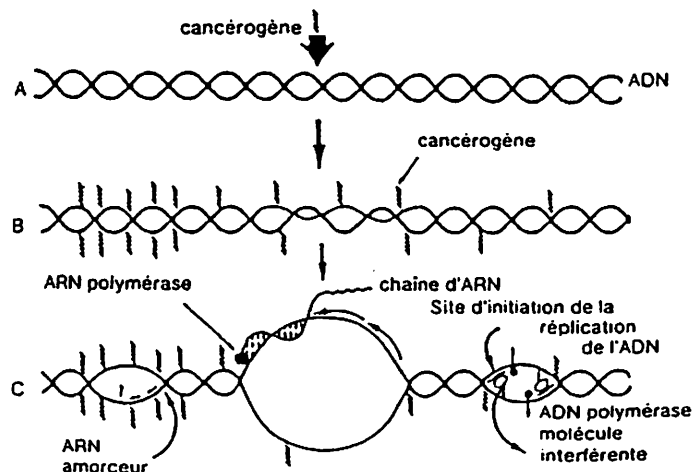
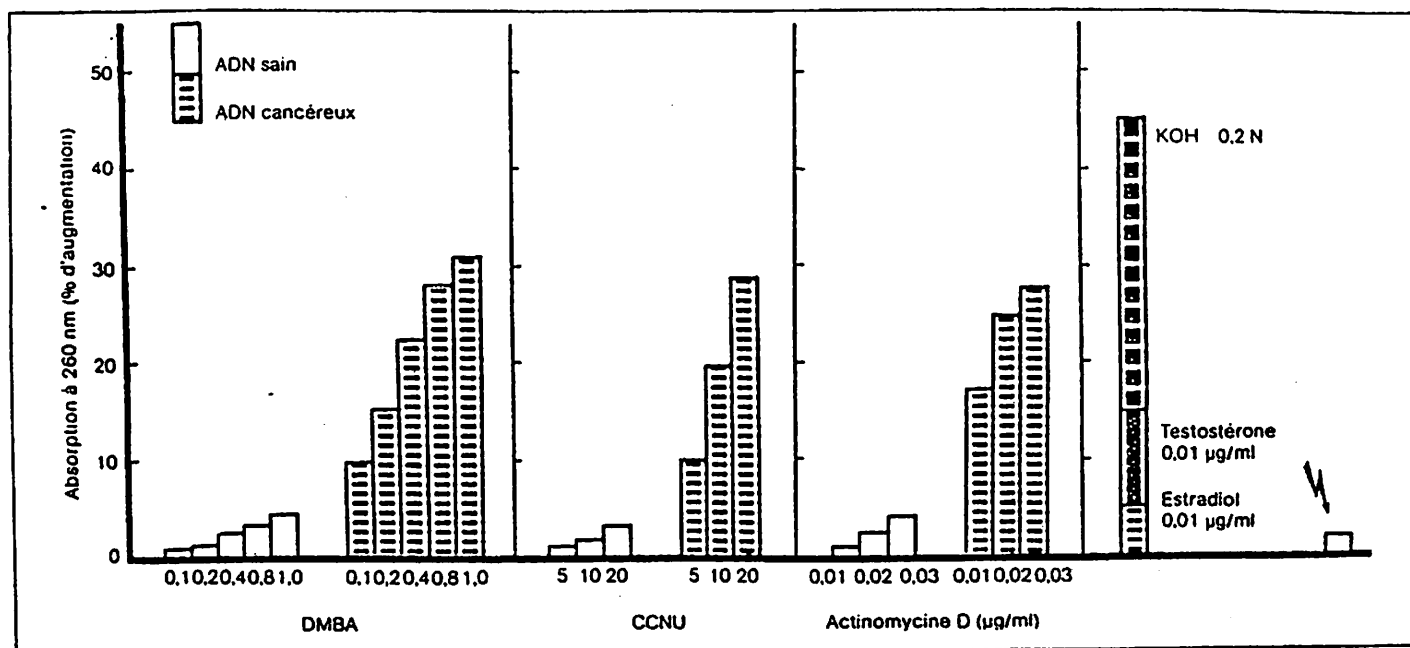


Figure 1



SÉPARATION DES CHAINES D'ADN ISOLÉS DE TISSUS SAINS ET CANCÉREUX SOUMIS À L'ACTION DE DIVERSES SUBSTANCES.

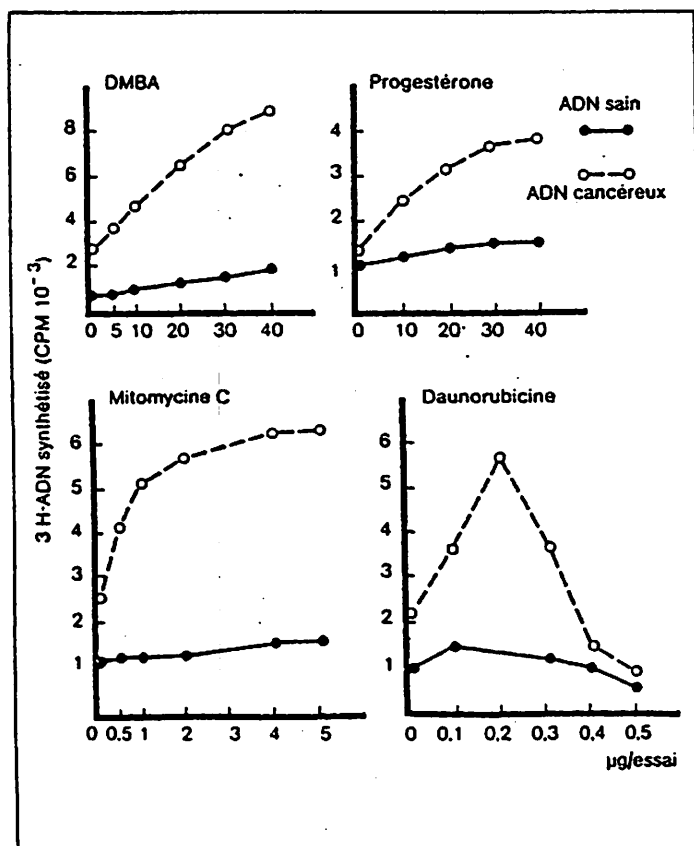
Figure 2 - La déstabilisation des liaisons hydrogènes reliant les deux brins des ADN a été évaluée par l'hyperchromicité des ADN. c'est-à-dire par mesure du coefficient d'extinction en ultra-violet (260 nm) de chaque ADN purifié mis en présence d'une substance exogène. Un ADN complètement « ouvert » en présence de KOH 0,2 N exprime une hyperchromicité d'environ 40-50 %. L'effet additif des substances est illustré.

