



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

DB 127119



THESE

PRESENTE DEVANT L'UNIVERSITE DE METZ

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Mention : Sciences de la vie

Intitulé : Toxicologie de l'Environnement

par

Aléodjrodo EDORH

EXPRESSION D'ONCOGENES ET TUMEURS MAMMAIRES : ETUDE CLINIQUE ET DEVELOPPEMENT D'UN MODELE DE SOURIS TRANSGENIQUES POUR v-Ha-ras EN TOXICOLOGIE

Après avis des rapporteurs :

- E. E. CREPPY : Professeur, Université de Bordeaux II
- A. LE FAOU : Professeur, Faculté de Médecine, U H P-Nancy I

Soutenue le 03 avril 1996 devant la Commission d'examen

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv	1996 0165
Cote	S/M3 96/8
Loc	Magasin

- P. VASSEUR, Professeur, Université de Metz : Présidente du Jury
- E. E. CREPPY : Professeur, Université de Bordeaux II : Rapporteur
- A. LE FAOU : Professeur, Faculté de Médecine, U H P Nancy I : Rapporteur
- F. GUILLEMIN : Professeur, Faculté de Médecine, U H P-Nancy I : Juge
- R. M. PARACHE : Docteur en Médecine, Centre Alexis Vautrin, Vandoeuvre-lès-Nancy :
Directeur de recherche
- B. RIHN : Docteur en Médecine et en Sciences, Institut National de Recherche et de
Sécurité, Vandoeuvre-lès-Nancy : Directeur de recherche

à mon père et à ma mère
mon infinie reconnaissance
pour leur sacrifice et dévouement
à Dirk, Steeve, Rajiv, Ronald-Marvin
à toute ma famille

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques et au laboratoire de recherche en oncologie du Centre Alexis Vautrin (CAV, Vandoeuvre-lès-Nancy-France) ainsi qu'au Laboratoire de cancérogenèse de l'Institut National de Recherche et Sécurité (INRS, Vandoeuvre-lès-Nancy-France).

Je tiens à remercier Mr le Docteur Bertrand RIHN, responsable du service de Cancérogenèse *in vivo* à l'Institut National de Recherche et Sécurité. Mr RIHN, vous avez fait preuve d'une patience infinie en acceptant de m'initier aux multiples techniques, souvent lourdes exigées par ce travail. Votre participation active et complémentaire quotidienne depuis plusieurs années ainsi que votre disponibilité m'ont permis de bénéficier de votre expérience et de vos nombreux conseils. Que toute votre équipe de recherche en soit également remerciée.

Mr le Docteur Michel R. PARACHE, en réalisant une partie de mon travail dans votre laboratoire, vous m'avez offert la possibilité d'aborder un sujet riche en enseignements. Soyez-en vivement remercié ainsi que tout le personnel du service d'Anatomie et de Cytologie Pathologique du Centre Alexis Vautrin.

Je remercie Mme le Docteur Agnès LEROUX-BROUSSIER, Mme le Docteur Colette MIGEON et Mme le Docteur Brigitte N'SOSSANI pour leurs précieux conseils.

J'exprime ma sincère gratitude à Mr le Docteur MERLIN, responsable du laboratoire de recherche en oncologie du CAV sans oublier toute l'équipe de recherche du CAV.

Je suis infiniment reconnaissant à Mme le Professeur Paule VASSEUR depuis le début de m'avoir soutenu et d'avoir accepté la présidence de ce jury.

Je remercie chaleureusement Mr le Professeur Edmond E. CREPPY pour ses conseils et ses critiques constructives. Je lui dois en grande partie mon attirance pour la toxicologie et je le remercie d'avoir bien voulu faire partie de ce jury.

Monsieur le Professeur Alain LE FAOU m'a ouvert les portes de son laboratoire depuis plusieurs années et a accepté de juger ce travail. Qu'il trouve ici ainsi que le personnel de son service l'expression de ma très grande reconnaissance.

Mes remerciements vont également à Mlle CATELLE pour tous ses aides et conseils.

La disponibilité de Mr le Professeur François GUILLEMIN ne m'a jamais fait défaut. Sa présence en tant que Directeur de la Recherche au CAV m'a été très bénéfique. Qu'il trouve ici ma profonde reconnaissance.

Je tiens également à remercier Mr le Professeur Pierre BEY, directeur du CAV, d'avoir accepté que mes travaux de recherche soient réalisés au Centre Alexis Vautrin.

J'exprime ma gratitude à la Ligue nationale contre le cancer (Comité de la Moselle) qui a financé mes travaux de recherche.

En outre, je suis reconnaissant à Mr le Professeur G. DIRHEIMER de m'avoir accepté pour un stage à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg.

Je remercie Mr G. KEITH, directeur de recherche (IBMC, Strasbourg) pour sa grande patience et ses compétences. Je lui dois mes connaissances de la technique de post-marquage.

Je remercie Mme le Docteur N. MARTINET (INSERM : U 14, Vandoeuvre) pour sa disponibilité et ses conseils.

Je suis reconnaissant à Mme FENDRICH et à Mme REYNIER pour leurs précieuses aides au cours de la réalisation de ce mémoire.

Mes remerciements s'adressent également à tout le personnel du CAV pour leur sympathie.

Je suis très reconnaissant à la Soeur MARIE-JEAN, à toutes les Soeurs Clarisses et au Père Maurice POUPARD pour tous leurs encouragements et aides.

Enfin ma gratitude à tous ceux qui me sont chers et qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

INTRODUCTION GENERALE

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques et au laboratoire de recherche en oncologie du Centre Alexis Vautrin (CAV, Vandoeuvre-lès-Nancy-France) ainsi qu'au Laboratoire de cancérogenèse de l'Institut National de Recherche et Sécurité (INRS, Vandoeuvre-lès-Nancy-France).

Avec cette double opportunité, nous avons tenté de montrer des modifications de l'expression des oncogènes et/ou les modifications des oncoprotéines induites par l'action des toxiques sur des souris ou dans les tumeurs de sein. En plus nous avons analysé l'implication de ces modifications dans la pathogenèse des tumeurs.

En utilisant les outils de la biologie moléculaire de mutagenèse et de cancérogenèse, notre objectif était : (i) d'apporter des éléments diagnostiques et pronostiques dans les cancers mammaires de la femme, (ii) de mieux comprendre les mécanismes de mutagenèse et de cancérogenèse et d'indiquer s'ils sont en cause dans la toxicité *in vivo* du butoxyéthanol, appartenant à la famille des éthers de glycol à l'aide du modèle des souris transgéniques *v-Ha-ras* .

PREMIERE PARTIE

LE CANCER DU SEIN

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LE CANCER DU SEIN

1. Position du problème

Toute prolifération désordonnée des cellules ou tissus peut aboutir à la constitution d'une tumeur. Quand une cellule se divise de façon anormale mais demeure néanmoins fonctionnellement et structurellement proche de la cellule normale, elle entraîne la formation d'une "tumeur bénigne" refoulant les tissus environnants, sans les envahir. Ces tumeurs bénignes peuvent prendre des proportions importantes. Leur ablation chirurgicale assure en général, la guérison du patient. En revanche, si les cellules se divisent de façon anarchique et acquièrent la capacité d'envahir des tissus voisins, de migrer en d'autres sites du corps (formation de métastases), elles se multiplient en détruisant l'architecture tissulaire et finalement la fonction de l'organe envahi, elles sont appelées "tumeurs malignes" ou cancers.

Les cancers peuvent apparaître dans la plupart des tissus, en reproduisant en général de façon plus ou moins bonne la structure tissulaire où ils ont pris naissance. Selon l'origine des cellules dont ils sont issus, ils sont classés en différentes catégories dont les principales sont : les carcinomes, de structure épithéliale, les sarcomes nés des tissus de soutien (os, muscles, vaisseaux sanguins, tissu conjonctif...) et les leucémies et lymphomes qui sont des cancers des lignées hématopoiétiques et lymphoïdes.

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme. Une femme sur dix en est atteinte dans les pays développés (Wooster et Stratton, 1995). Il s'agit essentiellement de carcinomes, nés de l'épithélium glandulaire mammaire. L'incidence

du cancer du sein est particulièrement élevée en Europe de l'Ouest, en Amérique du Nord, en Australie où elle représente 20 à 30 % de tous les cancers observés chez les femmes (Parkin et coll., 1988). En revanche, l'incidence la plus faible est observée au Japon (10,3 %), dans la plupart des pays en voie de développement, en Europe de l'Est et en Asie (Adami et coll., 1990). Dans ces régions à taux faible de cancers du sein, l'incidence de ces cancers progressent de manière régulière de 15 ans à 50 ans, âge à partir duquel un plateau est observé (Ellman, 1987). Dans tous les pays l'incidence du cancer du sein augmente. Celle-ci peut être partiellement imputée à une augmentation de la durée moyenne de vie, ainsi qu'à une détection plus précoce des tumeurs (Blot et coll., 1987). Pourtant le cancer du sein reste une des causes principales de mortalité chez la femme dans les pays développés, spécialement parmi les femmes de moins de 45 ans.

1.1. Glande mammaire

La glande mammaire est une glande exocrine, dérivé ectodermique apparenté aux glandes annexielles cutanées. Sa fonction est de sécréter le lait permettant de nourrir les nouveaux nés. Chaque glande mammaire est constituée d'une vingtaine de lobes indépendants séparés par un tissu conjonctif dense. Chaque lobe possède un canal excréteur distinct s'ouvrant individuellement au mamelon. Chaque lobe est formé de lobules, constituant les unités sécrétrices, soutenues par un abondant tissu conjonctif. La structure histologique des glandes mammaires varie avec le sexe, l'âge et l'état physiologique.

1.1.1. Développement

La glande mammaire apparaît chez l'embryon humain de quelques semaines sous la forme d'un épaissement épidermique constituant initialement la crête mammaire, puis l'ébauche mammaire. Cette ébauche mammaire de forme sphérique comporte des bourgeons épithéliaux d'abord pleins puis creux, qui vont se multiplier et croître progressivement vers le tissu conjonctif pour devenir les canaux mammaires.

Chez les hommes, la glande mammaire reste à ce stade rudimentaire. Chez les femmes, à la puberté, l'augmentation de la sécrétion hormonale ovarienne va induire une prolifération des canaux galactophores avec constitution de formations tubulo-acineuses à leurs extrémités et accumulation de tissu adipeux intra et interlobulaire provoquant une augmentation du volume mammaire.

1.1.2. Microanatomie - histologie

Chez la femme adulte, chaque lobe est constitué de canaux galactophores ramifiés avec à proximité de l'orifice mamelonnaire une zone de dilatation à contours sinueux correspondant au sinus lactifère (Figure 1). Ces canaux se divisent progressivement, du revêtement cutané jusqu'à la profondeur du sein, pour constituer des canaux de moyen et petit calibre et aboutir à l'unité terminale ducto-lobulaire (UTDL).

L'UTDL comporte des canaux extra- et intralobulaires qui se terminent par les *acini* ; ces *acini* sont fonctionnels essentiellement pendant la grossesse et la lactation. On sait maintenant (Wellings, 1975) que la plupart des lésions mammaires bénignes ou malignes prennent naissance dans ces UTDL (Figure 2).

L'ensemble du réseau glandulaire est tapissé d'un revêtement épithélial cubo-cylindrique associé à une couche discontinue de cellules myoépithéliales, reposant par l'intermédiaire d'une membrane basale sur un fin réseau conjonctif.

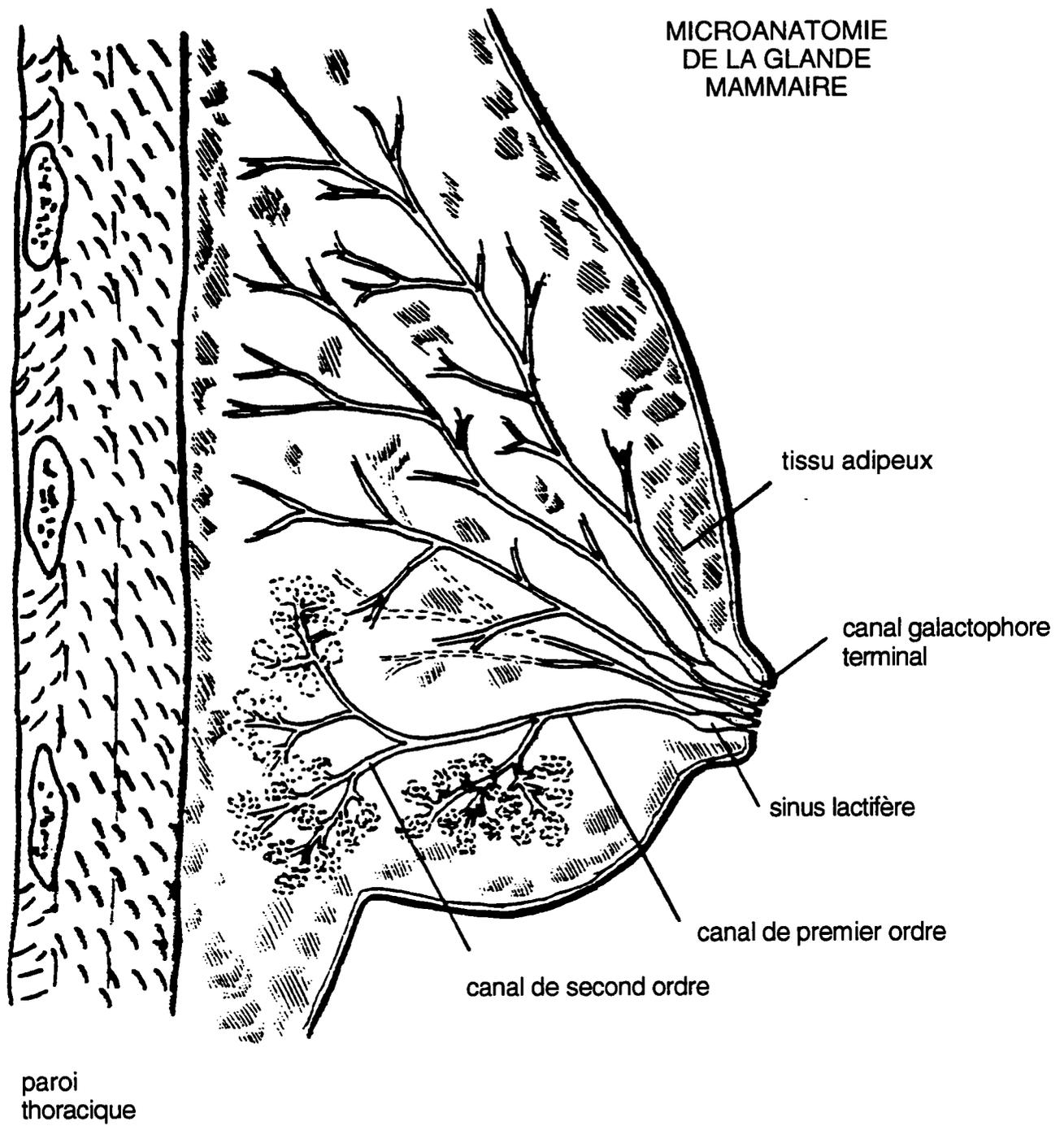


Figure 1 : Microanatomie de la glande mammaire (Gonçalves, Histologie. Edition Piccin 1987, p. 516).

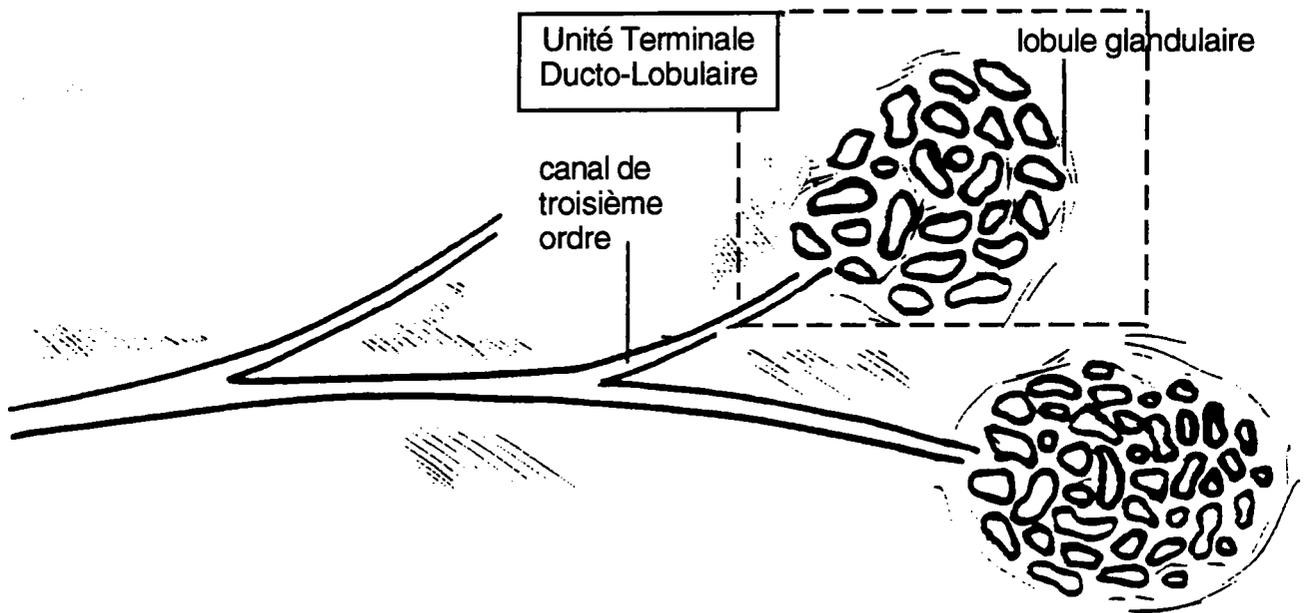


Figure 2 : Unité Terminale Ducto-Lobulaire.

1.1.3. Histophysiologie

Au cours du cycle menstruel, en dehors de la grossesse, il existe de discrètes modifications, minimales mais constantes, de la structure histologique de la glande liées aux variations du climat hormonal.

Pendant la grossesse, la glande mammaire atteint son développement maximal avec mise en place du tissu sécrétoire proprement dit. Sous l'influence des hormones de grossesse, il existe une importante prolifération des canaux galactophoriques, formation active de tubes et alvéoles sécréteurs et raréfaction du tissu conjonctif et adipeux. La

sécrétion lactée n'apparaît véritablement qu'après la naissance de l'enfant. A l'arrêt de la lactation, il existe une involution naturelle du tissu sécrétoire et retour à la situation antérieure à la grossesse.