Origine des ADN utilisés

ADN sain	ADN cancéreux	Substances exogènes étudiées
Cellules du foie de canard	Cellules ascitiques d'Ehrlich de la souris	Cancérogène DMBA* et antimétabolite CCNU**
Cellules du cerveau de singe	Cellules de neurocarcinome humain	Antibiotique Actinomycine D
Cellules du sein humain	Cellules du cancer du sein humain	Hormones estradiol et testostérone

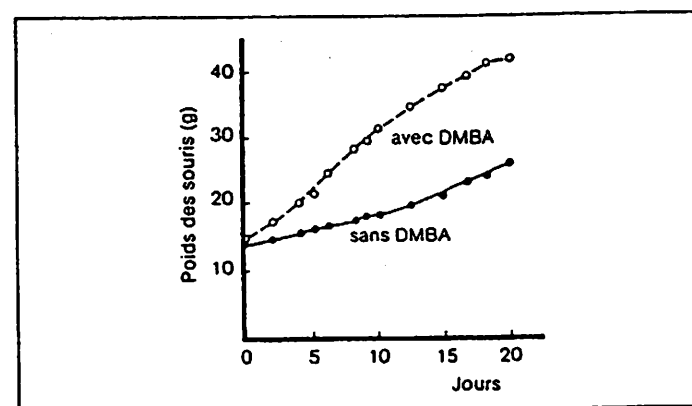
\*DMBA: 9,10-diméthylbenz(a)anthracène

\*\*CCNU: 1-(2-chloroéthyl)-3-cyclohexyl-1 nitroso-urée.



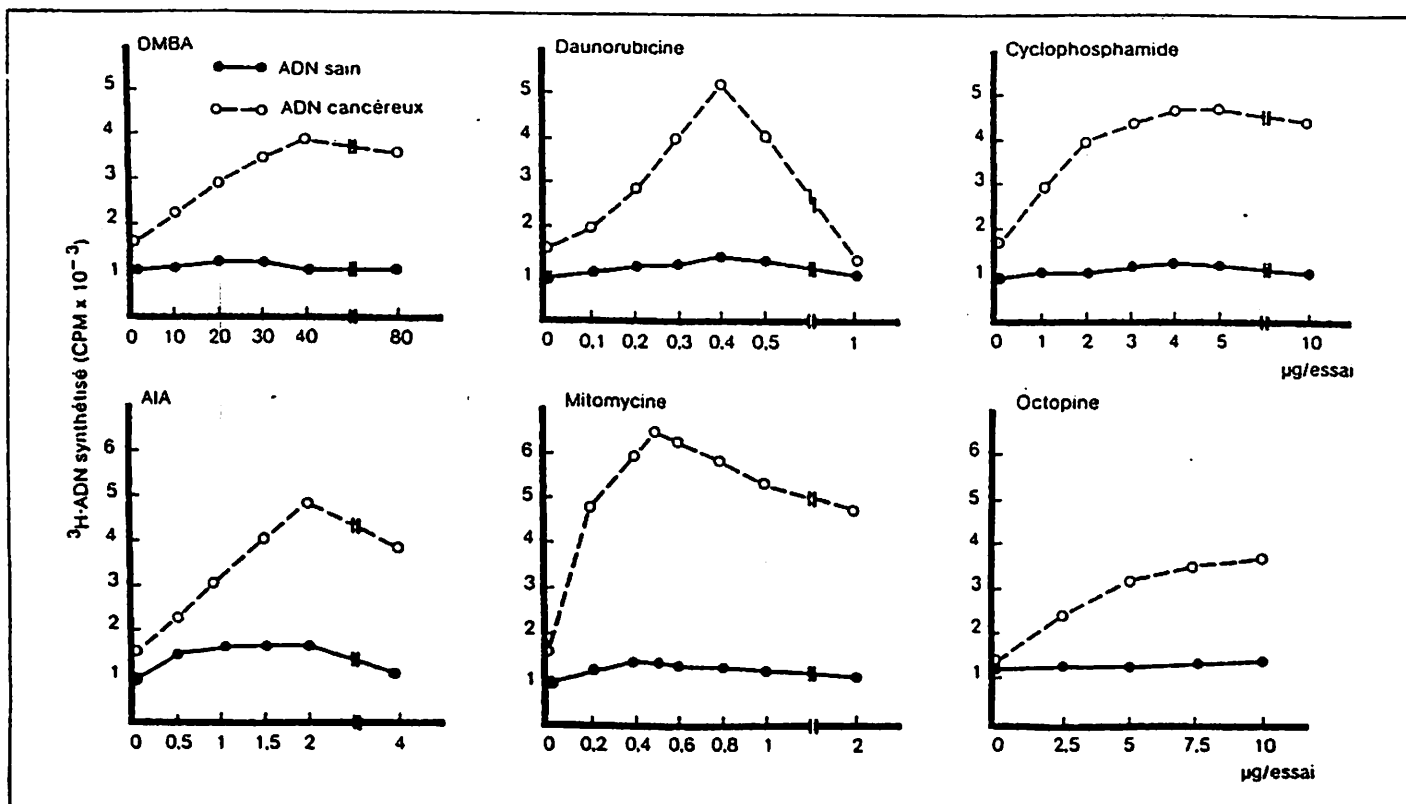
SYNTHÈSE *IN VITRO* D'ADN ISOLÉS ET PURIFIÉS DE TISSUS SAINS (TISSU NORMAL DE SEIN HUMAIN) ET CANCÉREUX (CANCER DU SEIN HUMAIN) EN PRÉSENCE DE DIVERSES SUBSTANCES.

Figure 3 - Sur l'ADN matrice (ADN matrice isolé de cellules saines ou ADN matrice isolé de cellules cancéreuses de tissus homologues), l'enzyme ADN polymérase, en présence des composés nécessaires à la synthèse dont 4 nucléoside-5'-triphosphates (l'un étant radioactif) synthétise un polymère radioactif acido-précipitable, c'est-à-dire un nouvel ADN copie de la matrice fournie. La figure montre que l'ADN d'origine cancéreuse, plus déstabilisé, est meilleure matrice que l'ADN sain et que sa synthèse est fortement stimulée par le DMBA (cancérogène), la progestérone (hormone), la mitomycine C (antibiotique), la daunorubicine (antimétabolite).



MULTIPLICATION *IN VIVO* DES CELLULES ASCITIQUES D'EHRLICH CHEZ LA SOURIS EN ABSENCE OU EN PRÉSENCE DE DMBA.

Figure 4 - L'effet du DMBA a été testé sur le développement tumoral des souris inoculées avec des cellules ascitiques d'Ehrlich. Un groupe de souris a reçu de faibles doses de DMBA par inoculation intra-musculaire pendant 5 jours consécutifs. Toutes les souris ont été pesées à intervalles réguliers. La figure montre que le poids moyen des souris traitées augmente plus rapidement que celui des témoins (sans DMBA). Il a été vérifié qu'au vingtième jour le poids moyen des tumeurs excisées chez les témoins était de 4,5 g ± 0,13 et que celui des tumeurs excisées chez les souris traitées avec DMBA était de 10,8 g ± 0,5. Des résultats similaires ont été obtenus avec le CCNU.

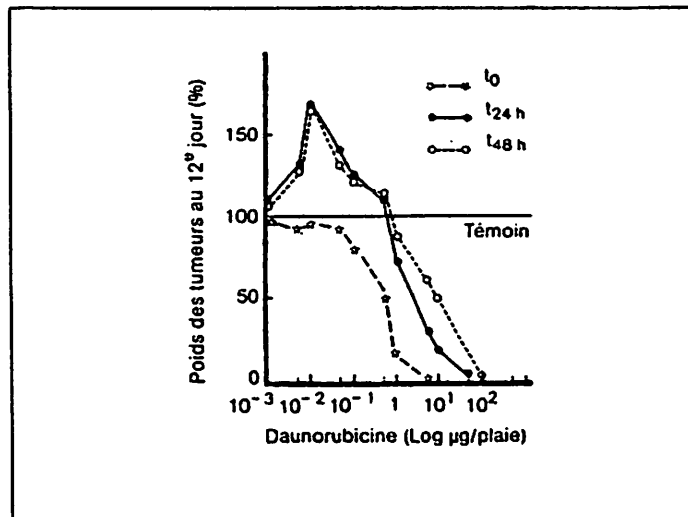


**SYNTHÈSE *IN VITRO* D'ADN ISOLÉS ET PURIFIÉS DE TISSUS SAINS ET CANCÉREUX DE PLANTES EN PRÉSENCE DE DIVERSES SUBSTANCES: CANCÉROGÈNE (DMBA), ANTIMITOTIQUES (DAUNORUBICINE ET CYCLOPHOSPHAMIDE) ANTIBIOTIQUE (MITOMYCINE C), HORMONE (AIA), OPINE (OCTOPINE).**

Figure 6 - Origine des ADN utilisés: tiges de pois sains et tumeurs de Crown-gall induites sur pois par *A. tumefaciens*. La technique expérimentale est identique à celle utilisée pour les tissus humains (voir figure 3).

**STIMULATION DE LA MULTIPLICATION *IN VIVO* DES CELLULES DE CROWN-GALL EN PRÉSENCE DE DAUNORUBICINE (ANTIMITOTIQUE À POTENTIEL CANCÉROGÈNE).**

Figure 7 - On a testé de même la cyclophosphamide, le DMBA, l'AIA et l'octopine. Les diverses substances ont été introduites dans les tumeurs de pois après scarification légère des tissus à des temps variés après l'infection bactérienne (24 ou 48 h après les bactéries; dans certains cas en même temps que les bactéries (To)). Au 12<sup>e</sup> jour, les tumeurs ont été excisées et leurs poids comparés à ceux des tumeurs témoins non traitées. A faibles concentrations, ces substances agissent comme oncostimulants (l'absence de cellules « transformées » au moment de l'induction explique la non action des substances à To). A concentrations élevées elles présentent un fort effet inhibant mais sans dommage apparent sur la croissance des plantes.