A la ménopause, l'involution glandulaire est plus marquée, caractérisée par une atrophie épithéliale avec épaissement des membranes basales et enrichissement du tissu conjonctif en adipocytes (Figure 3).

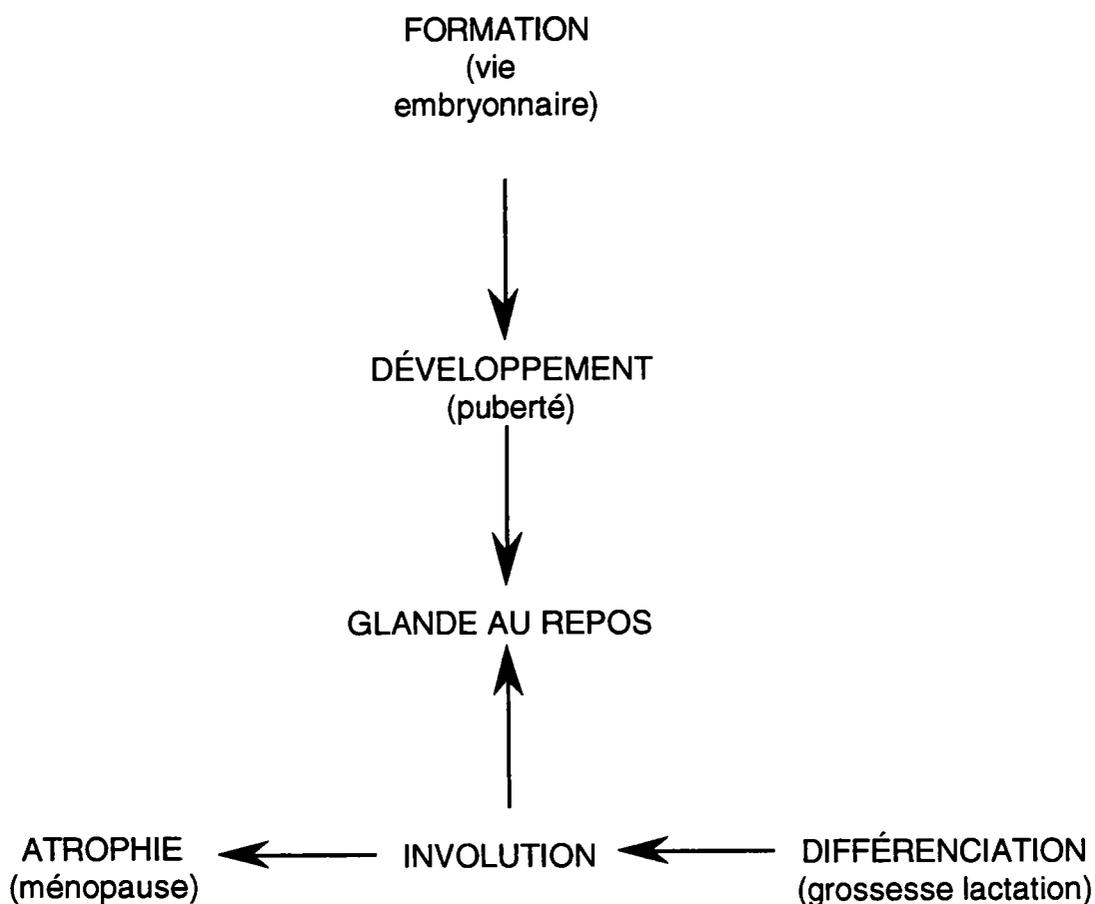


Figure 3 : Glande mammaire normale.

1.1.4. Glande mammaire normale

Le tissu mammaire subit des remaniements constants plus ou moins marqués, liés à différents facteurs tels que la réceptivité hormonale cellulaire, les conditions vasculaires locales, l'existence de discrets phénomènes inflammatoires.

Au point de vue histologique, ces remaniements variables dans le temps et dans l'espace, aboutissent à la juxtaposition de zones parenchymateuses hétérogènes. Cet aspect quasi-constant, avec de discrètes altérations histologiques ponctuelles, d'origine fonctionnelle est à distinguer des maladies dystrophiques plus évolutives, fréquemment associées à une prolifération excessive du tissu glandulaire, constituant un facteur de risque de développement d'un cancer.

1.1.5. Mastopathies bénignes

Le terme de mastopathie bénigne est peu précis. En pratique, il désigne les lésions bénignes du sein non inflammatoires, mal limitées à tendance diffuse, à l'exclusion en principe des tumeurs bénignes (fibroadénome, papillomes). Il s'applique essentiellement à la maladie fibrokystique (mastose ou dysplasie fibrokystique, maladie de Reclus...). Les maladies fibrokystiques englobent un ensemble de lésions très différentes dont certaines seulement constituent un facteur de risque de développement d'un cancer.

L'intrication de lésions élémentaires tels que fibrose, kystes glandulaires, adénose (hyperplasie des lobules) et hyperplasie épithéliale de type canalaire ou lobulaire aboutit à une formule histologique complexe de pronostic variable. Contesso et coll. (1994) ont montré que le principal facteur de risque de développement d'un cancer est l'hyperplasie épithéliale, les mastopathies bénignes peuvent être classées en trois groupes en risque de transformation néoplasique de plus en plus élevé (Mutter, 1986).

- Pas d'augmentation de risque (x 1)

Fibroadénome

Adénose, fibro-adénose

Galactophorite ectasiante

Métaplasie apocrine ou épidermoïde

Hyperplasie épithéliale modérée (> 2 à < 4 cel.),

- Risque faible (x 1.5 à 2)

Hyperplasie épithéliale modérée ou floride, sans atypie, solide ou papillaire

Cystadénome papillaire avec centre fibrovasculaire,

- Risque modéré (x 4 à 5)

Hyperplasie épithéliale avec atypie, canalaire ou lobulaire.

1.2. Le cancer du sein

1.2.1. Classification histologique

La classification histologique des cancers du sein tient compte de différents facteurs, à la fois descriptifs et histogénétiques. Elle a pour but de déterminer un traitement le plus adéquat possible.

La classification de l'OMS (Azzopardi, 1981) est basée sur l'origine tissulaire du cancer, sur son caractère infiltrant ou non, ainsi que sur une éventuelle différenciation morphologique particulière de la tumeur (Tableau 1). Les carcinomes, nés de l'épithélium mammaire représentent à eux seuls 98 % des cancers du sein. Les cancers d'autres origines (sarcome, lymphome,...), très rares, ne seront pas évoqués ici.

<u>Tumeurs non infiltrantes</u>	Carcinome intracanauxaire Carcinome lobulaire in situ
<u>Tumeurs infiltrantes</u>	Carcinome canalaire infiltrant Carcinome canalaire infiltrant avec composante intracanauxaire prédominante Carcinome lobulaire infiltrant Carcinome mucineux Carcinome médullaire Carcinome papillaire Carcinome tubuleux Carcinome adénoïde kystique Carcinome sécrétant (juvénile) Carcinome apocrine Carcinome métaplasique Autres
<u>Maladie de Paget du mamelon</u>	

Tableau 1 : Tumeurs mammaires malignes épithéliales (OMS 1981)

1.2.2. Histologie des carcinomes mammaires

Le caractère infiltrant ou non est une notion capitale dans le diagnostic de cancer du sein en raison de ses répercussions cliniques, thérapeutiques, et pronostiques.

1.2.2.1. Les formes non infiltrantes : Ces tumeurs sont caractérisées par une prolifération des cellules cancéreuses dans les lumières glandulaires ou canalauxaires, avec extension le long du système canalaire, sans infiltration de la membrane basale et du tissu conjonctif voisin. Le risque métastatique est donc en principe nul. Toutefois, l'absence d'envahissement du tissu conjonctif peut signifier seulement qu'il n'a pas su être démontré et n'exclut pas une microinvasion très focale. Le risque de récurrence et de survenue d'un cancer infiltrant sur une forme non infiltrante varie selon le type de lésions

intraépithéliales rencontrées. On distingue morphologiquement deux grands types de carcinomes non infiltrants :

- les carcinomes lobulaires *in situ* ou néoplasie intralobulaire, nés du lobule mammaire. Ces lésions sans traduction clinique sont de découverte fortuite, sur pièces opératoires.

- les carcinomes intracanalaires, d'architecture histologique variable, pouvant se traduire cliniquement par une lésion tumorale, un écoulement mamelonnaire ou des microcalcifications à la mammographie.

1.2.2.2. Les formes infiltrantes : Ces cancers sont caractérisés par l'existence d'une destruction de la membrane basale avec pénétration et invasion du tissu conjonctif avec risque d'effraction vasculaire, d'embolisation tumorale et de métastases à distance. Il existe une grande diversité histologique de carcinomes infiltrants (Tableau 1) : mucineux, papillaire, médullaire, tubuleux, adénoïde kystique, sécrétant, apocrine et métaplasique. Ces formes sont toutefois peu fréquentes représentant environ 20 % de l'ensemble des cancers du sein. Dix pour cent des cancers mammaires correspondent à des carcinomes lobulaires infiltrants (Figure 4).

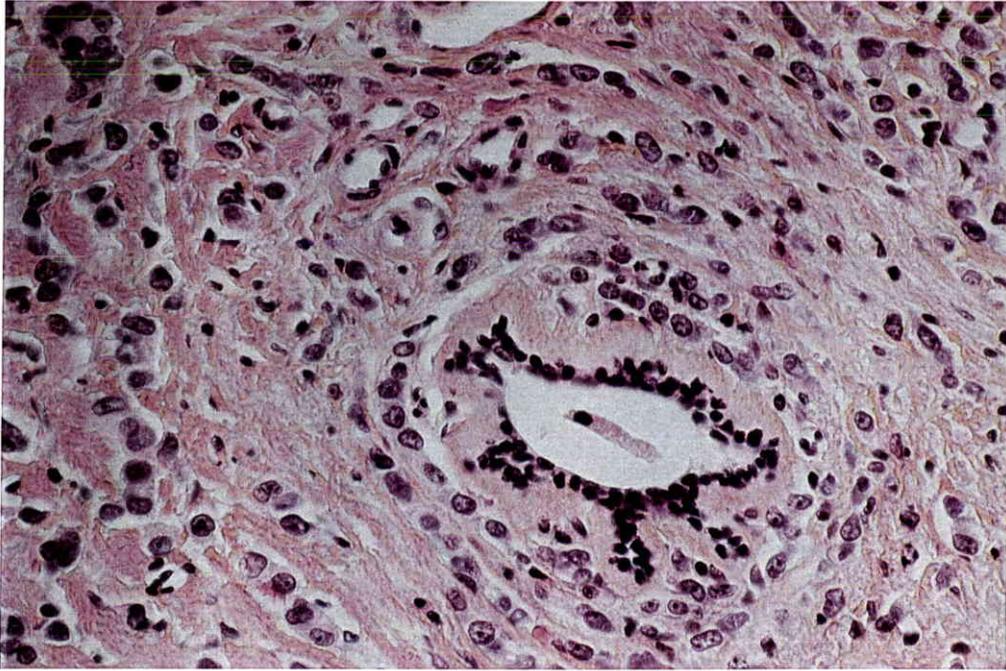


Figure 4 : Carcinome lobulaire infiltrant de grade I. Infiltration de petites cellules carcinomateuses peu atypiques isolées ou en file indienne autour d'un canal non tumoral (Gr. x 250).

Ces tumeurs sont constituées de cellules tumorales isolées parfois vacuolisées à disposition particulière en "file indienne", associées souvent à un aspect squirrheux du sein. Certaines formes composées du même type cellulaire mais où l'architecture est plus massive, trabéculaire voire même tubuleuse par endroits sont rattachées à ce groupe de tumeurs.

La grande majorité des cancers du sein (70 %) correspond au carcinome canalaire infiltrant sans autre indication (Figure 5), c'est-à-dire un carcinome infiltrant dont l'aspect cytologique et architectural bien qu'extrêmement variable d'un cas à l'autre ne permet pas de le rattacher à une des formes particulières précédemment citées. Macroscopiquement les contours tumoraux peuvent être nets ou circonscrits, ou irréguliers, étoilés avec spicules, ou mixtes. A l'examen microscopique, les cellules tumorales sont très polymorphes d'une tumeur à l'autre adoptant une architecture variable, en massifs, travées ou formations glanduliformes ou tubuleuses, associées

fréquemment à des foyers de carcinome intracanalair. En fonction de la capacité du cancer à former des structures carcinomateuses proches des glandes mammaires normales, on peut déterminer le degré de différenciation de la tumeur. Différents éléments traduisant le degré de différenciation: capacité à former des tubes, activité mitotique..., sont utilisés pour établir le *grading* histopronostique. Il existe différents systèmes de *grading* pour les cancers du sein (Scarff-Bloom-Richardson, Black, Harveit...). Le plus utilisé en France est celui de Scarff-Bloom-Richardson (Bloom et Richardson, 1957). Basé sur trois critères : capacité de la tumeur à former des tubes, degré d'anisocaryose et activité mitotique. Il aboutit à un score correspondant à 3 grades : grade I de pronostic favorable, grade II de pronostic intermédiaire et grade III de pronostic défavorable. Bien que critiqué de par son manque de reproductibilité et le manque d'objectivité dans l'établissement de certains critères, l'intérêt pronostique de ce *grading* est tout à fait admis.

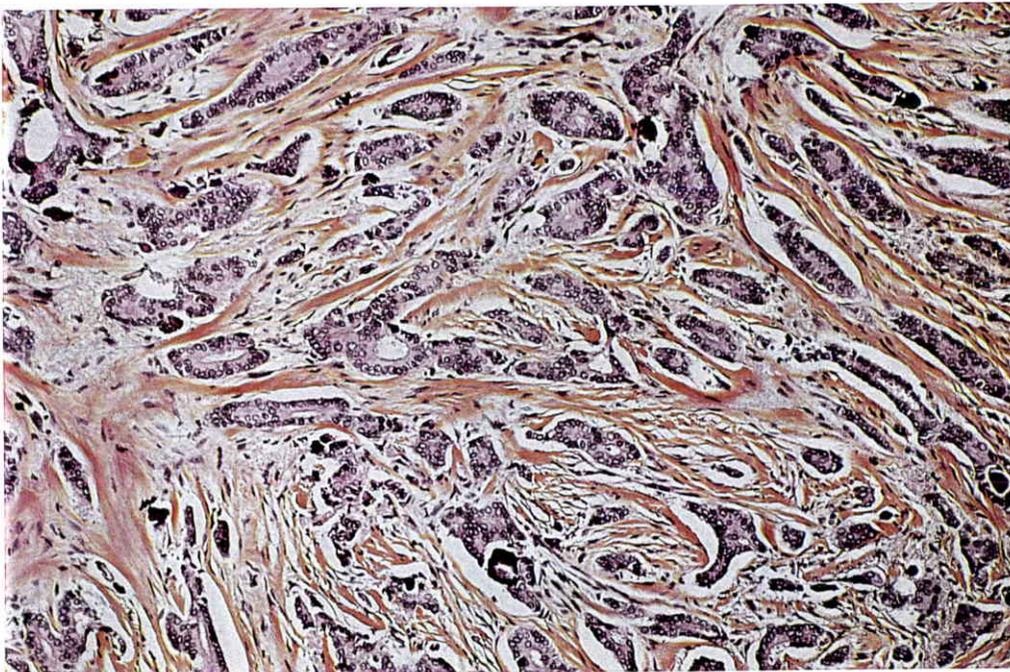


Figure 5 : Carcinome canalaire infiltrant de grade I. Prolifération irrégulière de structure tubuleuse avec quelques microcalcifications (Gr. x 100).

1.2.2.3. Maladie de Paget : La maladie de Paget représente moins de 2 % des lésions néoplasiques mammaires. Cliniquement, il s'agit d'une lésion eczématiforme du mamelon. Histologiquement l'épiderme est infiltré par des cellules carcinomateuses isolées ou non, sans invasion du derme sous jacent (Figure 6). Cette migration tumorale au sein de l'épiderme est généralement associée à un carcinome mammaire sous jacent infiltrant ou non.

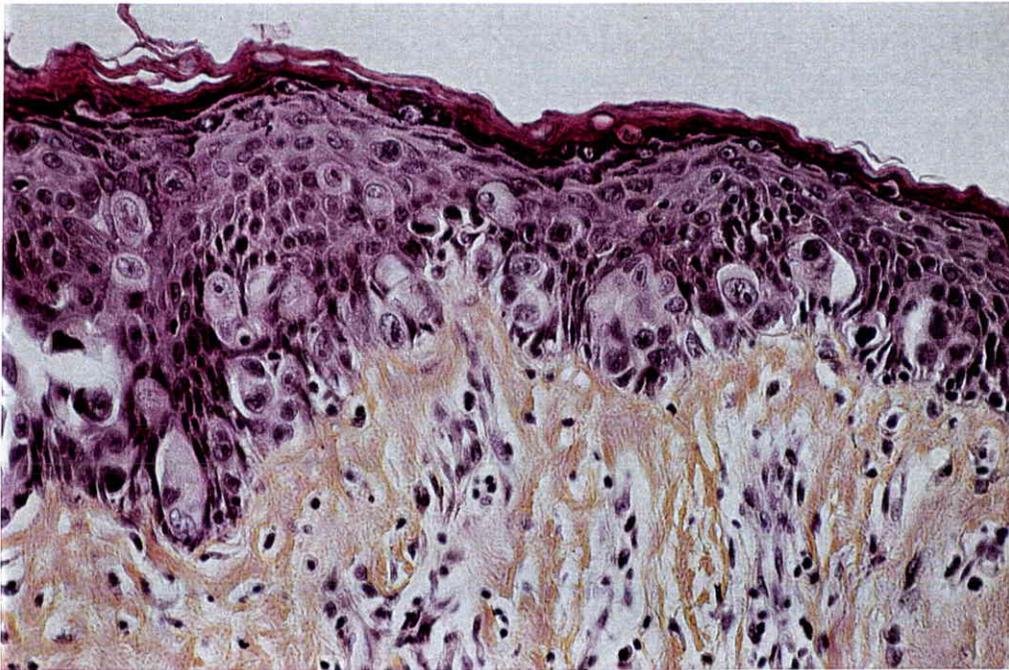


Figure 6 : Maladie de Paget du mamelon. Propagation intraépidermique des cellules carcinomateuses qui apparaissent plus volumineuses, à cytoplasme clair et à noyau atypique (Gr. x 250).