## corrélation entre potentiel anticancéreux restabilisation des ADN cellulaires et arrêt de la synthèse *in vitro* de ces ADN

La compréhension d'un mécanisme biologique au niveau de la réplication et transcription de l'ADN donne des armes pour le combattre. Le fait même que tous les cancérogènes (la concentration est importante) destabilisent les ADN - peu mais de façon cependant perceptible les ADN des cellules saines et très vigoureuse-

ment les ADN destabilisés (cellules anergiques, précancéreuses ou cancéreuses) - laissait à penser qu'il existerait des molécules qui, en se fixant sélectivement aux portions non appariées des ADN destabilisés, s'opposeraient à ce déséquilibre; en maintenant une sorte de « lien » entre les deux brins de la chaîne, ces molécules soit favori-

seraient le retour vers un état d'équilibre normal, soit s'opposeraient par obstruction mécanique à l'expression de ces gènes. De nombreuses substances ont été testées à cet effet dans notre laboratoire, et parmi elles, quelques-unes se sont révélées être capables de s'opposer à l'ouverture excessive des chaînes d'ADN.

A la corrélation précédente: ouverture  $\longrightarrow$  forte accélération de la synthèse d'ADN et synthèse abondante mais anarchique de protéines, nous trouvons, en présence de ces substances, une autre corrélation: inhibition de l'ouverture des chaînes d'ADN  $\longrightarrow$  normalisation

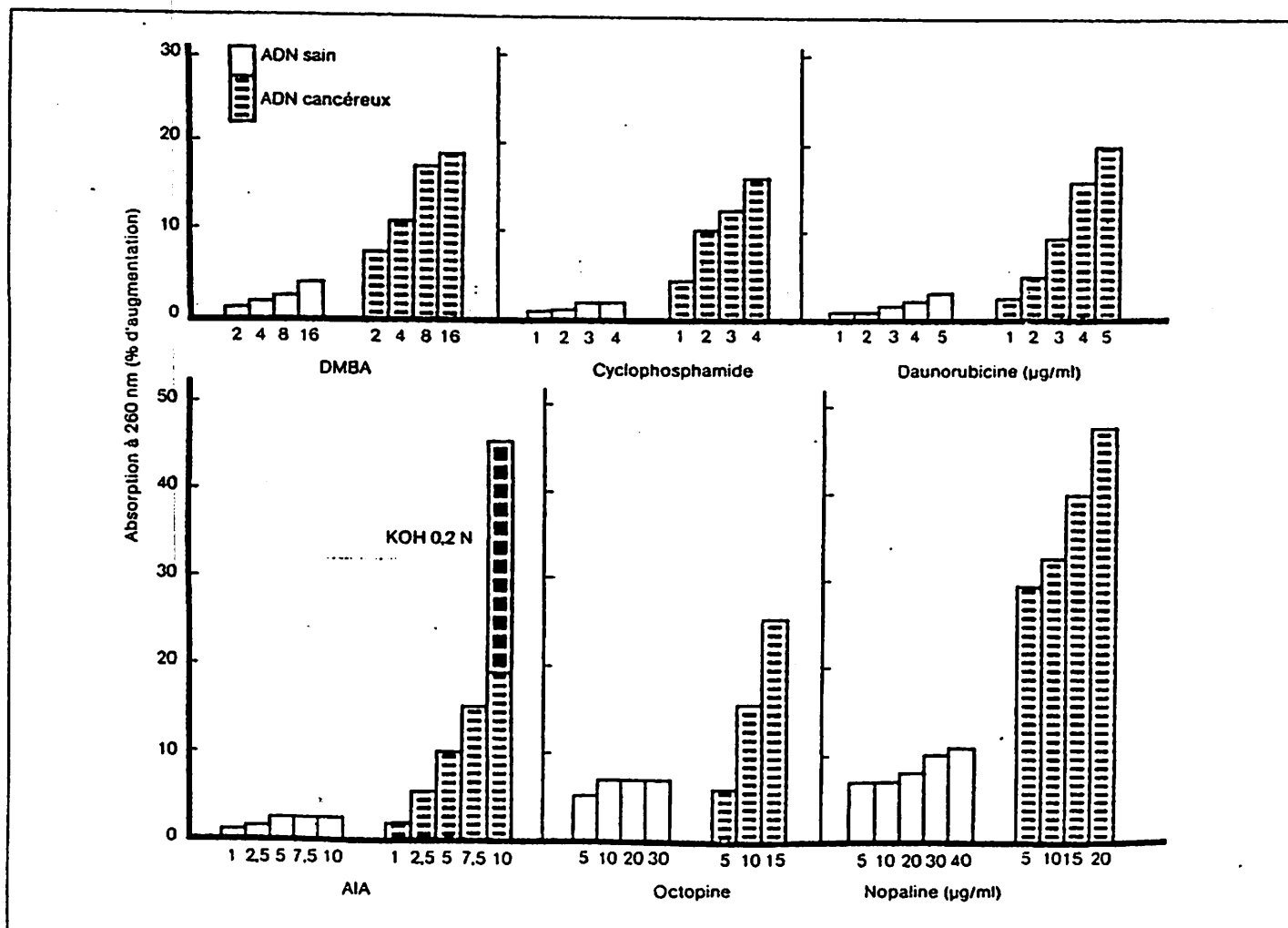
devenues trop éloignées l'une de l'autre subissent facilement des cassures et fixent davantage certaines molécules que les chaînes en double hélice, favorisant d'éventuels changements de structures, les brins dépareillés étant, on le sait, beaucoup plus vulnérables à l'action des multiples molécules endogènes et exogènes. Ainsi, les nucléases et divers agents chimiques sont alors susceptibles d'introduire des cassures, des délétions (migration d'un segment de gène qui se perd ou qui migre sur un autre chromosome) et des mutations peuvent survenir.