2. Les facteurs de risque

La survenue d'un phénomène de cancérisation de la glande mammaire est liée à des facteurs génétiques (facteurs familiaux), hormonaux, environnementaux et alimentaires.

2.1. Facteurs familiaux

Des mutations peuvent contribuer à la transformation maligne de la glande mammaire. La Figure 7 montre une liste partielle d'oncoprotéines et de protéines ayant

un rôle suppresseur de tumeurs pouvant être impliquées dans le cancer du sein. Le risque d'apparition du cancer du sein est 2 à 3 fois plus élevé si un collatéral de premier degré a déjà eu un cancer, et augmente avec le nombre de cancers observés dans la famille, surtout si ces cancers surviennent avant la ménopause (Anderson et Badzioch., 1986; Schneider et coll., 1986). Ces observations suggèrent par analogie avec d'autres tumeurs, comme le rétinoblastome ou la tumeur de Wilms, l'existence d'un gène responsable qui augmenterait le risque d'environ 100 fois chez les porteurs de ce gène. En effet, des remaniements chromosomiques sont mis en évidence, de manière récurrente, dans les cancers du sein et sont susceptibles de porter des gènes pouvant être modifiés, activés (oncogènes ou anti-oncogènes) voire même délétés (anti-oncogènes). On peut donc penser que l'étude des familles à risque devrait être dans ces cas très informative, comme l'a été l'étude de la délétion héritée d'un allèle de l'anti-oncogène *RB* et la mutation précoce de l'allèle restant, dans la survenue du rétinoblastome. Il a été établi une relation entre l'apparition précoce du cancer du sein chez 23 familles (146 cas de cancers du sein) et l'existence d'une translocation chromosomique 17q21 (Hall et coll., 1990). Le gène *BRCA-1*, (*Breast Cancer-1*) serait un gène de prédisposition aux cancers du sein. Depuis son clonage et son séquençage en 1994, 30 mutations et 19 polymorphismes ont été décrits. Un autre gène de prédisposition aux cancers du sein, le *BRCA-2* a été mis en évidence sur le chromosome 13q12-13 (Nowak, 1994). Les altérations de ces deux gènes sont associées à des types de cancers différents. Par exemple, les altérations de *BRCA-1* sont associées également à un plus haut risque de cancer de l'ovaire que ne le sont les mutations de *BRCA-2*. Une femme portant une copie défectueuse de *BRCA-1* a 85 % de risque de développer un cancer avant l'âge de 65 ans. Les mutations de *BRCA-1* représentent entre 80 et 90 % des altérations dues à la fois au cancer du sein et au cancer de l'ovaire et seulement 50 % chez les familles atteintes de cancer du sein uniquement. Le gène *BRCA-1* jouerait également un rôle dans certains cancers sporadiques (Hall et coll., 1990; Malkin et coll., 1990), mais cette notion est controversée. En revanche, les familles dans lesquelles le cancer du sein est dû à

l'altération du gène *BRCA-2* incluent aussi des cas de cancer mammaire chez l'homme, ce qui n'est pas vrai pour les familles chez qui on a observé uniquement l'altération du gène *BRCA-1* (O'Brien, 1994). Ces deux gènes (*BRCA-1* et *BRCA-2*) continuent par susciter un grand intérêt dans l'optique, peut-être possible de la mise au point d'un test permettant de les détecter précocément chez les familles à risque (Kuska, 1995). En plus de *BRCA-1*, le chromosome transloqué 17q21 contient plusieurs gènes qui pourraient être impliqués dans le développement du cancer mammaire tels : l'estradiol 17 β -déshydrogénase qui catalyse la conversion de l'estrone en estradiol, le gène *pS2* présente des similitudes avec des facteurs de croissance tels que les *insuline-like growth factors I* et *II*, le gène *c-erbB-2 (HER-2/neu)* qui code le facteur de croissance épidermique, le *NM 23*, un gène qui a les propriétés d'un gène antimétastatique, le *WNT-3*, homologue humain du gène activé par insertion rétrovirale dans les tumeurs mammaires de souris, le gène codant le *RAR- α* (récepteur de l'acide rétinoïque α), le gène codant la topoisomérase *II α* , impliquée dans la réparation de l'ADN, le gène de la prohibitine codant une protéine ayant un rôle suppresseur, le gène *p53*, anti-oncogène qui joue un rôle important dans l'apoptose ou mort cellulaire programmée, le gène *c-Ha-ras* connu surtout pour son rôle dans la tumorigenèse mammaire expérimentale chez la souris.

2.2. Facteurs hormonaux

La croissance et la différenciation de la glande mammaire normale sont étroitement régulées par les hormones stéroïdiennes (Lippman et Dickson, 1989). Certaines expériences à partir de modèles animaux suggèrent qu'un stimulus hormonal agirait comme un promoteur de tumeur pour induire une expansion clonale de cellules cancéreuses hormono-dépendantes, augmentant ainsi le risque de mutations qui favoriseraient une progression maligne. La précocité de la survenue de la menstruation, l'âge tardif de la première grossesse menée à terme (Adami et coll., 1990), la survenue tardive de la ménopause augmenteraient le risque du cancer du sein (Trichopoulos et

coll., 1972; Macmahon et Cole, 1972; Macmahon et coll., 1982). D'autres facteurs ont été évalués, comme la prise à long terme d'estro-progestatifs à visée contraceptive, mais n'ont pas été corrélés à une augmentation de l'incidence du cancer du sein.

Le rôle des estrogènes dans la prolifération des tumeurs est bien documenté, mais leur rôle dans la cancérogenèse mammaire reste mal connu. Dans des études épidémiologiques menées en Angleterre, il existerait une relation entre les taux d'estradiol libre, biologiquement actif, le taux de globuline transporteuse des hormones sexuelles et le risque d'apparition du cancer du sein. L'allaitement jouerait un rôle protecteur dans le cancer du sein (Layde et coll., 1989; Mactiernan et Thomas, 1986), mais cette notion n'est pas certaine (Adami et coll., 1990). Des récepteurs hormonaux joueraient également un rôle dans la survenue des cancers du sein. Green et coll. (1986) ont cloné le gène codant le récepteur des estrogènes et déterminé sa séquence, permettant ainsi l'élaboration d'anticorps monoclonaux capables de reconnaître la protéine composée de 595 acides aminés, ayant une masse moléculaire de 66 kDa. Il s'agit d'une protéine essentiellement nucléaire qui comporte un domaine de liaison-interaction avec l'ADN ou *DNA binding domain* capable après activation par liaison de l'estradiol, de déclencher la synthèse d'ARNm de protéines spécifiques. Le récepteur de l'estradiol présente une importante analogie de structure avec d'autres récepteurs nucléaires, dont les récepteurs de la progestérone, des glucocorticoïdes, des vitamines A, et D3, des hormones thyroïdiennes et avec un oncogène viral (*v-erbA*) responsable des leucémies aviaires. L'effet global de l'estradiol est une stimulation de la multiplication cellulaire des cellules cibles. La présence des récepteurs de l'estradiol (RO) et de la progestérone (RP) à la surface des cellules tumorales a des conséquences pronostiques et thérapeutiques : le groupe des patientes RO+ a un pronostic spontanément plus favorable que celui des patientes RO-. D'autre part, les patientes RO+ sont sensibles aux traitements hormonaux, et en particulier à l'action des médicaments anti-estrogènes non stéroïdiens tels que le triphényléthylène et le tamoxifène. Ces médicaments qui se lient au récepteur, empêchent la liaison de l'estradiol et bloquent ses effets, agissant comme des compétiteurs irréversibles.

2.3. Facteurs environnementaux

Les radiations sont des facteurs de risque de cancer du sein. Une fréquence élevée du cancer du sein a été observée chez les personnes (spécialement chez les enfants et les adolescentes) qui ont survécu aux bombardements atomiques au Japon (Tokunaga et coll., 1982) et chez les femmes ayant subi des traitements par les rayons X pour des lésions bénignes du sein (Modan et coll., 1989). Mais il existe également des différences liées à l'origine géographique. Par exemple l'incidence du cancer du sein est 6 fois plus importante en Hollande qu'au Japon. Par ailleurs, les immigrées japonaises aux USA de la première et de la deuxième génération ont des taux de cancers respectivement intermédiaires et égaux à ceux des américaines.

2.4. Facteurs alimentaires

Les facteurs diététiques (alimentation riche en lipides), obésité, grande taille, abus de l'alcool ont été également mis en cause. La consommation de viande et de graisse, surtout pendant la période prépubertaire, pourrait jouer un rôle important dans la survenue des tumeurs.

3. Les oncogènes

3.1. Introduction

Dans la cellule normale, la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire (contrôlées par des facteurs de croissance tant internes qu'externes), se fait en partie grâce à des activités biologiques localisées sur la membrane cellulaire, dans le cytosol et dans le noyau. Ces activités modulent en dernier ressort les taux d'ARNm intracellulaires qui contrôlent à leur tour le taux de certaines protéines nécessaires à l'initiation de la synthèse d'ADN. Néanmoins il apparaît clairement qu'un évènement génétique isolé n'est pas suffisant pour conduire à la malignité cellulaire (Alexander et coll., 1989; Vogelstein, 1989).

L'étude de la biologie des cancers a bénéficié d'un saut conceptuel grâce à la compréhension de la biologie moléculaire des virus transformants et particulièrement des rétrovirus. Au cours de leur cycle de réplication, le génome des rétrovirus s'intègre dans des séquences génétiques des cellules qu'ils parasitent. Ces rétrovirus peuvent capturer des séquences propres à l'hôte appelées proto-oncogènes et qui leur confèrent un avantage évolutif après réinfection de nouvelles cellules (Weinberg, 1985; Andres et coll., 1988). Ces séquences nouvellement intégrées après avoir subi des mutations activantes (par troncature ou mutation ponctuelle) vont induire une transformation cellulaire : ces séquences sont appelés oncogènes. Une explication possible des mécanismes intracellulaires régissant la progression des lésions vers la transformation cellulaire est donc fournie par l'étude des oncogènes (Harel et Leibovitch, 1993). On dénombre dans toutes les cellules plus d'une centaine de gènes (proto-oncogènes et anti-oncogènes) jouant un rôle dans la régulation ou le contrôle du cycle cellulaire en réponse à des *stimuli* provenant du milieu environnant (Muller et coll., 1982). Or toute anomalie génétique pouvant directement entraver la régulation de la mitose est potentiellement susceptible d'entraîner une croissance cellulaire incontrôlée.

Ces gènes interviennent dans la cancérogenèse sous leur forme “activée” et on leur attribue alors le nom d’oncogènes. Leur activation résulte d’anomalies qualitatives secondaires à des mutations ponctuelles, des troncatures, voire des anomalies quantitatives d’expression du gène. Dans certains cas, l’activation d’un oncogène se traduit par une réactivation de gène à un moment inopportun. La cellule reçoit dans ces cas des signaux de prolifération capables de masquer les signaux normaux ou d’agir en compétition avec les signaux de différenciation ou d’inhibition de croissance. L’altération de l’homéostasie cellulaire qui en résulte constitue une étape vers la transformation cellulaire. D’autres fois, l’activation d’un oncogène peut se manifester par une altération fonctionnelle de l’oncoprotéine conduisant à l’expression d’un signal de prolifération inapproprié. Un tel mécanisme a été en particulier décrit dans le cas des oncogènes de la famille *ras* qui, à la faveur d’une mutation ponctuelle, codent une protéine dont la capacité à hydrolyser le GTP est altérée.

Il est apparu très vite grâce à l’expérience *princeps* de Varmus, Bishop et Stéhélin que ces séquences oncogéniques portées par les rétrovirus sont des homologues des séquences eucaryotiques d’ADN, ainsi que des gènes cellulaires clonés montrant des propriétés transformantes. L’hypothèse avancée est que la variation d’expression ou la mutation de protooncogènes est, pour partie, à l’origine de la transformation cellulaire. En effet, la comparaison entre les séquences protéiques traduites des oncogènes et les séquences de protéines connues montre que ces protéines sont analogues à celles impliquées dans la réception, la transduction cellulaire ou l’amplification du signal mitotique d’origine extracellulaire, en d’autres termes ce sont des protéines impliquées dans les processus de régulation de la croissance cellulaire (Weinberg, 1985). Les protooncogènes sont donc indispensables à la division et/ou à la différenciation cellulaire: ils codent des protéines caractérisées soit par leur localisation paramembranaire, soit par leur activité enzymatique ou leur affinité pour les polynucléotides (Weinberg, 1985).

Dans les cancers mammaires, la cascade d'évènements génétiques ou épigénétiques menant à la transformation cellulaire reste pour le moment inconnue. Dans les tumeurs mammaires, cette étude ne peut être menée qu'*a posteriori* et de ce fait, seule une déduction à partir d'observations, de dérèglements d'expression des oncogènes ou leurs mutations peut permettre de bâtir une hypothèse sur la survenue de cette pathologie. Les modèles animaux restent artificiels mais peuvent permettre de conforter des déductions issues d'observations. L'affinement des techniques de biologie moléculaire et les progrès techniques facilitant les études des acides nucléiques peuvent faire espérer un recueil plus ample d'informations.

3.2. Classification des oncogènes

L'analyse des oncogènes et oncoprotéines impliqués dans la transformation cellulaire permet l'étude de la régulation du cycle cellulaire par les protooncogènes équivalents. Ces oncogènes font partie intégrante de la chaîne d'évènements qui, à partir du signal extracellulaire se propage jusqu'à la commande intranucléaire de la régulation génique. Weinberg (1985) sur la base de leur localisation dans les cellules a réparti les oncogènes et les oncoprotéines en 6 grandes classes :

Classe 1 : les facteurs de croissance. Exemple : Proto-oncogène *c-sis*, gène de la chaîne β du facteur de croissance dérivé des plaquettes (Platelet Derived Growth Factor : PDGF).

Classe 2 : les récepteurs des facteurs de croissance. Ce sont des glycoprotéines comportant généralement 3 domaines : (i) domaine extracellulaire, (ii) domaine transmembranaire, (iii) domaine intracellulaire. Exemple : *c-erbB-2*, récepteur de l' EGF (Epidermal Growth Factor).

Classe 3 : les protéines membranaires liant le G.T.P. Exemple : membres de la famille des oncogènes *RAS* : *Ha-ras-1*, *Ki-ras-2*, *N-ras-1*.

Classe 4 : les tyrosine protéines kinases membranaires qui phosphorylent les résidus de tyrosine des protéines cibles. Exemple : c-src, c-abl, c-fps, c-yes etc...

Classe 5 : les protéines kinases cytosoliques qui phosphorylent les résidus sérine et thréonine. Exemple : c-mos et c-raf-1.

Classe 6 : les protéines à activité nucléaire. Exemple : c-erb-A, récepteur de l'hormone thyroïdienne.

Généralement, les gènes *ras*, *src*, *mos*, *abl*, faisant partie des oncogènes dont les produits ont une localisation cytoplasmique, confèrent aux cellules la perte de l'ancrage, donc la perte des systèmes d'adhésion intracellulaire. D'autres induisent la sécrétion des facteurs de croissance comme le PDGF : tous ces oncogènes peuvent être activés par des troncatures ou des mutations ponctuelles. Les oncogènes nucléaires (*myc*, *myb*, *fos*, *jun*...) seraient responsables de l'immortalisation des cellules et sont activés par une dérégulation de leur niveau d'expression (Figure 7).

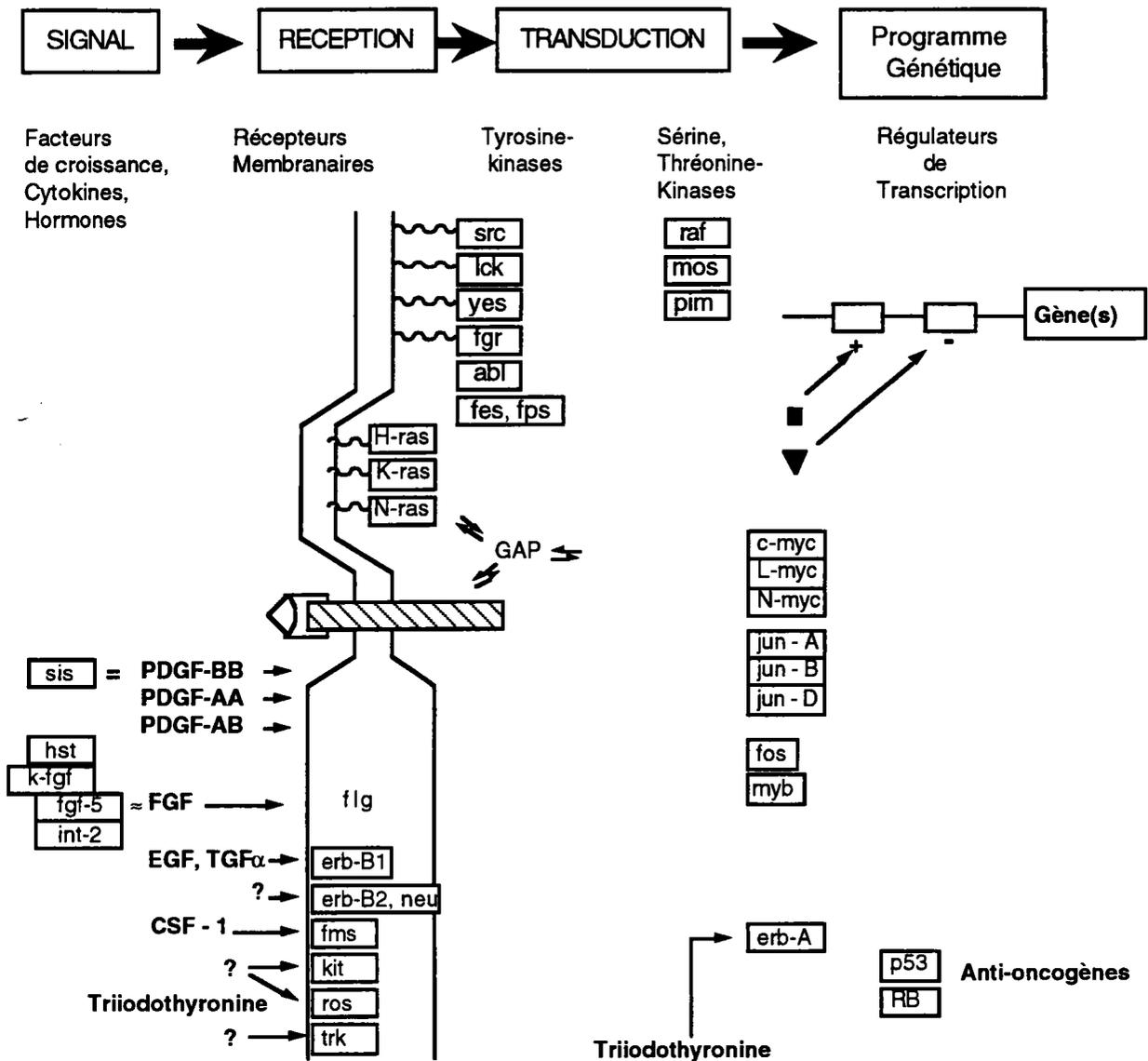


Figure 7 : Les principales oncoprotéines et anti-oncoprotéines qui interviennent dans les différentes étapes de la transmission des signaux de croissance cellulaire.