L'amplification d'activité de certains gènes, lors de la destabilisation locale de l'ADN, est limitée par les gènes voisins. En amont ou en aval du gène « ouvert » se produisent des tensions, des étirements, se traduisant ici par l'amplification de l'expression de tel gène, là par une réduction d'expression de tel autre gène. Trop ouverts, les

gènes ne fonctionnent plus de façon coordonnée avec les divers éléments de la cellule. Pour une ouverture locale des chaînes d'ADN, il y a parfaite corrélation entre l'action d'un cancérigène sur l'ouverture des ADN (mesurée par l'hyperchromicité) (figure 2), la capacité de ces ADN à synthétiser un nouvel ADN, première étape de la réplication cellulaire (figure 3), et la quantité du produit synthétisé avec pour corrélaire une forte accélération de la multiplication du nombre des cellules cancéreuses en présence du cancérigène (figure 4).

Ce qui est vrai dans le monde animal l'est également dans le règne végétal. Là aussi se retrouve la corrélation entre la destabilisation de la double chaîne d'ADN, le fonctionnement des gènes et la cancérisation des plantes. Les tumeurs de crown-gall, causées chez certains végétaux par une bactérie du sol *Agrobacterium tumefaciens*, possèdent un ADN relaxé sous

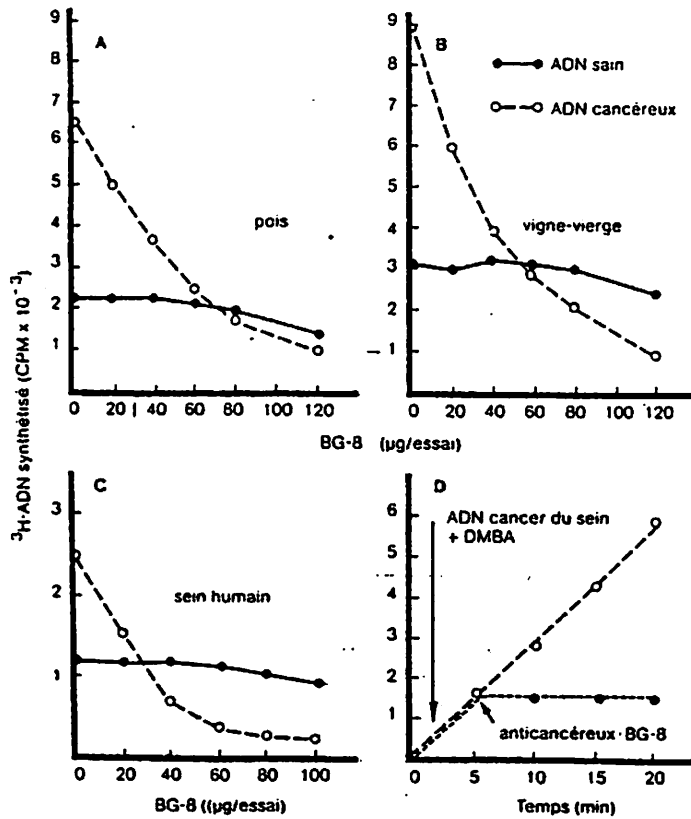
l'influence de diverses molécules (cancérogènes, antimétabolites, auxine (hormone spécifiquement végétale), opines (métabolites anormalement synthétisés dans ces tumeurs) se destabilise encore davantage (figure 5) accélérant alors le processus de synthèse *in vitro* d'ADN (figure 6) et de multiplication *in vivo* des cellules tumorales (figures 7). Sous l'influence des auxines, les tissus sains en culture peuvent acquérir certaines caractéristiques des tissus tumoraux, comme la synthèse d'opines et notamment la perte de dépendance à l'égard des substances de croissances exogènes habituellement requises. Ces tissus sont dits « anergisés ». Le comportement *in vitro* de leur ADN est intermédiaire entre celui du tissu de crown-gall et du tissu sain dont il semble se différencier progressivement sous l'action répétitive et cumulative de l'hormone.



EFFETS DE DIVERSES SUBSTANCES SUR LA SÉPARATION DES CHAINES DES ADN SAINS ET CANCEREUX DES TISSUS DE PLANTES.

Figure 5 - Origine des ADN utilisés : tiges de pois sains et tumeurs de crown-gall induites sur pois par une bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. L'hyperchromicité des ADN purifiés a été évaluée en présence d'un cancérigène (DMBA), d'antimétabolites utilisés en chimiothérapie humaine (daunorubicine, cyclophosphamide), d'une hormone végétale (acide indole-3-acétique = AIA) ou d'opines (octopine ou nopaline, substances spécifiques trouvées en quantité abondante dans les tumeurs provoquées sur des plantes sensibles par les bactéries *A. tumefaciens*). Il y a peu ou pas d'augmentation dans l'absorption en U.V. de l'ADN sain incubé en présence de ces différentes substances alors que les chaînes de l'ADN de crown-gall s'ouvrent d'autant plus que la concentration en produits testés est plus importante. (KOH correspond à une ouverture totale de l'ADN).

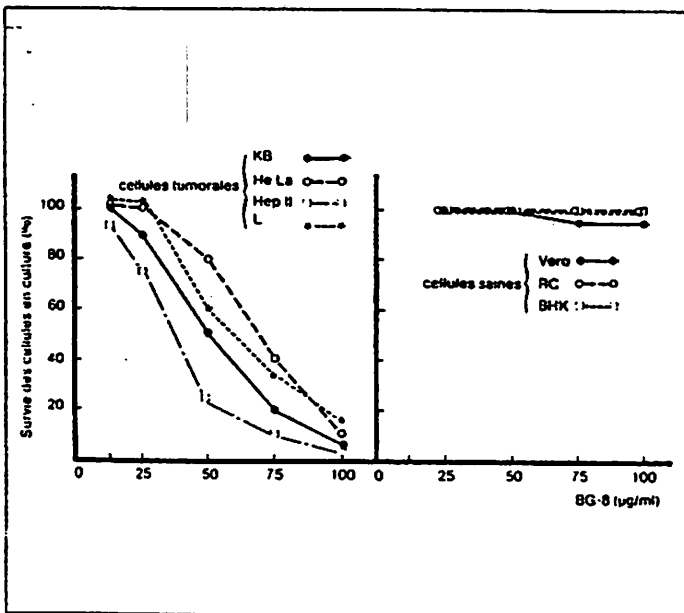
Figure 5 - Origine des ADN utilisés : tiges de pois sains et tumeurs de crown-gall induites sur pois par une bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. L'hyperchromicité des ADN purifiés a été évaluée en présence d'un cancérigène (DMBA), d'antimétabolites utilisés en chimiothérapie humaine (daunorubicine, cyclophosphamide), d'une hormone végétale (acide indole-3-acétique = AIA) ou d'opines (octopine ou nopaline, substances spécifiques trouvées en quantité abondante dans les tumeurs provoquées sur des plantes sensibles par les bactéries *A. tumefaciens*). Il y a peu ou pas d'augmentation dans l'absorption en U.V. de l'ADN sain incubé en présence de ces différentes substances alors que les chaînes de l'ADN de crown-gall s'ouvrent d'autant plus que la concentration en produits testés est plus importante. (KOH correspond à une ouverture totale de l'ADN).



**SYNTHÈSE *IN VITRO* D'ADN ISOLÉS ET PURIFIÉS DE TISSUS SAINS ET CANCÉREUX EN PRÉSENCE D'UNE SUBSTANCE SPÉCIFIQUEMENT ANTICANCÉREUSE (BG-8).**

Figure 8 - Origine des ADN utilisés :

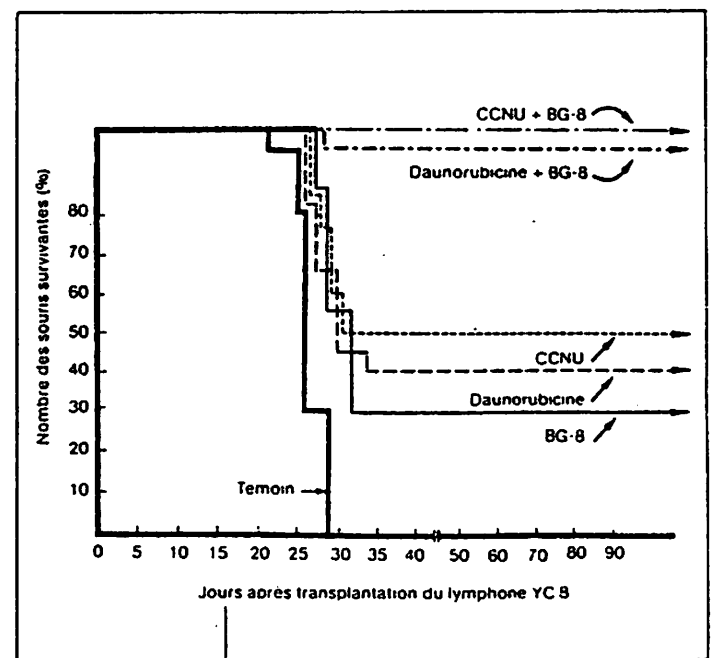
A: ADN de plante, tige de pois sain et tumeur de crown-gall.  
 B: ADN de tissus végétaux (vigne-vierge) entretenus *in vitro*, tissu sain et tissu de crown-gall.  
 C: ADN du sein, normal et cancéreux.  
 D: ADN du cancer du sein incubé en présence de DMBA seul ou de DMBA associé au BG-8.  
 Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites figure 3. On ajoute en plus au milieu d'incubation une substance, BG-8, isolée dans notre laboratoire, en concentrations croissantes. Cette substance se fixe sélectivement sur les seuls ADN cancéreux (zones déstabilisées) et bloque leur répllication. La figure 8 D montre que même en présence d'un cancérogène (DMBA), lui-même stimulant la synthèse *in vitro* des ADN déstabilisés (voir figures 3 et 6), l'anticancéreux BG-8 bloque la répllication de l'ADN et ne permet plus au cancérogène d'exercer son action.



**POURCENTAGE DE SURVIE DE DIFFÉRENTES LIGNÉES CELLULAIRES BIEN ÉTABLIES, SAINES ET TUMORALES, CULTIVÉES *IN VITRO*, ET TRAITÉES PAR UN ANTICANCÉREUX SPÉCIFIQUE (BG-8).**

Figure 9 - Lignées normales: Véro (rein de singe), RC (cornée de lapin) et BHK (rein de jeune hamster). Lignées cancéreuses humaines: KB, Hela et Hep II; L: clone isolé de cellules BHK.

Les cellules ont été maintenues en culture aseptique. Des concentrations croissantes de BG-8 ont été ajoutées aux milieux de culture en même temps que l'inoculum (ou bien 3 jours après l'inoculation selon les expériences). Les cellules non détruites ont été comptées chaque jour pendant 14 jours et leur viabilité contrôlée par injection à des souris spécifiquement réceptives (souris nude).