Notre travail concerne l'étude des oncogènes *c-erbB-2*, *c-Ha-ras*, de l'oncoprotéine *pS2* et du gène suppresseur de tumeur *p53* qui seront seuls développés.

3.3. L'oncogène *c-erbB-2*

3.3.1. Structure du proto-oncogène *c-erbB-2*

Le proto-oncogène *c-erbB-2* code une protéine transmembranaire de masse moléculaire de 185 kDa appelée p185 qui a une activité tyrosine-kinase et qui présente

une homologie de séquence et de structure avec l'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGF-R; Schechter et coll., 1984; Yamamoto et coll., 1986; Gullick et coll., 1990). L'EGF-R est aussi appelé c-erbB-1, HER1 ou neu (Coussens et coll., 1985). La substitution d'un seul acide aminé (remplacement d'une valine par un acide glutamique) dans la partie transmembranaire de la protéine conduit à une activation du proto-oncogène murin *neu*. Un locus homologue a été identifié chez l'homme en 17q21 (l'homologue humain du gène *neu* est appelé *c-erbB-2*). L'homologie de séquence avec le gène murin est d'environ 88 %. Le *c-erbB-2* code une protéine de poids moléculaire légèrement supérieur à 190 kDa, mais par convention la protéine effectrice humaine s'appelle également p185. Elle comporte trois domaines (Coussens et coll., 1985; Yamamoto et coll., 1986).

- un domaine extracellulaire, avec une homologie dans les séquences de 40 %, notamment pour les motifs riches en cystéines,
- un domaine transmembranaire présentant peu d'homologie (28 %) avec le gène EGF-R permettant l'ancrage de la protéine dans la membrane,
- un domaine tyrosine-kinase intracellulaire très conservé qui présente une importante homologie (85 %) avec l'EGF-R (Coussens et coll., 1985). En revanche, la région comprise entre le domaine kinase et les sites d'autophosphorylation de la protéine p185 possède une séquence de quarante acides aminés absente chez l'EGF-R (Figure 8).

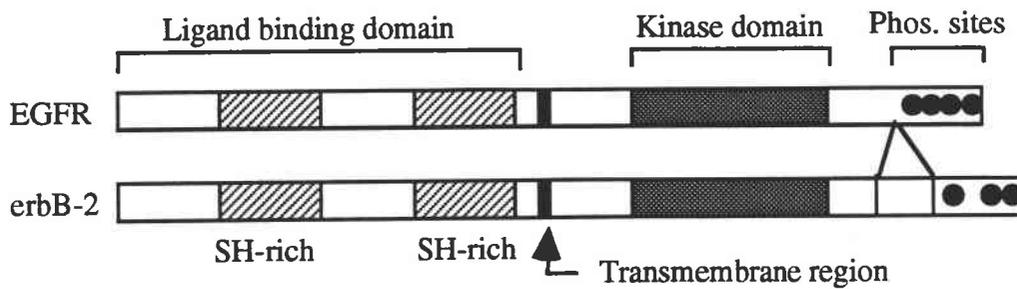


Figure 8 : Structure de l'oncoprotéine c-erbB-2 et du récepteur de l'EGF.

De plus, le site d'autophosphorylation (P4) en position 1086 est absent de *c-erbB-2* (Hsuang et coll., 1989).

Deux types de ligands (facteurs de croissance protéiques) de p185 ont été mis en évidence (Figure 9). Ils sont entièrement différents des ligands de l'EGF-R malgré d'importantes homologues entre les deux récepteurs (Tarakhovsky et coll., 1991; Yarden et Peles, 1991). Un des ligands, une glycoprotéine de 35 kDa, est capable de stimuler le produit du gène normal, mais ne réagit pas avec l'oncoprotéine neu constitutivement active (Yarden et Peles, 1991). Le deuxième ligand, un polypeptide de 25 kDa est secreté par des macrophages activés. La structure de ces deux ligands n'est pas définie à l'heure actuelle.

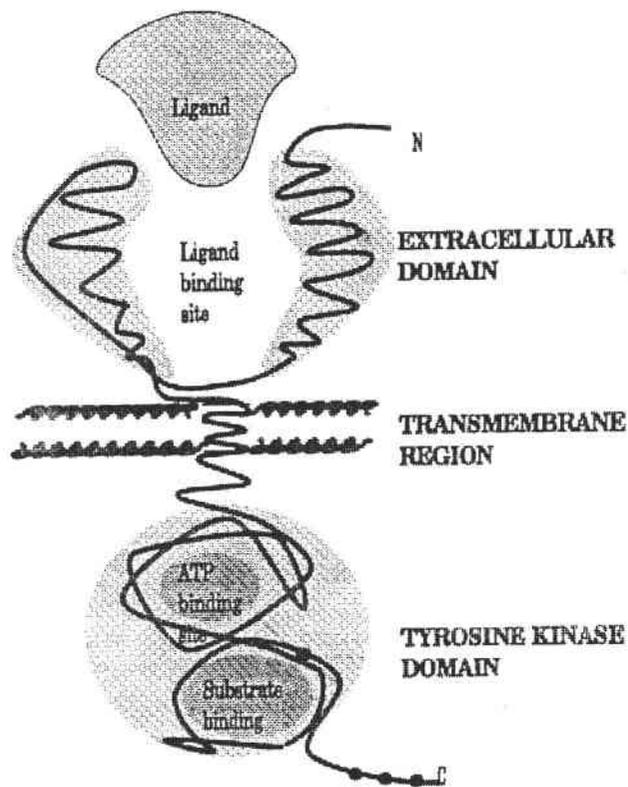


Figure 9 : Structure générale des récepteurs de facteur de croissance.

3.3.2. Expression de c-erbB-2 dans les cancers du sein

Le *c-erbB-2* est exprimé dans 10 à 30 % des carcinomes du sein. Il existerait une bonne corrélation entre l'amplification du gène et la surexpression de la protéine. Néanmoins, on observe parfois une amplification sans hyperexpression de la protéine *c-erbB-2* et réciproquement. Ce phénomène a été démontré *in vitro* et dans les cancers mammaires (McGuire, 1987; Berger et coll., 1988; Borresen et coll., 1990; Corbett et coll., 1990; Dawkins et coll., 1993). L'oncoprotéine p185 peut être détectée en immunohistochimie sur tissus mammaires inclus en paraffine. La suppression antigénique est associée à un pronostic défavorable. De nombreuses études présentent la p185 comme un marqueur de ce pronostic défavorable (Gullick et coll., 1990). Elle est détectée avec une plus grande incidence dans les carcinomes *in situ*, particulièrement

ceux de hauts grades de types comédocarcinomes. Elle n'est pas détectable dans les hyperplasies atypiques et régulières.

3.4. Les oncogènes de la superfamille *Ras*

Les protéines codées par les gènes *ras* décrites initialement dans les sarcomes du rat (RA_t Sarcoma) induits par des rétrovirus murins, sont apparentées à la superfamille de petites G-protéines fixant le GTP. Les protéines G contrôlent le taux de GTP intracellulaire, composé essentiel dans la régulation de la physiologie cellulaire. Les gènes *ras* codent des protéines de 21 kDa (p21^{*ras*}) à localisation sous membranaire ou intra-membranaire. Actuellement, on connaît à peu près une cinquantaine de membres regroupés, en 5 sous-familles Ras, Rho (Ras Homology), Rab, ARF (*ADP Ribosylation Factor*) et TC4 (Hall, 1990; Valencia et coll., 1991; Chardin, 1991). Les membres de la famille *Ras* sont des composants essentiels des voies de la transduction des signaux de prolifération et de différenciation. Les membres des familles Rab et ARF interviennent dans le transport des vésicules entre les différents compartiments intracellulaires (Goud, 1992; Lowy and Willumsen, 1993). Trois gènes *Ras* sont connus : *H-Ras*, *K-Ras*, *N-Ras*. *H-Ras*, *K-Ras* sont des gènes d'origine cellulaire responsables du pouvoir transformant des rétrovirus de "Harvey" et de "Kirsten" qui induisent des sarcomes chez le rat et la souris. *N-Ras* (N pour "non-equivalent retrovirus" car il ne possède pas d'équivalent rétroviral connu) est fortement apparenté aux deux autres. Ces trois gènes ont été découverts chez l'homme lors de recherche d'altérations génétiques dans les tumeurs. (Chardin, 1994).

Les trois gènes *ras* ont une structure commune avec un exon non-codant en 5' et quatre exons codants. Les introns des trois gènes sont largement différents par leur taille et leur séquence. En effet, les séquences totales du gène *K-ras* humain font 35 kpb, tandis que celles de *H-ras* et de *N-ras* font respectivement environ 3 et 7 kpb. Le gène *K-ras* code deux protéines p21, K-RasA et K-RasB du fait de l'existence d'un quatrième exon alternatif (4A et 4B). Les protéines H-Ras, N-Ras et K-RasA possèdent

189 acides aminés, tandis que K-RasB en possède 188. Le niveau de production de l'ARN messager codant la protéine K-RasB est plus élevé que celui codant la protéine K-RasA. Les protéines ras sont présentes dans tous les tissus.

Les analyses cristallographiques des protéines ras modifiées par mutagenèse dirigée ont fourni un aperçu de la structure de ras ainsi que des autres membres de la superfamille des protéines ras. Les gènes *ras* sont mutés dans environ un tiers des tumeurs humaines. L'allèle transformant ne diffère de l'allèle normal que par une seule mutation due à la substitution des acides aminés 12, 13 ou 61. L'identification de facteurs qui régulent positivement ou négativement l'activité de *ras*, l'implication de ces facteurs dans les transmissions des signaux physiologiques et pathologiques dans les tumeurs restent à étudier. Les études des modifications post-traductionnelles de *ras* qui impliquent les produits de la voie de synthèse des stéroïdes représentent aussi des voies de recherche prometteuses.

3.4.1. Structure primaire des protéines ras

Les séquences des protéines ras ont une forte homologie. Les acides aminés 1 à 164 sont identiques sauf les résidus 151 à 153. Par contre la séquence C-terminale est toute différente. Ces protéines sont constituées d'un domaine globulaire de 160 acides aminés dont ceux constituant le site de fixation du nucléotide GTP. L'extrémité C variable se compose de 24 acides aminés. Elle se termine par un motif CAAX (C : cystéine, A : acide aminé aliphatique, X : acide aminé variable). Cette variabilité suggère une fonction propre à chaque protéine ras.

3.4.2. Localisation des protéines ras et modifications post-traductionnelles

Les protéines ras ont une demi-vie d'au moins 24 heures. La cystéine 186 est nécessaire pour initier l'ancrage des p21^{ras} sur la membrane. Les protéines mutées ayant des altérations de ce résidu ne sont plus transformantes et la protéine reste cytosolique. La protéine H-ras se termine par la séquence : Cys-Val-Leu-Ser. La FTase

(farnésyl-transférase) ajoute un groupement farnésyl sur la cystéine, puis une protéase spécifique vient cliver les trois derniers résidus : AAX, et le groupement carboxyle de la cystéine, devenue terminale, est méthylé par une carboxy-méthyl transférase. La protéine possède alors une extrémité C fortement hydrophobe et une importante affinité pour les membranes. Finalement, les résidus cystéine en amont de la cystéine farnésylée sont palmitoylés d'une manière irréversible et la protéine présente ainsi une affinité membranaire et une activité biologique accrues. L'interaction avec la membrane est stabilisée, car les résidus chargés positivement agissent sur les charges négatives apportées par les résidus palmitates.

3.4.3. Protéines ras et signalisation

Le gène *c-Ha-ras* est un des premiers oncogènes à avoir été étudié dans un modèle de cellules en culture. Il possède la capacité de transformer des cellules NIH3T3 immortalisées (Barbacid, 1987). Les cellules deviennent alors malignes et se comportent comme des cellules à potentiel métastatique sur souris *nude*. *c-Ha-ras* joue un rôle dans la transduction des signaux de la surface vers l'intérieur de la cellule. La manière dont les oncoprotéines ras interviennent dans la signalisation intracellulaire est imparfaitement connue. Leur activité est modulée par une autre protéine (GAP, *GTP-ase Activating Protein*) qui semble être un substrat des tyrosine-kinases membranaires et cytosoliques. Les protéines Ras sont présentes sous deux formes, une liée au GTP active ou l'autre au GDP. Les protéines ras ont une activité GTPasique faible, contrairement aux autres G protéines. Après avoir fixé le GTP, elles se lient au GAP/NF1 qui favorise l'hydrolyse du GTP en GDP et permet l'action sur l'effecteur du ras (Figure 10). Le retour à la forme liée au GTP se fait par un processus d'échange pouvant être régulé négativement par la protéine GDI (GDP-dissociation inhibitor) ou positivement par la protéine GDS (GDP-dissociation stimulator).

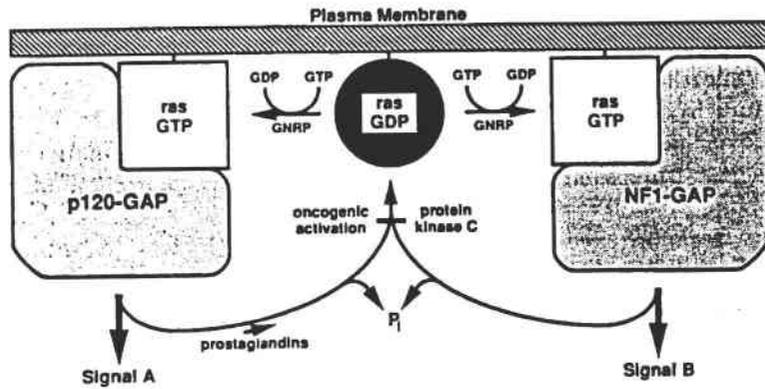


Figure 10 : Modèle des fonctions effectrices présumées des protéines activant la GTPase. (Bollag et McCormick, 1991).

La protéine NF1 codée par un gène altéré dans la neurofibromatose de Recklinshausen remplit une fonction identique à la protéine GAP, avec laquelle elle possède des similitudes de structure. Ces deux protéines à effet régulateur négatif jouent vraisemblablement aussi le rôle d'effecteur des $p21^{ras}$. Néanmoins, bien que servant de cible en aval des $p21^{ras}$, il n'est pas certain que ces protéines soient les effecteurs exclusifs des $p21^{ras}$.

3.4.4. Régulation de l'expression du gène *ras*.

La régulation positive des $p21^{ras}$ semble être une protéine de 35 kda favorisant l'échange GDP/GTP sur les $p21^{ras}$. L'activation de la $p21^{ras}$ entraîne une cascade d'évènements concourant à activer le cycle mitotique et à faire passer la cellule de la phase G_0 en phase de synthèse d'ADN (phase S). La $p21^{ras}$ induit l'augmentation de l'activité de la phospholipase C (PLC) conduisant à l'élévation des concentrations en inositol triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG) puis l'activation de la protéine kinase C (PKC) (Barbacid, 1987; Pincus et coll., 1992). La PKC possède également la propriété de phosphoryler les *Merystoyle Alanine Rich Cyclin-Kinase Substrate* (MARCKS). De cette action résulte une modification des interactions entre filaments d'actine et membrane cellulaire. Ceci aurait pour conséquence une altération de

l'ancrage des cellules et pourrait donc favoriser le processus de transformation cellulaire. De même, la PKC est capable de phosphoryler une autre famille de kinases appelées *Extracellular Regulated Kinase* (ERK) pouvant alors entraîner une réorganisation des microtubules, affectant le cytosquelette et conduisant à une modification de la structure cellulaire.

D'une manière identique, les protéines RhoA et Rac1 (faisant partie de RhoB) appartenant à la superfamille *ras* sont impliquées dans la réorganisation des fibres d'actine de plusieurs structures cellulaires (Ridley et Hall, 1992; Ridley et coll., 1992). Il existe une régulation concertée entre les protéines Rho et Ras. Ceci s'explique par l'existence d'un facteur d'échange GDP/GTP de p21^{ras} caractérisé par Shou et coll. (1992). Il s'agit de GRF^{ras} (*guanine nucleoside releasing factor for Ras p21*), protéine de 140 kDa dont la région carboxy-terminale est similaire à celle de la protéine de levure CDC25, facteur d'échange de Ras pour la levure, et à celle de la protéine de drosophile SOS (*Son Of Sevenless*), impliquée dans la voie de signalisation du récepteur tyrosine kinase *sevenless* (Simon et coll., 1991; Shou et coll., 1992).

La liaison des facteurs de croissance à leurs récepteurs entraîne l'activation, non seulement de ras, mais également d'une série de protéines cytoplasmiques : Ras → Raf → Mitogen Activated Protein kinase kinase (MAPKK) → MAP kinase (MAPK). La MAP kinase est ensuite transloquée vers le noyau où elle phosphoryle et active certains facteurs de transcription. Pour démontrer l'importance dans la transmission des signaux menant à la prolifération cellulaire, Brunet et coll. (1995) ont tenté d'obtenir une forme constitutivement active de la MAPKK en clonant l'ADN complémentaire de la MAPKK de fibroblastes de hamsters chinois. La MAPKK est activée par les kinases en amont, par phosphorylation de deux résidus sérines (S218 et S222). Le remplacement de ces sites de phosphorylation par des acides aspartiques (mutant S218D/S222D) a permis d'obtenir une version constitutivement active de la MAPKK. L'expression de ce mutant dans des fibroblastes provoque, en l'absence des facteurs de croissance, l'activation de la MAPK endogène, sa translocation dans le noyau, et l'activation des facteurs de

transcription dépendants de la MAPK. Ce qui montre que l'activation constitutive de la MAPKK est un évènement suffisant pour déclencher les étapes de la cascade de transmission des signaux mitogéniques situés en aval.