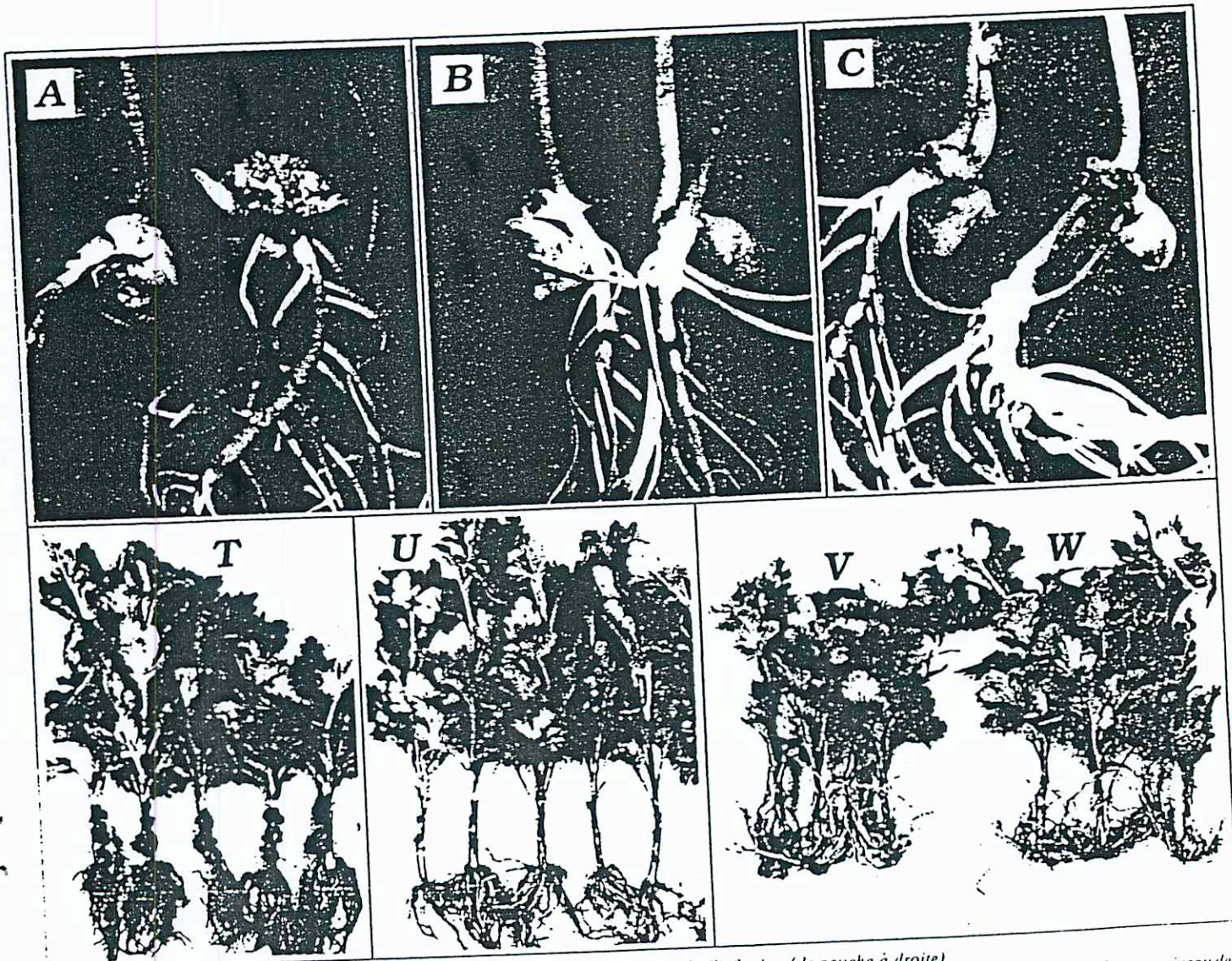
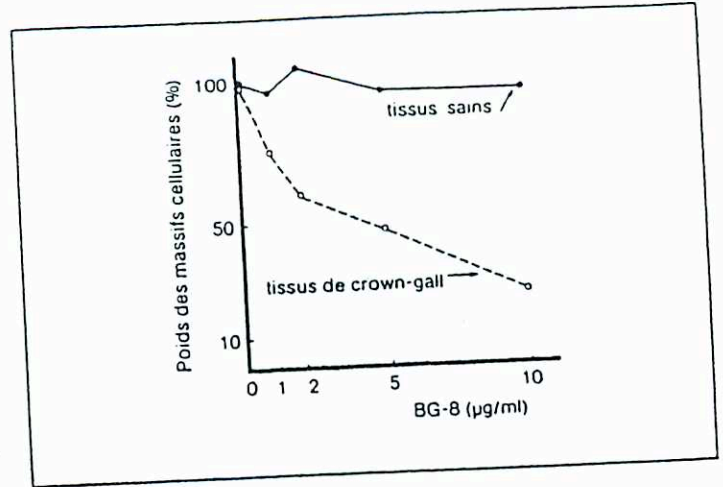


**SURVIE DES SOURIS PORTEUSES DU CANCER LYMPHOME YC8 APRÈS TRAITEMENT PAR BG-8 SEUL OU ASSOCIÉ À UN ANTIMITOTIQUE (DAUNORUBICINE OU CCNU).**

Figure 10 - 120 souris ont été inoculées avec des cellules cancéreuses (lymphome YC 8) par injection intrapéritonéale. Un groupe de 20 souris a servi de contrôle tandis que les autres ont été traitées deux fois par jour par BG-8 (200  $\mu\text{g} \times 2$ ), par la daunorubicine (10  $\mu\text{g} \times 2$ ), ou par le CCNU (200  $\mu\text{g} \times 2$ ) soit utilisés chacun séparément soit utilisés en association (groupes de 20 souris). Les souris survivantes ont été chaque jour comptées et pesées, ceci pendant 26 jours. Seules celles qui ont survécu en excellentes conditions 90 jours après la mort des témoins ont été considérées comme guéries.