Ces mécanismes ont pour conséquence d'augmenter en particulier la concentration en calcium intracellulaire et de favoriser la phosphorylation de nombreuses protéines. C'est le cas des protéines gouvernant l'échange Na^+/H^+ dont la phosphorylation entraîne une élévation du pH cellulaire. Les variations du taux de calcium et du pH intracellulaire sont deux évènements régulant la synthèse de l'ADN ainsi que l'expression génique.

L'utilisation d'esters de phorbol comme le TPA, agent mimant l'action de *ras* sur la PKC a montré que cette dernière pouvait conduire, de façon précoce et par un processus de phosphorylation, à une activation du facteur de transcription AP1(complexe jun/fos; Lee et coll., 1987). Le complexe AP1 a la propriété de pouvoir réaliser la phosphorylation de protéines associées à la chromatine et ainsi, de permettre son déroulement. Ainsi l'induction d'une conformation plus ouverte pourra conduire à une exposition plus importante de certains domaines régulateurs de gènes à divers facteurs inducteurs ou inhibiteurs.

Le produit du gène *ras* a également la propriété de pouvoir lier la protéine anti-oncogénique p53 et de l'empêcher de jouer son rôle de contrôle de la croissance et de la différenciation cellulaire. Il a été également proposé que la suppression de l'expression de certains gènes *ras*-induits pouvaient survenir au niveau nucléaire, par l'action de la pRB (protéine du gène du rétinoblastome) et de la p53 (Spandidos et coll., 1992). On le constate, les protéines *ras* se trouvent à un niveau crucial du cheminement de l'information de l'extérieur vers l'intérieur des cellules : elles transduisent l'information de l'extérieur de la cellule vers le noyau, siège de l'expression des gènes, en permettant notamment son amplification intracellulaire par les protéines kinases.

3.4.5. Rôle pathologique des protéines ras

Les protéines oncogènes p21^{ras} isolées à partir des tumeurs expérimentales induites par des agents physiques ou chimiques ou humaines ont perdu l'activité GTPase et se trouvent de ce fait dans un état d'activation permanente. Les protéines ras mutées restent fixées plus longtemps aux protéines GAP sous forme d'un complexe qui par l'intermédiaire des protéines effectrices cytosoliques (protéines kinases) continuent à envoyer des signaux mitotiques aux effecteurs nucléaires (dont les protooncogènes).

3.4.6. Ras et tumeurs mammaires

La présence de la protéine ras dans les lésions tumorales mammaires, surtout si elle est associée à la présence de c-erbB-2 est corrélée à une issue clinique défavorable (Dati et coll., 1991). La présence des oncoprotéines p21^{ras} et c-erbB-2 a été recherchée dans 75 carcinomes mammaires et il a été observé une corrélation à la fois des deux oncoprotéines avec des niveaux élevés du récepteur aux estrogènes (ER) et du récepteur du facteur de croissance épithélial (EGFR), mais pas avec l'index mitotique. Concernant le ras seul, la majorité des carcinomes mammaires a exprimé des niveaux élevés de la protéine ras. Malgré des avis contraires émanant de plusieurs auteurs, il existerait un lien entre les niveaux élevés de p21^{ras} et la taille tumorale (Lundy et coll., 1986), la positivité des ganglions lymphatiques (Lundy et coll., 1986), et le statut des récepteurs d'estrogènes. Les études immunohistochimiques mettant en évidence à la fois p21^{ras} et c-erbB-2 sont plus significativement associées à une issue clinique défavorable que si l'on étudie les deux oncoprotéines séparément. Ceci est dû à une possible interaction entre le ras et le c-erbB-2 dans la transformation cellulaire qui reposerait sur deux constatations indépendantes : (i) le c-erbB-2 appartient à la famille des récepteurs du facteur de croissance tyrosine kinase dont certains membres interagissent avec la p21^{ras} par l'intermédiaire du GAP (Ellis et coll., 1990; Kaplan et coll., 1990; Fort et Vincent, 1993; Burgering et coll., 1995), (ii) le facteur qui augmente l'activité d'autophosphorylation de c-erbB-2 a été trouvé dans les milieux de cultures

cellulaires transformées par ras (Yarden et Weinberg, 1989). Ainsi donc, on peut faire l'hypothèse que l'expression de ras pourrait induire une activation de c-erbB-2 et doter les cellules cancéreuses mammaires d'un phénotype particulièrement agressif. La recherche de l'oncogène *ras* (éventuellement associée à celle du c-erbB-2) pourrait aider à la caractérisation biologique des cancers mammaires primitifs et ainsi aider à définir le pronostic de la tumeur en complément avec d'autres facteurs pronostiques déjà établis.

3.5. Le gène *pS2*

Le gène *pS2* est l'un des gènes dont l'expression est contrôlée par l'estradiol que ce soit dans les cellules mammaires humaines en culture MCF-7 ou dans les lésions tumorales du sein (Rio et coll., 1988; Mori et coll., 1988; Foekens et coll., 1990; Cho et coll., 1991; Koerner, 1992; Besse et coll., 1994).

3.5.1. Structure et régulation du gène *pS2*

Le gène *pS2* a été cloné et séquencé (Jeltsch et coll., 1987; Roberts et coll., 1988). La protéine pS2 présente des similitudes avec des facteurs de croissance tels que les *insuline-like growth factors I et II*, qui sont des polypeptides sécrétés et, constitués respectivement, de 67 et 70 acides aminés et renfermant de nombreux résidus de cystéines.

L'ARNm de pS2 est induit par divers facteurs de croissance comme l'EGF, l'insuline, l'IGF-1 et le FGF (Cavailles et coll., 1989; Kida et coll., 1989). La synthèse de pS2 est sous le contrôle du récepteur d'estrogènes (RE). Les délétions dans la partie NH₂-terminale du RE bloque la synthèse de la protéine pS2 (Kumar et coll., 1987). La suppression de l'estradiol dans les cultures de cellules MCF-7 entraîne la disparition de la synthèse de pS2 et la mort de la cellule (Kyprianou et coll., 1991). La présence de l'oncoprotéine pS2 dans une lésion tumorale est donc le témoin de son caractère hormonosensible et de la bonne fonctionnalité des récepteurs d'estrogènes. La pS2

pourrait jouer le rôle de facteur pronostique dans les cancers du sein devant permettre de mieux définir les groupes de patients susceptibles de bénéficier d'une thérapie adjuvante (Foekens et coll., 1993).

3.5.2. pS2 et cancer du sein

La protéine pS2 est exprimée dans 45 à 70 % des cancers du sein (Henry et coll., 1991). La présence des récepteurs d'estrogènes a été recherchée à l'aide des anticorps monoclonaux (Laboratoire Abbott, Chicago, U.S.A) sur des tissus congelés. Dans tous les cas, la présence des deux protéines RE et pS2 est liée à celle de leur ARNm. La présence de la protéine pS2 dans les cancers du sein reflète donc l'augmentation de la transcription du gène pS2, comme cela avait été démontré antérieurement dans les cellules MCF-7. Contrairement à RE qui se trouve exclusivement dans le noyau, la protéine pS2 est localisée dans le cytoplasme avec souvent une condensation périnucléaire correspondant probablement à l'appareil de Golgi, ce qui n'est pas étonnant puisqu'il s'agit d'une protéine sécrétée. Pour mesurer la fonctionnalité des récepteurs aux estrogènes, la recherche de la protéine pS2 est proposée comme marqueur (Gion et coll., 1993; Foekens et coll., 1993). Cette recherche a un intérêt pronostique, car les patientes dont les tumeurs répondent aux hormones ont en moyenne une survie de un an et demi à deux ans supérieure à celles dont les tumeurs ne répondent pas à l'action des hormones stéroïdes.

4. Les anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs

4.1. Généralités

Les "anti-oncogènes" sont aussi appelés des "gènes suppresseurs de tumeurs" ou "gènes suppresseurs de croissance". Par leur absence ou leur expression sous forme modifiée, ces protéines sont associées à une perte de contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaires et de ce fait, sont liées au processus néoplasique.

En effet, dans les conditions normales, il existe, au sein de la cellule, un contrôle négatif qui dicte à la cellule de ralentir sa croissance et d'augmenter son niveau de différenciation. La perte de cette fonction par inactivation d'anti-oncogènes se traduit par le fait que les cellules entrent en division cellulaire incontrôlée surtout si par ailleurs, des oncogènes sont activés.

L'hypothèse selon laquelle les anti-oncogènes régulaient l'expression des oncogènes a été émise par Knudson (1971). Les gènes suppresseurs de tumeurs, à l'inverse des oncogènes inhibent la prolifération des cellules normales (Weinberg, 1985).

Les protéines codées par les anti-oncogènes remplissent également une fonction régulatrice sur la croissance cellulaire, la nature de cette fonction et le niveau exact où elle s'exerce commencent seulement à être précisés en termes moléculaires. Dans leur forme native, ces protéines font partie d'un réseau complexe de réactions enzymatiques qui participent au déclenchement de la réplication de l'ADN (lors de la phase S) lorsque les cellules sortent de la quiescence (phase G₀). Le cycle cellulaire est induit lorsque les cellules reçoivent des signaux extérieurs spécifiques : facteurs de croissance, hormones, modulateurs chimiques. La transmission de ces signaux s'effectue par l'intermédiaire de récepteurs membranaires ou nucléaires, puis par des chaînes de réactions intervenant dans le cytoplasme (cas des récepteurs membranaires), pour aboutir à la mise en route du cycle cellulaire, dans le noyau.

La suppression des anti-oncogènes constitue un événement important dans la progression de nombreuses formes de cancer. Ils sont présumés agir comme facteurs transcriptionnels, bien que l'identité des gènes soumis à leur régulation ne soit pas connue. Contrairement aux oncogènes qui agissent sur un mode dominant et stimulent la croissance cellulaire, les anti-oncogènes agiraient sur un mode récessif et exerceraient normalement un contrôle négatif en limitant la croissance cellulaire. Leur inactivation

résulte de mutations ou de délétions, mais dans ce cas les deux allèles doivent être modifiés, ce qui a pour conséquence de les rendre non fonctionnels.

En dehors des deux gènes suppresseurs de tumeurs *pRB* (*retinoblastoma protein*) et *p53* les plus étudiés à l'heure actuelle, d'autres gènes suppresseurs de tumeurs ont été mis en évidence par l'observation de délétions de fragments de chromosomes dans des tumeurs de cancer colorectal. Ce cancer illustre d'ailleurs la cancérogenèse en multiples étapes car, outre l'activation du protooncogène *ras*, des délétions de fragments de chromosomes 5, 17 et 18 sont constatées. Comme autres candidats potentiels de gènes suppresseurs de tumeurs, on retrouve le gène *Mutated in Colorectal Cancer* (*MCC*) et le gène *Adenomatous Polyposis Coli* (*APC*) sur le chromosome 18 (Vogelstein, 1989).

Pour certains cancers de reins, la mise en évidence d'une délétion du chromosome 11 a permis l'identification d'un autre gène suppresseur de tumeurs inactivé dans les tumeurs de Wilm's (*WT1*). Des travaux récents ont montré que le gène *WT1* code un facteur de transcription possédant quatre motifs en doigts de zinc permettant sa fixation à l'ADN.

Plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs doivent être mutés avant que la cellule s'achemine vers un état tumoral. Néanmoins, du fait de leur nature récessive, la correction d'un seul défaut, comme par exemple, l'introduction d'un seul chromosome intact dans les cellules colorectales tumorigènes suffit pour inhiber la tumorigénèse. Autrement dit, la thérapie d'un cancer peut avoir lieu à ce niveau de la tumorigénèse. L'intervention donc, à un seul niveau ou stade pourrait être suffisante pour supprimer le comportement tumoral des cellules. Ce résultat constitue un point très important pour le traitement du cancer colorectal et dans l'avenir pourrait être appliqué pour d'autres cancers, notamment le cancer du sein.

4.2. L'anti-oncogène *p53*

La *p53* a été longtemps considérée comme un oncogène, mais enfin s'est avérée être un anti-oncogène lorsqu'il n'est pas muté (Caron de Fromentel et Soussi, 1992). Ceci s'explique d'abord par le rôle du gène *p53* au niveau de la réponse cellulaire vis-à-vis de l'altération de l'ADN (Kastan et coll., 1992; Khan, 1992; Lane, 1992; Hall et Lane, 1994), puis ensuite par l'implication de ce même gène dans le processus apoptotique (Shaw et coll., 1992; Yonish-Ronach et coll., 1991).

4.2.1. Structure de la protéine *p53*

La protéine *p53* est une phosphoprotéine de 393 acides aminés localisés dans le noyau. La protéine *p53* est constituée de trois domaines fonctionnels différents impliqués dans la régulation de son activité (Milner, 1995). Le domaine N-terminal, riche en résidus acides, forme une structure en hélice α et pourrait posséder une activité de contrôle transcriptionnel (Vogelstein et Kinzler, 1992; Marshal, 1991; Levine, 1992). Le domaine central, compris entre les résidus 100 et 300 se lie à l'ADN par l'intermédiaire des séquences consensus. Ce site de liaison est constitué de deux motifs symétriques de 10 paires de bases séparés par 13 paires de bases (El-Deiry et coll., 1992). La partie centrale (riche en proline hydrophobe) est formée d'une structure hydrophobe dite en feuillets β sur laquelle s'ancrent deux structures en boucle maintenues entre elles par un atome de zinc et un motif boucle-feuillet-hélice. Cet ensemble cohésif de boucles présentant une interaction avec le grand et le petit sillon de l'ADN est codé par quatre des cinq domaines hautement conservés du gène. Cette partie centrale, quand elle est le siège de mutations ponctuelles confère un caractère transformant aux cellules. Le domaine C-terminal riche en résidus basiques lie l'ADN (Hupp et coll., 1992), et forme lui aussi une structure en hélice α . C'est également à cet endroit qu'est situé le signal d'adressage nucléaire de la protéine permettant à cette dernière de gagner le noyau après sa synthèse. Le domaine C-terminal possède une séquence d'oligomérisation entre les résidus 319 et 360 permettant la formation de dimères et de tétramères

(Stenger, 1992). La protéine p53 est considérée comme le gardien du génome (Lane, 1992), car ses différentes activités sont le garant de la stabilité génétique de la cellule comme nous le verrons.

4.2.2. p53 et cycle cellulaire

La protéine p53 contrôlerait la division cellulaire normale à 4 niveaux : cycle cellulaire, activité transcriptionnelle, réplication de l'ADN et différenciation cellulaire. La protéine p53 est nécessaire à l'initiation du processus de division cellulaire. Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases. La phase G1, de durée variable précède le stade de réplication de l'ADN ou phase S (Diller et coll., 1990, Nigro et coll., 1992). Elle est suivie d'une phase G2 où la cellule contient 4N ADN et qui se poursuit par la mitose proprement dite ou phase M. On connaît actuellement 2 points de régulation dans le déroulement du cycle cellulaire. Le premier se situe à la transition G1/S contrôlé par la p105Rb et le deuxième à la transition G2/M et fait intervenir deux autres groupes de protéines : les cyclines et les kinases, en particulier la kinase *cdc2* (*cell division cycle*). Elle pourrait activer la transcription de gènes suppresseurs de la prolifération cellulaire et réprimer la transcription de gènes qui facilitent la transformation maligne des cellules. Des souris totalement déficientes pour la protéine p53 (délétion germinale homozygote du gène *p53*) se développent tout à fait normalement (Donehoffer et coll., 1992). Ce qui, dans l'état actuel des connaissances suggérerait que la protéine p53 n'est indispensable ni à la prolifération ni à la différenciation cellulaire. Par contre, ces souris présentent précocément des cancers multiples, ce qui montre le rôle de la protéine p53 dans la prévention tumorale. Les mécanismes en cause sont plus complexes qu'une simple inhibition de la prolifération cellulaire. Par des mécanismes encore mal expliqués, les lésions de l'ADN induites par les agents mutagènes physiques ou chimiques stimulent la production de la protéine nucléaire p53, lequel en retour accroît la synthèse d'une protéine p21^{WAF1/cip1} et d'une protéine codée par le gène *Growth Arrest on DNA Damage* (*GADD45*; El-Deiry et coll., 1993; Harper et coll., 1993; Li et coll., 1994; Smith et coll., 1994). Ces deux protéines présentent une interaction avec le

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), co-facteur essentiel intervenant dans la réplication de la synthèse de l'ADN (Kastan et coll., 1992). La synthèse de p53 est soumise à la régulation du produit du gène *AT*, gène non fonctionnel dans l'ataxie télangiectasique. Notons que cette maladie est caractérisée par l'apparition de cancers cutanés et des hémopathies malignes (Slichenmyer et coll., 1993).

4.2.3. Autres fonctions de p53

La p53 peut réprimer la transcription de gènes en se liant au facteur TBF (*TATA Binding Factor*) et induire ainsi un arrêt des cellules en phase G1/S pendant lequel pourront prendre place les mécanismes assurant la réparation de l'ADN avant l'entrée en phase S (Levine et coll., 1991; Seto et coll., 1992). Dans les conditions normales, la p53 peut se fixer, sous forme tétramérique, sur des sites spécifiques de fixation de p53 de l'ADN (*p53 Binding Sites* : PBS) et activer, non seulement la transcription de son propre gène, mais aussi celle de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN .

La protéine p53 joue également un rôle dans la sénescence et l'apoptose (Carson et Lois, 1995). En présence d'altérations de l'ADN, la protéine p53 bloque soit les cellules en phase G1 et permet aux enzymes de réparation de l'ADN d'agir, soit déclenche la mort cellulaire par apoptose quand les altérations sont trop importantes. Le phénomène d'apoptose nécessite l'intégrité de la protéine p53. Des études récentes permettent d'envisager les mécanismes possibles de l'induction de l'apoptose. Dans les lignées cellulaires de leucémies, la protéine p53 permet la transcription du gène *bax*, dont le produit inhibe spécifiquement l'oncoprotéine Bcl-2, qui a une forte activité anti-apoptotique (Miyashita et coll., 1994a). Le gène *bcl-2* possède une séquence de réponse négative dépendante de l'expression de la protéine p53. Ainsi à l'état normal, la protéine p53 pourrait favoriser l'apoptose en inhibant spécifiquement le gène *bcl-2* (Miyashita et coll., 1994b).

La transcription du gène *CIP1/WAF1* (*Cdk Interacting-Protein 1/Wild type p53, Activated Fragment 1*) codant une protéine de 21 kDa, inhibiteur de la kinase cdk2 (cyclin dépendant kinase) est directement régulée par la protéine p53 (Harper et coll., 1993; El-Deiry et coll., 1993). La protéine p21, quand elle est activée par des cyclines spécifiques de la phase G1 permet l'initiation de la réplication de l'ADN. La protéine p21 peut également bloquer l'élongation de la réplication en inactivant directement le PCNA (*Proliferating Cellular Nuclear Antigene*) qui est une protéine annexe à la polymérase δ (Li et coll., 1994). La p53 mutée perd sa capacité à se fixer sur ses sites de liaison, ceci étant très probablement dû à une altération de la conformation de la protéine la rendant incapable de se tétramériser.

Les formes mutées de la p53 auraient une action dominante par rapport aux formes sauvages. En effet, les p53 mutées réalisent un complexe avec les protéines sauvages conduisant à l'inactivation de ces dernières. En outre, les formes mutées de la p53 participent à l'immortalisation cellulaire et peuvent coopérer avec l'oncogène *ras* dans la transformation maligne de diverses lignées cellulaires (Hinds et coll., 1989). Il a été également observé que la coopération entre la p53 sous sa forme mutée et l'oncogène *ras* activé pouvait être inhibée en présence de p53 de type sauvage (Hinds et coll., 1987). Des travaux récents montrent que les mutations de la p53 interviennent dans les stades les plus tardifs de la progression maligne, conduisant à l'expression d'un phénotype malin complet (Tsvieli et Mitrani-Rosenbaum, 1993). De plus, la p53 peut lier des protéines du choc thermique : protéines de la famille HSP70 (*Heat Shock Protein* identifiées sont : hsp 70, hsc 70, hlx 70), (Agoff et coll., 1993). Celles-ci constituent le groupe de protéines ubiquitaires le plus souvent présentes à de faibles taux dans le noyau.

En effet, sous l'action d'un stress physiologique, la synthèse de ces protéines peut augmenter de façon très importante, ceci pouvant conduire à l'altération des voies de la synthèse protéique (Morimoto, 1991). Il a été démontré qu'une surexpression, une altération structurale ou des mutations au sein de la p53 pouvaient conduire à une

liaison avec les protéines du choc thermique (Pinhasi-Kimhi et coll., 1986). Bien que la signification physiologique de ces interactions reste obscure, une corrélation a été observée entre la capacité des différents mutants p53 à lier les hsp70 et leurs propriétés oncogéniques *in vitro*.

La p53 est également incapable d'interagir lorsqu'elle est mutée avec une protéine de 55 kDa codée par le gène *murine double minute 2 (mdm2)*, retrouvé dans les chromosomes double minute, homologue d'une protéine oncogénique murine, fréquemment amplifié dans les sarcomes (Oliner et coll., 1993). Cette liaison inhiberait la transactivation médiée par la p53 (Momand et coll., 1992; Arany et coll., 1993).

4.2.4. p53 et mutations

L'altération de la structure et de l'expression du gène est provoquée par des mutations ponctuelles se traduisant par une activité transformante de la p53. La localisation de ces mutations ponctuelles s'observe au niveau de quatre blocs de séquences très conservées dans différentes espèces. Il existe une homologie de plus de 80 % entre la séquence en acides aminés de la protéine p53 de la souris et celle de l'homme. Le gène humain contient 11 exons dont le premier est non codant. L'ARN transcrit à une taille de 2,8 kb. Des mutations acquises du gène *p53* sont observées dans les tumeurs solides humaines et les lignées cellulaires. Ce sont des réarrangements, des délétions, des insertions et des mutations ponctuelles. Elles touchent principalement les exons 5 à 8 dans les régions du gène très conservées entre les différentes espèces. Par exemple dans les tumeurs du côlon, ces mutations touchent les codons 175, 248, 273 et 282.

Dans le syndrome de Li-Fraumeni, la survenue de plusieurs cancers (sarcomes, sein, cerveau, foie, poumons et os) chez le même individu est associée à l'existence de mutation constitutive de ce gène (Lane, 1994; Frebourg et coll., 1995). Par ailleurs, des mutations du gène *p53* sont fréquentes dans de nombreux types non familiaux de cancers tels les cancers du sein, du côlon, des poumons, du cerveau, des os, de la

peau, de la vessie, des ovaires (Hollstein et coll., 1991; Levine et coll., 1991; Levine, 1993; Baas et coll., 1994; Schimmelpenning, 1994). Il faut noter que la mutation de p53 n'est pas impliquée dans l'initiation de la tumorigenèse, mais plutôt représente un évènement tardif impliqué dans la progression tumorale (Blondal et Benchimol, 1994).

L'observation selon laquelle la fonction du gène *p53* peut être altérée non seulement par une mutation, mais aussi par des mécanismes qui ne soient pas génétiques et qui incluent des interactions protéines-protéines (Momand et coll., 1992; Oliner et coll., 1993), des changements conformationnels de la protéine (Milner, 1991; Ullrich et coll., 1992), ou une exclusion nucléaire (Moll et coll., 1992), prouve que dans les cellules tumorales exprimant le gène *p53* de type sauvage, la protéine codée serait non fonctionnelle. La protéine naturelle a une courte durée de vie. Des mutations stabilisent cette protéine en lui conférant une demi-vie plus longue. A l'état physiologique, des taux élevés de protéine normale sont observés en réponse à une altération de l'ADN.

D'autres problèmes sont représentés par l'évaluation du marquage, à savoir le pourcentage de cellules positives et l'intensité de ce marquage (Battifora, 1994). Il existe une relation entre l'expression de la protéine p53 et une plus faible différenciation et plusieurs études ont montré une corrélation avec un pronostic défavorable de cancer du sein (Chang et coll., 1991; Spandidos et coll., 1992, Van Den Berg, 1993).

Les points chauds de mutations du gène *p53* sont différentes selon les types de cancer (Hollstein et coll., 1991; Caron de Fromentel et Soussi, 1992; Bhathia et coll., 1992). Des transversions (substitution d'une base purine avec une base pyrimidine et vice versa) G --->T, dues à certains cancérogènes, sont groupées au niveau du codon 249. Elles sont fréquentes dans les cancers des poumons de patients d'Afrique du Sud ou de l'Asie du Sud-Est. L'aflatoxine B₁ induit des transversions G --->T ou des substitutions d'une arginine par une sérine (Ozturk, 1991). Des mutations G --->T observées dans le cancer du poumon seraient dues au benzo(α)pyrène, composé retrouvé dans le tabac (Khan, 1992; Westra et coll., 1993). Dans quelques cas de

cancers du sein ou d'hémopathies malignes, certaines transversions seraient dues à un agent mutagène (Caron de Fromentel et Soussi, 1992; Nakamura et coll., 1993).

Des mutations doubles CC ---> TT ou des substitutions C ---> T sont induites par les rayons ultra-violet. Ces mutations sont souvent retrouvées dans les cancers de la peau. Ces différences observées dans les spectres de mutations de différentes tumeurs représentent de véritables cartographies d'exposition aux mutagènes et indiquent que des facteurs mutagènes différents sont impliqués dans diverses sortes de cancers.

La fréquence et le type de mutations de p53 peuvent jouer le rôle d'un "densitomètre moléculaire" de l'exposition aux cancérigènes et ainsi contribuer à l'épidémiologie moléculaire des risques de cancers chez l'homme. Les spectres de mutation de p53 peuvent aussi indiquer qu'un cancer particulier (ou qu'un certain type de cancer) n'est pas dû à un cancérigène de l'environnement, mais plutôt causé par une mutagenèse endogène. Par exemple, la grande fréquence observée dans les transitions C ---> G au niveau des dinucléotides CpG dans les carcinomes du colon (Hollstein et coll., 1991) est en rapport avec une mutagenèse due à des mécanismes endogènes de désamination. La transition C ---> T serait favorisée par une désamination spontanée de la 5-méthyl-cytosine, soit à une désamination enzymatique de la cytosine par l'ADN (cytosine-5)-méthyl transférase à un moment où le S-adénosylméthionine se retrouve à une concentration limite.

Les altérations du gène *p53* sont retrouvées dans 40 à 45 % des cas de cancers (Tableau 2). C'est l'évènement génétique le plus fréquent mis en évidence à ce jour dans les cancers. Les mutations du gène *ras* associées à celles du gène *p53* sont observées dans moins de 25 % des cancers.

Tableau 2 : Fréquence comparée des mutations des gènes *p53* et *ras*.

Type de cancer	Fréquence dans le monde	Fréquence des altérations du gène <i>p53</i>	Fréquence des altérations du gène <i>ras</i>
1- POUMON	(11,8 %)	68 %	30 %
2- ESTOMAC	(9,9 %)	45 %	peu élevée(1-5 %)
3- SEIN	(9,4 %)	40 %	peu élevée(1-5 %)
4- COLON	(8,9 %)	65 %	50 %
5- COL DE L'UTERUS	(5,7 %)	20%	peu élevée(1-5 %)
6- NASO-PHARYNX	(5,4 %)		
7- LYMPHOME	(4,2 %)	30 %	variable
8- FOIE	(4,1 %)	25 %	15 %
9- OESOPHAGE	(4,0 %)	44 %	peu élevée(1-5 %)
10- PROSTATE	(3,8 %)	peu élevé	
11- VESSIE	(3,2 %)	61 %	10-15 %
12- LEUCEMIE	(2,8 %)	10 %	variable

5. Coopération entre les oncogènes

Les oncogènes sont probablement en cause dans toutes les formes de cancérogenèses *in vivo* quelle qu'en soit l'étiologie virale, environnementale, alimentaire et familiale. Des perturbations successives de plusieurs oncogènes et des coopérations entre eux sont requises pour conférer à la cellule, à chaque étape, des

avantages lui permettant d'échapper chaque fois un peu plus à la régulation du cycle cellulaire et au contrôle par le milieu environnant.

Il a été montré, *in vitro*, qu'une collaboration entre au moins deux oncogènes serait nécessaire pour l'obtention d'une transformation cellulaire efficace (Hunter, 1991).

D'une manière générale, les produits des oncogènes à action nucléaire (*c-myc*, *L-myc*, *N-myc*, *fos*, *jun*) agissent en coopération avec ceux siégeant aux niveaux membranaire et cytoplasmique (*H-ras*, *K-ras*, *N-ras*, *erbB-2*, Weinberg, 1985). En effet, si l'activation d'un seul oncogène appartenant à l'une des deux classes citées peut produire l'immortalisation cellulaire, c'est-à-dire, la capacité pour la cellule de croître indéfiniment en culture, celle-ci est en revanche incapable d'induire le caractère tumorigène qui est la capacité des cellules à former des tumeurs une fois transplantées chez l'animal (souris *nude*). Une combinaison des effets de deux oncogènes est donc nécessaire pour réaliser la transformation tumorale complète des cellules. Ainsi les gènes *ras* ont la capacité de transformer de façon stable des lignées cellulaires immortalisées exprimant *c-myc* et de coopérer avec *c-myc*, préalablement surexprimé lors d'une étape prénéoplasique, pour conférer un pouvoir transformant (Land et coll., 1983, Yancopoulos et coll., 1985).

En fait, la collaboration des oncogènes cytoplasmiques et des oncogènes nucléaires est de type complémentaire plutôt qu'additif (Herrlich et Ponta, 1989, Hinds et coll., 1989). L'activation des protooncogènes cytoplasmiques se fait par des *stimuli* externes. Ainsi, le niveau d'expression des oncogènes nucléaires augmentent et alors interviennent dans la formation des complexes qui induisent la transcription de certains gènes comme par exemple la collagénase qui est une protéine abondante dans les cellules tumorales. Ce modèle est valorisé par le fait que *i)* les oncogènes cytoplasmiques codent souvent des kinases dont l'action de phosphorylation est importante dans la régulation de certaines protéines (Weinberg, 1985) et *ii)* les oncogènes nucléaires *jun*, *fos*, *myc* et *myb* codent des facteurs de transcriptions (Gutman et Wazylyk, 1991; Herrlich et Ponta, 1989; Weinberg, 1985).

6. Rappel sommaire des techniques de mise en évidence des oncogènes, anti-oncogènes et de leurs produits

La mise en évidence d'un oncogène ou d'un anti-oncogène peut être réalisée dans le génome en cas d'amplification du gène par la mise en évidence d'ARNm dans le cytoplasme ou dans la protéine. Nous décrirons brièvement dans ce sous-chapitre différentes techniques utilisées pour étudier l'expression de ces gènes ou de leurs produits.

6.1. Etudes d'amplification de gènes

6.1.1. Southern blotting (Southern, 1975) : C'est la méthode de référence pour détecter les altérations des gènes. L'ADN des cellules tumorales est extrait, purifié puis traité par une enzyme de restriction. Après électrophorèse en gel, l'ADN est transféré sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose. Il est ensuite hybridé avec une sonde spécifique marquée. L'ADN d'un tissu normal peut servir de contrôle. Le niveau d'amplification est estimé par le rapport de l'intensité du signal des deux bandes correspondantes.

6.1.2. Slot blotting : L'ADN est appliqué directement sur la membrane. On élimine ainsi les étapes de digestion enzymatique, d'électrophorèse et de transfert. L'amplification est quantifiée de la même façon que le *Southern blotting*. Les méthodes de *slot blotting* sont rapides et relativement moins onéreuses. Les translocations ou réarrangement de gènes ne peuvent pas être détectés en l'absence de coupure de l'ADN et de séparation électrophorétique. Par contre elle est mieux adaptée à la mesure de l'intensité du signal d'hybridation.

6.1.3. Réaction de polymérisation en chaîne différentielle : Egalement appelée réaction de polymérisation en chaîne quantitative (Q-PCR), elle permet de rechercher le nombre de copies d'un gène donné à partir d'une co-amplification avec un gène de référence à copie unique dans la même réaction de PCR. Le nombre de copie du gène étudié est estimé par le rapport de l'intensité de marquage des deux bandes d'ADN amplifié (Neubauer et coll., 1992; Liu et coll., 1992). La quantification peut être faite par (i) la méthode de Southern après marquage radioactif (Slamon et coll., 1987; Gutman et coll., 1989; Tsuda et coll., 1989; Borresen et coll., 1990; Olson et coll., 1991) ou non-radioactif (Edorh et coll., 1995b; Rihn et coll., 1995a; Rihn et coll., 1995b; Rihn et coll., 1995c), (ii) par slot dot (dot blot ou dépôt manuel en spot), (iii) par dilution (Ro et coll., 1989; Olson et coll., 1991; Paterson et coll., 1991 Dawkins et coll., 1993), (iv) et par visualisation directe sur gel après coloration au bromure d'éthidium (Christopoulos et coll., 1991; Nakayama et coll., 1992; Sestini et coll., 1994). Cette dernière technique est moins précise que celle utilisant l'hybridation sur membrane.

6.1.4. Hybridation *in situ* : Cette méthode permet d'identifier des séquences spécifiques de nucléotides sur coupe avec des sondes oligonucléotidiques. Elle permet de localiser à la fois l'ADN et l'ARN dans les cellules et les échantillons tissulaires (Singer et coll., 1986).

6.1.5. PCR *in situ* : Cette méthode dérivée des deux précédentes, fait intervenir une amplification spécifique d'un segment d'ADN au cours de laquelle est incorporé un nucléotide modifié qui sera détecté par immunohistochimie par exemple (Kallioniemi et coll., 1992).

6.2. Détection des ARN messagers

Les ARN produits par un gène donné peuvent être détectés par Northern blotting, hybridation *in situ* ou RT-PCR *in situ* (PCR *in situ* après transcription inverse).

6.3. Détection de l'expression des oncoprotéines

6.3.1. Immunohistochimie : Réalisée sur coupes de tissus frais ou inclus en paraffine, elle utilise des anticorps monoclonaux marqués avec un composé fluorescent ou une enzyme. L'immunohistochimie présente deux avantages majeurs : (i) évaluation qualitative de la présence de la distribution de différents marqueurs tumoraux, (ii) évaluation de l'hétérogénéité tumorale, (iii) recherche de l'expression des oncogènes. Les techniques immunohistochimiques sont essentiellement qualitatives. Elles sont cependant critiquables puisqu'elles sont liées à la subjectivité de l'examineur. Les analyseurs d'image pourraient apporter une réponse quantitative mais ils sont coûteux.

6.3.2. Immunoblotting : Il permet l'étude de l'expression d'une protéine à partir d'électrophorèse d'extrait protéique de tissu (Slamon et coll., 1987; Venter et coll., 1987; Borg et coll., 1990).

6.3.3. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) : Utilisée *in vitro* sur des extraits de tissus, elle permet la recherche spécifique d'antigènes.

La plupart du temps, seules les techniques de Southern et de slot blot sont utilisées dans le cadre de l'analyse de l'amplification d'un gène et l'immunohistochimie et l'ELISA sont utilisées pour la recherche de l'hyperexpression des oncoprotéines.

En pratique, il peut être intéressant de rechercher différents marqueurs en cas de processus tumoral étant donné la diversité des cancers du sein. Il sera ainsi possible d'apporter des précisions diagnostiques et pronostiques pour la lésion observée. En recherche, ces techniques sont très utiles pour mettre en évidence des anomalies du fonctionnement de cellules tumorales et tenter de comprendre la cascade d'évènements ayant pu amener à la transformation cellulaire.

Aussi avons-nous entrepris une étude de l'expression des protéines ras, c-erbB-2, p53 et pS2 dans deux types de tumeurs mammaires bien caractérisées : Maladie de Paget et des carcinomes canaux infiltrants.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

1. Les prélèvements

Les études que nous avons réalisées ont été effectuées à partir de tissus mammaires provenant de biopsie ou de mastectomie inclus en paraffine provenant du Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques.

Pour l'étude de la maladie de Paget mammaire

23 échantillons fixés dans le liquide de Dubosq-Brazil (Bouin alcoolique).