**EFFETS DE BG-8 SUR LA CROISSANCE DE MASSIFS CELLULAIRES DE VIGNE-VIERGE SAINS ET CANCEREUX MAINTENUS EN CULTURE *IN VITRO*.**

Figure 11 - Les tissus de vigne-vierge ont été entretenus aseptiquement sur un milieu de culture adéquat (sels minéraux plus éléments organiques) en présence (tissus sains) ou en absence (tissus de crown-gall) d'hormones dont l'A.A. Les colonies tissulaires cultivées en milieu liquide agité ont été mises en présence de BG-8 à différentes concentrations (à l'exception des fioles témoins) pendant 15 jours. Chaque condition comporte 15 échantillons. On détermine le poids de matière sèche par fiole au début de l'expérience (les tissus sont séchés pendant 3 jours à l'étuve à 50° C). Au bout de 15 jours on détermine le poids de matière sèche des tissus de chaque fiole et on en soustrait le poids initial moyen. L'accroissement pour chaque condition étudiée est calculé et exprimé en pourcentage par rapport au témoin non traité.



**DÉVELOPPEMENT DES TUMEURS DE CROWN-GALL EN ABSENCE OU EN PRÉSENCE DE SUBSTANCE ANTICANCÉREUSE (BG-8).**

Figure 12  
A : à droite, tumeur témoin induite sur pois par *A. tumefaciens*; à gauche, plante non inoculée.  
B et C : plaies infectées par *A. tumefaciens* et traitées par BG-8 (25 µg) aux temps 0 (au moment de l'infection par les bactéries), 24 heures, 4 à 8 jours

après l'infection (de gauche à droite).  
T, U, V et W : Tumeurs de crown-gall induites sur chrysanthèmes au niveau des tiges (T et U) par inoculation des bactéries et au niveau des racines (V et W) par immersion des jeunes plantes dans une suspension bactérienne. Trois jours après l'infection les plantes ont été enlevées du sol, immergées dans l'eau (T et V) ou dans une solution aqueuse de BG-8 (2 mg/ml pendant 6 heures) (U et W), puis replantées dans les mêmes pots. Photos prises à 12 jours pour les pois, à 30 jours pour les chrysanthèmes.

du taux de synthèse d'ADN ou forte inhibition de la réplication (figure 8). Cette corrélation inverse est également valable pour les cellules des mammifères (humains compris) et des végétaux.

### que se passe-t-il *in situ*

- Sur les cellules de mammifères en culture *in vitro*, l'effet anticancéreux de ces substances, sans effet toxique sur les cellules saines, a été démontré (figure 9).
- Chez les animaux de laboratoire, ces substances ont été testées avec beaucoup de succès dans plusieurs types de cancers greffables et les animaux guéris ne souffrent d'aucun effet secondaire toxique (figure 10). Ces résultats peuvent être encore améliorés si l'on associe ce traitement à une légère chimiothérapie (5-fluorouracile ou daunorubicine ou CCNU en doses faibles) (ou une légère radiothérapie), le but étant de favoriser ainsi la destabilisation des ADN et donc la fixation sur ces zones fragiles de notre substance.
- Chez les humains, dans plusieurs types de cancers, ces substances, associées à une chimiothérapie ou une radiothérapie allé-

gée, se sont révélées très actives, mais les résultats ne sont pas encore publiés.

- Chez les plantes, la croissance de massifs cellulaires de tissus de crown-gall cultivés *in vitro* est fortement inhibée par ces substances alors que celles des tissus sains n'est pas affectée (figure 11). Ces mêmes substances inhibent considérablement le développement *in vivo* des tumeurs de crown-gall sans aucun effet néfaste sur la croissance de la plante (figure 12).

En présence de ces substances spécifiquement anticancéreuses, la fermeture des chaînes d'ADN, observée *in vitro*, correspond à un arrêt de la synthèse *in vitro* de l'ADN et à une inhibition de la multiplication des cellules cancéreuses *in vivo*. Dans le cadre de cet article nous ne pouvons ni entrer dans le détail ni citer plus amplement les exemples et renvoyons le lecteur intéressé au livre\* exposant la théorie, sommairement résumée ici, de l'activation ou inactivation des gènes en présence de molécules-clés.

### conclusion

Sous l'influence de molécules endogènes ou exogènes il est possible de moduler l'ouverture et la fermeture des chaînes

d'ADN. Ce processus correspond en fait à une activation ou inactivation de l'expression des gènes. Lors de la cancérisation, il se produit une activation excessive et permanente de certains gènes avec synthèses surabondantes de certaines protéines. Les zones dépareillées sont alors le siège de fixation de molécules diverses, souvent dangereuses et de cassures. Inversement, la fixation sur ces zones élargies de molécules spécifiques capables de maintenir une certaine cohésion et le ressèment des chaînes conduit à une inactivation de l'expression de ces gènes avec pour conséquence musellement du phénomène cancer.

Ce processus se trouve ainsi mieux cerné dans le cadre du mécanisme biochimique de l'expression des gènes, outre l'importance bien évidente de disposer de molécules capables d'inactiver sélectivement les cellules cancéreuses sans toxicité pour les cellules normales. ■

\*M. Beljanski. *The regulation of DNA replication and transcription. The role of trigger molecules in normal and malignant gene expression. Experimental biology and medicine. vol. 8. Ed. A. Wolsky, Karger 1983.*

M. Beljanski  
L. Le Goff  
M. S. Beljanski  
M. Plawecki

Service de Pharmacodynamie  
Faculté de Pharmacie  
Châtenay-Malabry  
92290