Pour l'étude immunohistochimique de c-erbB-2, p53, c-Ha-ras, pS2 et la quantification du nombre de copies du c-erbB-2

Le liquide de Bouin alcoolique habituellement utilisé au service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques du Centre Alexis Vautrin induit malheureusement des liaisons moléculaires irréversibles empêchant toute étude ultérieure par biologie moléculaire. Pour pouvoir réaliser une étude par PCR quantitative, les tissus ont été fixés dans du formol tamponné (Figure 11) moins bon conservateur morphologique, mais permettant les études de biologie moléculaire. Au total, 37 prélèvements de carcinomes canaux infiltrants ont été utilisés. 3 cas de grade I, 16 cas de grade II, et 18 cas de grade III selon le *grading* histopronostique de Scarf- Bloom et Richardson (1957).

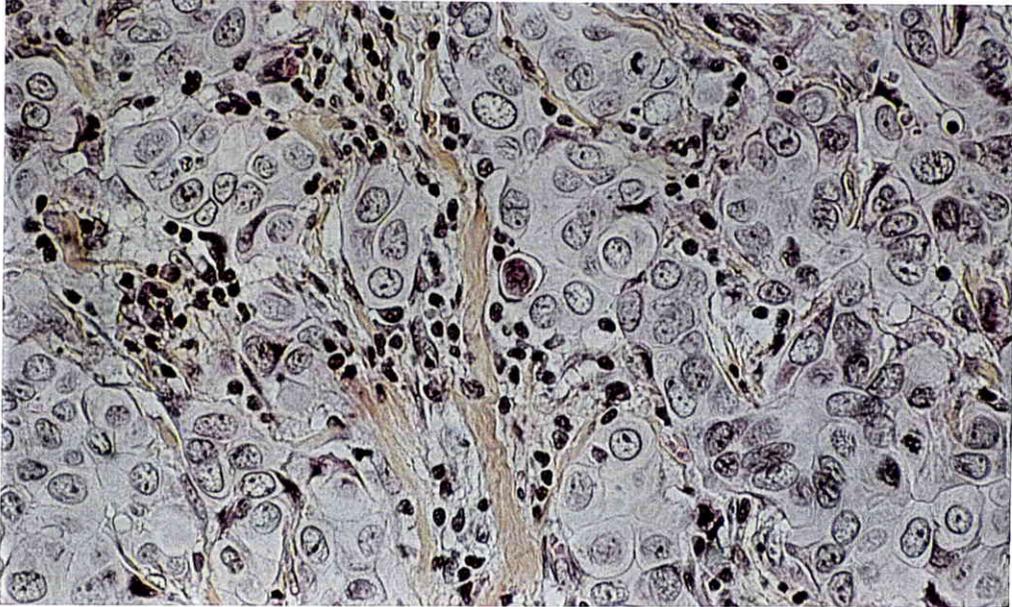


Figure 11 : Carcinome Canalaire Infiltrant. Fixation au formol tamponné puis coloration Hématoxyline-Eosine-Safran (Gr. x 250).

2. Méthodes

Les fragments de tissus destinés à l'extraction d'ADN ont été fixés dans du formol tamponné à 4 % (pH 7,4) à température ambiante pendant 12 à 24 heures en fonction de la taille du fragment, puis déshydratés par des bains successifs d'alcools : 50°, 70°, 90°, 100°, chaque bain dure 30 min. Après deux bains de toluène, 2x30 min, les fragments sont inclus dans de la paraffine à 60°C pendant 2 heures.

2.1. Immunohistochimie

2.1.1. Techniques immunohistochimiques pour la mise en évidence de l'oncoprotéine c-erbB-2

L'oncoprotéine c-erbB-2 a été détectée à l'aide de trois anticorps : un anticorps polyclonal de lapin A485 (Dako S. A., Trappes, France), un anticorps monoclonal de

souris NCL-CB11 (Novocastra, Le Perray en Yvelines, France). Tous deux sont dirigés contre le domaine intra-cytoplasmique de la protéine transmembranaire c-erbB-2 et un anticorps monoclonal de souris NCL-CBE1 (Novocastra) dirigé contre le domaine externe de la protéine c-erbB-2.

Des coupes histologiques de 5 μm d'épaisseur, déparaffinées, sont placées dans une solution à 3 % de peroxyde d'hydrogène afin de neutraliser les activités peroxydases endogènes pouvant être présentes dans les tissus, puis rincées dans du PBS : Phosphate Buffered Saline (NaCl : 135 mM, Na_2HPO_4 : 8 mM, KCl : 2 mM, KH_2PO_4 : 1 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 1 mM, pH 7,2). Afin de réduire les marquages non-spécifiques, les coupes sont recouvertes d'une solution de sérum normal de chèvre pendant 5 minutes (solution de blocage prête à l'emploi, Kit LSAB-K681, Dako). L'excès de sérum est ensuite éliminé avant de réaliser l'incubation avec l'anticorps primaire anti-oncoprotéine c-erbB-2 A485 (dilué dans le tampon : Tris/HCl : 0,05 M, NaCl : 0,1 M, NaN_3 : 15 mM, pH 7,2). L'anticorps est ensuite dilué au 1/100e dans du sérum physiologique tamponné (PBS) à pH 7,2. La concentration de l'anticorps primaire anti-oncoprotéine c-erbB-2 A485 est de 1,5 g/L.

L'anticorps primaire anti-oncoprotéine c-erbB-2 NCL-CB11 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) est dilué au 1/40e dans du PBS, pH 7,2 et l'anticorps primaire anti-oncoprotéine c-erbB-2 NCL-CBE1 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dilué au 1/10e dans du PBS, pH 7,2. Ces dilutions ont été optimisées après différents essais.

Les incubations sont (i) d'une heure en chambre humide à 37°C pour l'anticorps primaire A485, (ii) d'une heure à température ambiante pour l'anticorps primaire NCL-CB11 et (iii) de toute la nuit à +4°C pour l'anticorps primaire NCL-CBE1. Après rinçage dans deux bains de PBS de 5 min, les coupes sont incubées avec un anticorps de liaison biotinylé anti-souris et anti-lapin (Dako) 10 min à température ambiante. Après rinçage au PBS 5 min, les lames sont recouvertes d'une solution de conjugué streptavidine-peroxydase (Dako) 10 min puis rincées. La révélation est réalisée avec

l'Amino-3-Ethyl-9-Carbazole (AEC, Dako-K697). Après une contre-coloration à l'hématoxyline de Harris, les préparations sont montées entre lame et lamelle en milieu aqueux puis observées.

2.1.2. Technique immunohistochimique pour la mise en évidence de p53

Les coupes paraffinées sont étalées sur des lames Superfrost (art. n° 04-1300 Réf. LLR3 Plus chez CML). 2 coupes sériées (2 lames) sont nécessaires : (i) 1 coupe pour p53 de chez Dako (Dako p53 D07 - Code M 7001), dilution au 1/100, et (ii) 1 coupe témoin négatif (PBS à la place de l'anticorps primaire).

Les lames sont incubées à 37° la nuit. Après déparaffinage, les lames sont immergées dans un panier et une boîte adaptés au micro-ondes (boîte Vitri™, CML, Nemours, France) contenant 200 mL de tampon citrate 10 mM pH = 6 (TC : 9 mL d'acide citrique 21,01 g pour 1 L d'eau distillée), 41 mL de citrate de sodium 29,41 g pour 1 L d'eau distillée), qsp 500 mL. La boîte est chauffée dans le four à micro-ondes à puissance maximale (750 W) pendant 5 min cinq fois de suite. Entre chaque cycle, il est important de réajuster le niveau du tampon avec de l'eau distillée pour éviter le séchage des coupes pendant l'ébullition. Pour que les résultats soient reproductibles, il faut mettre toujours la même masse dans le four à micro-ondes (nous mettons 1 boîte + 25 lames [fantômes si besoin] + 200 mL de tampon). Les lames sont refroidies dans la boîte hors du four pendant 20 minutes à température ambiante puis rincées 5 minutes dans le PBS. Les lames sont essuyées puis les coupes sont entourées au Dakopen™ (qui évite la diffusion de l'anticorps hors des coupes). Les préparations sont recouvertes avec l'anticorps primaire anti-p53, incubées 2 heures à température ambiante puis rincées au PBS (2x3 min).

L'anticorps secondaire anti-immunoglobuline de souris et de lapin biotinylé est rajouté pendant 20 min. (Antimouse immunoglobulin E 433-Dako) dilué au 1/200 dans le PBS. Après un double rinçage au PBS (2x3 min.), la streptavidine (P397-Dako) diluée au 1/200 dans du PBS est ajoutée pendant 20 min.

Après deux rinçages dans le PBS, les lames sont ensuite placées dans une solution contenant 0,120 g de DAB (3,3'-Di-Amino-Benzidine ou le 3,3',4,4'-Tétra-Aminobiphényl Tétrahydrochloride; Sigma) dans 200 mL de PBS auquel on ajoute 60 µL de H₂O₂ à 3 %).

Après rinçage à l'eau courante 10 -15 min., une contre-coloration est réalisée avec de l'hématoxyline de Harris 15 secondes. Après un rinçage à l'eau distillée, les lames sont successivement immergées dans (i) de l'eau ammoniacquée (2 mL d'ammoniaque pour un litre d'eau), (ii) de l'eau bidistillée, (iii) de l'alcool absolu (passage) et enfin (iv) du toluène, puis montées à l'Eukitt™ (Surgipath, Labonord, France).

2.1.3. Technique immunohistochimique pour la mise en évidence de l'oncoprotéine pS2

Le traitement des lames jusqu'au traitement par le sérum est identique à celui du c-erbB-2. Les coupes sont incubées en présence de l'anticorps primaire anti-oncoprotéine pS2 (anticorps monoclonal pS2 prêt pour emploi : AM 190-5M, EuroBio, Les Ulis, France) à température ambiante pour 2 heures.

Après deux rinçages au PBS 5 min, les coupes sont incubées avec un anticorps de liaison biotinylé de souris et de lapin (Dako) 10 min à température ambiante. Après rinçage au PBS 5 min, la révélation à l'AEC et le montage des coupes sont réalisés comme décrit ci-dessus.

2.1.4. Technique immunohistochimique pour la mise en évidence de l'oncoprotéine c-Ha-ras

Après traitement des lames comme ci-dessus et après blocage par le sérum de chèvre, la préparation est incubée une heure à température ambiante avec l'anticorps primaire anti-oncoprotéine monoclonal c-Ha-ras (10 µg/mL) prêt pour emploi (Clone F132-62, Boehringer Mannheim, France).

Après deux rinçages au PBS de 5 min, les coupes sont incubées avec un anticorps de liaison biotinylé antisouris et antilapin (Dako) 10 min à température ambiante. Après rinçage au PBS de 5 min, les lames sont recouvertes d'une solution de conjugué streptavidine-peroxydase (Dako) 10 min et de nouveau rincées. La révélation à l'AEC est réalisée comme précédemment. Après une contre-coloration à l'hématoxyline de Harris, les préparations sont montées entre lame et lamelle en milieu aqueux puis observées.

2.2. Réaction de polymérisation en chaîne *in vitro*

2.2.1. Extraction d'ADN à partir des tissus paraffinés

Préparation des coupes de tissus :

- découper la paraffine excédentaire autour du tissu,
- mettre le tissu dans 1 mL d'iso-octane dans un tube eppendorf,
- agiter par inversion pendant 30 min,
- centrifuger pendant 5 min à 13000 x g,
- enlever l'iso-octane en excès et recommencer l'opération,
- laver le culot 2 fois avec 500 µL d'éthanol absolu,
- ajouter 100 µL d'acétone au culot et laisser évaporer l'acétone au thermobloc à 45°C.

Extraction de l'ADN :

- 10 µL de tampon de digestion sont ajoutés dans les tubes eppendorf contenant les coupes de tissus, pour 1 mL de tampon de digestion préparer le tampon Tris base : 50 mM, pH = 8,5; EDTA : 1 mM; Tween 20 : 1 %; Protéinase K : 1 mg/mL, incubé à 55°C, 3 heures, centrifuger brièvement à 13000 x g, inactiver la protéinase K par chauffage 9 min à 95°C. Après centrifugation, le culot constitué de débris de tissus est éliminé. Prélever 10 µL du surnageant pour l'amplification enzymatique, le reste étant conservé à -20°C.

2.2.2. PCR quantitative

La PCR quantitative est une méthodologie récente permettant de quantifier l'ADN produit par amplification à la quantité présente initialement dans le milieu réactionnel. Cette étude nécessite deux sortes d'amorces. Les amorces de l'oncogène *c-erbB-2* qui peuvent exister en un certain nombre de copies dans les lésions tumorales du sein et les amorces *IFN- γ* . Ces dernières ont été utilisées pour servir de témoin interne, car elles sont présentes à raison d'une seule copie par équivalent-génome. Les différentes étapes successives de la PCR sont les suivantes : dénaturation (fusion de l'ADN) à 94°C, 1 min, hybridation (appariement des amorces) à 55°C, 1 min puis élongation des brins néosynthétisés à 72°C, 1 min.

Les échantillons sont soumis à 30 cycles d'amplification. Le 30 ième cycle se termine par une phase d'élongation de 10 min. Les contrôles positifs ou négatifs sont réalisés en ajoutant ou en omettant l'ADN génomique dans les tubes dont les mélanges sont préparés à cet effet.

2.2.3. Marquage non-radioactif

Le marquage non-radioactif a été réalisé grâce à l'incorporation directe de la digoxigénine-11-dUTP dans le mélange PCR. Les différents concentrations et volumes se retrouvent dans le tableau suivant. La valeur du mélange réactionnel est de 100 μ L.

La réaction est effectuée dans des tubes de 500 μ L sous un volume de 100 μ L (Tableau 3).

Tableau 3 : Mélange réactionnel pour la réaction de polymérisation en chaîne.

Produits	Concentration par 100 μL	Volume (quantité finale)
ADN	10 à 100 ng	4 μL
Tampon AMP	*	10 μL
MgCl ₂	1,5 mM	3 μL
dNTP dont :		
dATP	200 μM	0,2 μL
dCTP	200 μM	0,2 μL
dGTP	200 μM	0,2 μL
dTTP	130 μM	0,13 μL
Dig 11dUTP	70 μM	7 μL
Primer codant (<i>c-erbB-2</i>)	0,12 μM	0,6 μL
Primer non codant (<i>c-erbB-2</i>)	0,12 μM	0,6 μL
Primer codant (<i>IFN-γ</i>)	0,12 μM	0,6 μL
Primer non codant (<i>IFN-γ</i>)	0,12 μM	0,6 μL
Taq Polymérase	1 U/ μL	0,1 μL
H ₂ O		72,8 μL

*Tampon AMP : Tris/HCl 100 mM, pH = 8,3 (à température ambiante), KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM, gélatine 0,01 %.

Pour l'amplification de l'ADN de l'oncogène *c-erbB-2* extrait des lésions néoplasiques du sein, le mélange ci-dessus a été réalisé avec l'utilisation des amorces d'amplification du kit Oncolyzer™ permettant la co-amplification des gènes *c-erbB-2* et *FN- γ* (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA) : (i) amorce sens (*c-erbB-2*) : 5' CCT-CTG-ACG-TCC-ATC-ATC-TC 3', (ii) amorce antisens (*c-erbB-2*) : 5' CGG-ATC-TTC-TGC-TGC-CGT-CG 3', (iii) amorce sens (*IFN- γ*) : 5' TCT-TTT-CTT-TCC-CGA-TAG-GT 3', (iv) amorce antisens (*IFN- γ*) : 5' CTG-GGA-TGC-TCT-TCG-ACC-TC 3'.

Les échantillons sont mélangés par agitation, centrifugés brièvement et recouverts de 100 μL d'huile de paraffine afin d'éviter l'évaporation.

2.2.4. Marquage radioactif

L'amplification est réalisée dans un milieu contenant un nucléotide marqué au ^{32}P (Kinoshita et coll., 1992). Après la PCR, l'électrophorèse est réalisée sur gel de polyacrylamide. Ensuite, le gel est appliqué contre un film radiographique. Les autoradiogrammes sont "scannés" à l'aide du Model Lumiscan 50 (Lumisys Inc., Sunnyvale, USA) et l'analyse d'images a été réalisée par le programme FIPS+TM (Film Image Processing System Plus software, Physikalisch-Technische Werkstätten GmbH, Freiburg, Germany). Les résultats sont exprimés en absorbance en fonction de la distance parcourue par le faisceau. La longueur d'onde est de 633 nm (source Hélium-Néon). La résolution spatiale est de 200 μm .

2.2.5. Electrophorèse en gel d'agarose pour les marquages non radioactifs

Des gels à 1,5 % d'agarose (p/v) dans du TAE 1x (TAE 50x : Tris base (1 M), acide acétique (57,1 ml) , $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 0,5 M à pH = 8,5), additionnés de 6 microlitres d'une solution de bromure d'éthidium à 10 mg/mL ont été préparés.

A 5 μL de produit d'amplification sont ajoutés 1 μL de tampon d'échantillon (bleu de bromophénol à 0,25 % (p/v), Ficoll-400TM à 15 % (p/v, Pharmacia). La migration est faite sous une différence de potentiel de 5 à 6 V/cm. Les bandes d'ADN sont visualisées sur un banc à rayons ultra-violet (280 nm).

2.2.6. Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 16 % pour les produits d'amplification radioactifs

Le gel de polyacrylamide est réalisé avec 2 mL de mélange d'acrylamide/bis acrylamide (Bio-Rad) 19/1, vol/vol. La solution mère d'acrylamide et de bisacrylamide sont respectivement de 40 % et de 2 %, 3 mL de TBE x 1, 35 μL d'ammonium persulfate à 10 %, 5 mL de N, N, N', N'-tétraméthyléthylène diamine : TEMED, Bio-Rad.

2.2.7. Transfert sur membrane

Après transfert à sec, l'ADN est fixé aux ultra-violets ($12 \mu\text{joules}/\text{cm}^2$) à 254 nm pendant 2 min sur une membrane en NitrocelluloseTM (Stratagene).

2.2.8. Lavages et révélation

La membrane est successivement (i) équilibrée 2 min dans du tampon 1 (Tris/HCl 100 mM, NaCl 150 mM; pH = 7,5), (ii) 30 min à température ambiante dans du tampon 2 [tampon 1 contenant 1 % d'agent bloquant (Blocking reagent, Boehringer Mannheim) : p/v], rincée 2 min dans du tampon 1, (iii) immergée 30 min dans 20 mL de tampon 1 avec 4 μL d'anticorps anti-digoxigénine (Boehringer Mannheim), (iv) lavée 2 fois 15 min avec du tampon 1, (v) équilibrée 3 minutes dans le tampon 3 (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl_2 50 mM, pH = 9,5), (vi) placée à l'obscurité dans un sac contenant 10 mL de tampon 3. Ce tampon est composé du tampon 1, additionné de 45 μl NBT [75 mg de Nitrobleu de Tétrazolium (B. Mannheim) pour 1 mL du mélange diméthylformamide (Sigma)/eau 7/3 vol/vol.] et de 35 μL BCIP [50 mg de 5-Bromo-Chloro-3 IndolylPhosphate (B. Mannheim) dans 1 mL du mélange de diméthylformamide/eau]. Ce tampon permet la révélation de l'ADN quand celui-ci est visible (quelques min à quelques heures pour les signaux les plus faibles), la réaction est arrêtée en lavant la membrane à température ambiante, 5 min dans du tampon TE à pH = 8 (10 mM Tris HCl, pH 8; 1 mM EDTA).

2.2.9. Transparisation de la membrane de nitrocellulose

La membrane de nitrocellulose est séchée à l'air, puis immergée dans du toluène pour la transpariser. Ensuite, elle est plongée dans un mélange de toluène et d'acrytol (Labonord, Villeneuve d'Ascq, France) puis déposée sur une lame de verre recouverte de ce même mélange. Le tout est séché à l'air. L'intensité des bandes d'ADN amplifiées a été mesurée par un spectrophotomètre à scanner laser (Dual Wavelength Flying Spot ScannerTM, Shimadzu CS-9000) en utilisant le programme FDU-3TM (Shimadzu, Kyoto, Japon). Cet appareil utilise un double faisceau laser et effectue une

lecture en mode d'absorption/transmission à 700 nm, avec une longueur d'onde de référence de 420 nm. La taille des faisceaux est de 1 mm²). Le nombre de copie du gène *c-erbB-2* est déterminé par le rapport des intensités du signal des deux bandes (correspondant respectivement au *c-erbB-2* et à l'*IFN-γ*) multiplié par 0,65.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

1. Expression de l'oncoprotéine c-erbB-2 dans la maladie de Paget mammaire. Etude immunohistochimique à l'aide de trois anticorps.

Les premiers résultats concernent l'expression de l'oncoprotéine c-erbB-2 dans la maladie de Paget mammaire.

EXPRESSION DE L'ONCOPROTÉINE c-erbB-2 DANS LA MALADIE DE PAGET MAMMAIRE

Étude immunohistochimique à l'aide de trois anticorps

A. EDORH¹, R.M. PARACHE¹, C. MIGEON¹,
B. N'SOSSANI¹, B. RIHN²

EDORH A., PARACHE R.M., MIGEON C., N'SOSSANI B., RIHN B. – Expression de l'oncoprotéine c-erbB-2 dans la maladie de Paget mammaire. Étude immunohistochimique à l'aide de trois anticorps.

Path Biol, 1995, 43, n° 7, 584-589.

EDORH A., PARACHE R.M., MIGEON C., N'SOSSANI B., RIHN B. – Expression of c-erbB-2 oncoprotein in mammary Paget's disease. Immunohistochemical study by using 3 different antibodies. (*In French*).

Path Biol, 1995, 43, n° 7, 584-589.

RÉSUMÉ : Une hyperexpression de l'oncoprotéine c-erbB-2 a été démontrée dans les carcinomes mammaires où elle serait liée à un mauvais pronostic. Notre étude concerne 23 cas de maladie de Paget mammaire associée à un carcinome intracanalair dans 13 cas, à un carcinome intracanalair présumé micro-invasif dans 2 cas, à un carcinome canalair infiltrant à composante intracanalair prédominante dans 6 cas, enfin à un carcinome canalair infiltrant dans 2 cas. La présence de l'oncoprotéine c-erbB-2 a été recherchée par la méthode immunohistochimique en utilisant dans tous les cas trois anticorps différents : Ac polyclonal de lapin A 485 de Dako, Ac monoclonal de souris NCL-CB11 de Novocastra et Ac monoclonal de souris NCL-CBE1 de Novocastra. Une hyperexpression de l'oncoprotéine c-erbB-2 est observée dans 21 des 23 cas étudiés sous la forme d'un immunomarquage membranaire net au niveau de toutes les cellules carcinomateuses quel que soit leur siège intra-épidermique ou intra-glandulaire. Il n'a pas été observé d'immunomarquage dans deux cas présentant une composante glandulaire de type intracanalair pur. Les résultats

SUMMARY : An overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein has been demonstrated in the breast cancer and has been associated with a poor prognosis. Our study involved 23 cases of mammary Paget's disease which was found to be associated with the intraductal carcinomas in 13 cases, the intraductal carcinomas supposed micro-invasive in 2 cases, the infiltrating ductal carcinomas with predominant intraductal component in 6 cases and the infiltrating ductal carcinomas in 2 cases. The presence of c-erbB-2 oncoprotein has been determined immunohistochemically with 3 different antibodies : rabbit anti-human c-erbB-2 oncoprotein A485 (Dako), c-erbB-2 oncoprotein (internal domain) mouse monoclonal antibody NCL-CB11 (Novocastra), and c-erbB-2 oncoprotein (external domain) mouse monoclonal antibody NCL-CBE1 (Novocastra). An overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein has been observed in 21 of the 23 studied cases. We noted an intense membrane staining in the intraepidermal or intraglandular tumour cells of mammary Paget's disease. Any staining has been observed in 2 cases with glandular component of pure intraduc-

Suite du résumé page suivante

Summary continued on next page

Manuscrit reçu à la Rédaction le 30 décembre 1994. Accepté révisé le 3 avril 1995.

1. Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Centre Régional de Lutte contre le Cancer (Centre Alexis Vautrin), 54511 VANDŒUVRE-LÈS-NANCY Cedex (France).

2. Institut National de Recherche et Sécurité, avenue de Bourgogne, BP 27, 54501 VANDŒUVRE-LÈS-NANCY Cedex (France).

Résumé (suite)

sont identiques quel que soit l'anticorps utilisé. Cette étude confirme que l'hyperexpression de l'oncoprotéine *c-erbB-2* semble en grande partie corrélée aux caractéristiques cytologiques de la prolifération tumorale. Dans une étude précédente concernant la maladie de Paget mammaire il a été noté une corrélation entre cette hyperexpression et la présence de cellules tumorales de grande taille. Nous retrouvons aussi cette notion dans la série de maladie de Paget étudiée : les cellules néoplasiques identifiées dans les différentes composantes tumorales sont de grande taille et présentent un cytoplasme abondant. Les résultats obtenus apportent un argument supplémentaire en faveur de la nature adénocarcinomeuse de la maladie de Paget du sein et montrent que l'hyperexpression de l'oncoprotéine *c-erbB-2* dans les néoplasies mammaires n'est pas constamment en rapport avec un pronostic défavorable.

MOTS-CLÉS : Maladie de Paget mammaire. – Oncoprotéine *c-erbB-2*. – Immunohistochimie. – Hyperexpression.

Summary (continued)

tal type. These results are identical whatever the antibody used. In a previous study concerning mammary Paget's disease, it has been noted a correlation between this overexpression and presence of large malignant cells. We also have found this notion in mammary Paget's disease where the *c-erbB-2* positive neoplastic cells in the different tumour components were large with prominent cytoplasm. The obtained results argue strongly for adenocarcinomatous origin for mammary Paget's disease and exhibit that the overexpression of *c-erbB-2* oncoprotein was not constantly in correlation with a poor prognosis.

KEY-WORDS : Mammary Paget's disease. – *c-erbB-2* oncoprotein. – Immunohistochemistry. – Overexpression.

INTRODUCTION

Une surexpression de l'oncoprotéine *c-erbB-2* a été démontrée dans différents types de cancers humains en particulier dans les cancers du sein, où elle serait liée à un mauvais pronostic [6, 10, 12, 14]. Cette surexpression est généralement associée à une amplification du gène correspondant *c-erbB-2* présentant une analogie de structure avec le facteur de croissance épidermique EGF [1, 3, 5, 11, 15, 16, 19]. La présence de l'oncoprotéine *c-erbB-2* peut être détectée par immunohistochimie à l'aide d'anticorps dirigés le plus souvent contre la partie intracellulaire de la protéine portant l'activité tyrosine kinase.

La maladie de Paget mammaire représente moins de 2% des lésions néoplasiques du sein. Elle se présente comme une lésion eczématiforme du mamelon le plus souvent associée à un carcinome mammaire sous-jacent et concerne des femmes âgées de plus de 50 ans [4]. La série étudiée comporte 23 cas de maladie de Paget avec composante intramammaire invasive ou purement intracanalair. Le but de l'étude est de comparer l'expression de l'oncoprotéine au niveau des composantes néoplasiques épidermique et intraglandulaire, de préciser la signification de cette expression et accessoirement de contrôler les caractéristiques de l'immunomarquage en fonction de l'anticorps utilisé.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Patients

Vingt trois cas de maladie de Paget mammaire ont été étudiés au Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques du Centre Régional de Lutte contre le Cancer (Centre Alexis Vautrin, 54511 Vandœuvre) soit sur pièces de mastectomies, soit sur prélèvements biopsiques, fixés dans le liquide de Dubosq-Brazil et inclus en paraffine. Le diagnostic anatomopathologique a été réalisé par deux lecteurs indépendants.

Techniques immunohistochimiques

La mise en évidence de l'oncoprotéine a été effectuée par immunohistochimie avec utilisation de trois anticorps : un anticorps polyclonal de lapin A485 (Dako S.A., Trappes F-78196), un anticorps monoclonal de souris NCL-CB11 (Novocastra, 78610 Le Perray-en-Yvelines). Ces deux anticorps étant dirigés contre le domaine intra-cytoplasmique de la protéine transmembranaire *c-erbB-2* et un anticorps monoclonal de souris NCL-CBE1 (Novocastra) dirigé contre le domaine externe de la protéine *c-erbB-2*.

Des coupes histologiques de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées au niveau d'un ou plusieurs blocs d'inclusion représentatifs de la lésion à étudier. Les coupes, déparaffinées, sont placées dans une solution à 3 % de peroxyde d'hydrogène afin de neutraliser les activités peroxydases endogènes pouvant être présentes dans les tissus, puis rincées dans une solution de tampon phosphate PBS (NaCl : 135 mM, Na₂HPO₄ : 8 mM, KCl : 2 mM, KH₂PO₄ : 1 mM, MgCl₂.6H₂O : 1 mM, pH 7,2). Afin de réduire les marquages non-spécifiques, les coupes sont recouvertes d'une solution de sérum normal de chèvre (solution de blocage

prête à l'emploi, Kit LSAB-K681, Dako) pendant 5 minutes. L'excès de sérum est ensuite éliminé avant de réaliser l'incubation avec l'anticorps primaire anti-oncoprotéine c-erbB-2 A485 (contenu dans le solvant suivant : Tris/HCl : 0,05 M, NaCl : 0,1 M, Na₂S₂O₈ : 15 mM, pH 7,2) à la dilution de 1/100^e dans du tampon phosphate PBS, pH 7,2. La concentration de l'anticorps primaire anti-oncoprotéine c-erbB-2 A485 est de 1,5 µg/l.

L'anticorps primaire anti-oncoprotéine c-erbB-2 NCL-CB11 (10 µg/ml) est dilué au 1/40^e dans du PBS, pH 7,2 et l'anticorps primaire anti-oncoprotéine c-erbB-2 NCL-CBE1 (25 µg/ml) dilué au 1/10^e dans du PBS, pH 7,2. Ces dilutions ont été déterminées après différents essais.

Les incubations sont respectivement une heure en chambre humide à 37°C (anticorps primaire A485), une heure à température ambiante (anticorps primaire NCL-CB11) et toute la nuit à +4°C (anticorps primaire NCL-CBE1). Toutes les incubations ont été effectuées à l'abri de la lumière. Après rinçage dans deux bains de PBS de 5 minutes, les coupes sont incubées avec un anticorps de liaison biotinylé anti-avidin et anti-avidin (Dako) pendant 10 minutes à température ambiante. Puis les lames sont rincées dans deux bains de PBS de 5 minutes, recouvertes d'une solution de conjugué streptavidine-peroxydase (Dako) pendant dix minutes et de nouveau rincées. La révélation est réalisée avec un substrat à l'AEC (Dako-K697). Le Kit de révélation contient 1 ml d'AEC (amino-3-éthyl-9-carbazole) dilué dans du diméthylformamide à 3 %, 2 fois 15 ml de tampon acétate 0,1 M, pH 5,2 contenant 15 mM Na₂S₂O₈, et 1 ml de peroxyde d'hydrogène à 3 %. La révélation (2 ml de tampon acétate 0,1 M, 1 goutte d'AEC et une goutte de peroxyde d'hydrogène à 3 %) s'effectue pendant 10 à 15 minutes à température ambiante. Enfin, les coupes ont subi une contre-coloration à l'hématoxyline de Harris et sont montées entre lame et lamelle en milieu aqueux.

Le contrôle positif correspond à une lésion reconnue présentant un intense marquage avec l'anticorps anti-oncoprotéine c-erbB-2. Un contrôle négatif est réalisé en omettant l'anticorps primaire lors de la technique immunohistochimique. Ces contrôles sont intégrés à chaque série de lames techniques. Toute série, pour laquelle ces derniers n'étaient pas satisfaisants, a été réalisée une seconde fois. En cas de désaccord sur l'interprétation des cas, de nouvelles coupes ont été réalisées. Seules ont été considérées comme positives, les lésions présentant un marquage épithélial membranaire net.

RÉSULTATS

La lésion cutanée mamelonnaire est associée à un carcinome intracanalair dans 13 cas, à un carcinome intracanalair présumé micro-invasif dans 2 cas, à un carcinome canalaire infiltrant à composante intracanalair prédominante dans 6 cas, enfin à un carcinome canalaire infiltrant dans 2 cas (tableau I). Dans 8 cas, il n'existe pas d'envahissement ganglionnaire (14 à 46 ganglions examinés par curage). Dans un seul cas, il existe une micrométastase ganglionnaire (sinusale corticale) au niveau de l'un des 33 ganglions examinés. La présence de l'oncoprotéine dans les 23 cas de maladie de Paget du mamelon a été recherchée par la méthode immunohistochimique à la fois au niveau des cellules tumorales intra-épidermiques et au niveau de la composante intracanalair et infiltrante de l'adénocarcinome sous-jacent. Une hyperexpression de l'oncoprotéine c-erbB-2 est observée dans 21 des 23 cas étudiés sous la forme d'un immunomarquage membranaire net au niveau de toutes les cellules carcinomateuses quel que soit leur siège intra-épidermique

TABLEAU I. – Étude de c-erbB-2 selon le type histologique de carcinome mammaire associé à la maladie de Paget.

TABLE I. – Study of c-erbB-2 according to histologic type of mammary carcinoma associated with Paget disease.

	Nombre de cas	c-erbB-2 positif	c-erbB-2 négatif
Carcinome intracanalair	13	11	2
Carcinome intracanalair présumé micro-invasif	2	2	0
Carcinome canalaire infiltrant à composante intracanalair prédominante	6	6	0
Carcinome canalaire infiltrant	2	2	0
Total	23	21	2

(fig. 1) ou intraglandulaire (fig. 2). Il n'a pas été observé d'immunomarquage dans 2 cas présentant une composante glandulaire de type intracanalair pur.

L'ensemble des 21 cas montrant une hyperexpression de l'oncoprotéine présentait un immunomarquage quel que soit l'anticorps utilisé, mais il existe une légère différence d'intensité selon l'anticorps (le marquage est toujours plus intense avec l'anticorps A 485 de Dako identifiant le domaine interne).

Les structures néoplasiques sont toujours constituées de grandes cellules (fig. 3), quel que soit leur siège (intracanalair ou intraépidermique) et la nature non invasive ou infiltrante du processus (fig. 4). La composante tumorale intracanalair associée présente le même profil de marquage que la composante invasive : elle est de type comédocarcinome pur ou mixte, associant des aspects de type massif, comédocarcinome et micropapillaire. Par ailleurs, nous avons accessoirement constaté que cet immunomarquage a permis de confirmer le caractère micro-invasif d'une lésion intracanalair.

DISCUSSION

Certaines équipes ont montré qu'il existe une étroite corrélation entre la présence d'une amplification du gène c-erbB-2 et la présence de l'oncoprotéine, révélée par un marquage épithélial membranaire [8].

La mise en évidence de l'oncoprotéine c-erbB-2 par immunohistochimie est de réalisation facile à partir de tissus fixés au Bouin alcoolique et inclus en paraffine [3]. La positivité des cas repose sur la présence d'un marquage membranaire associé ou non à un marquage cytoplasmique [2, 10, 11, 17]. Le marquage cytoplasmique non-spécifique semble pouvoir être évité par

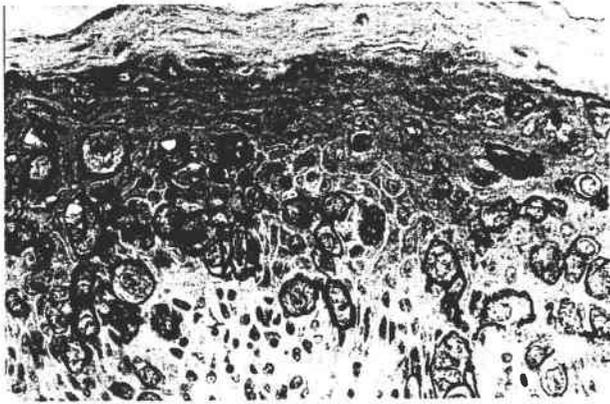


Fig. 1. - Aspect général de l'immunomarquage des cellules de Paget dans l'épiderme mamelonnaire (Gr x 320).
Fig. 1. - Immunostaining of Paget's cells in the nipple epidermis: general aspect. (Magnification x 320).



Fig. 2. - Composante carcinomateuse intracanalairé sous-aréolaire. Atteinte partielle d'un canal (Gr x 200).
Fig. 2. - Intraductal subareolar carcinomatous component. Partial involvement of a canal. (Magnification x 200).

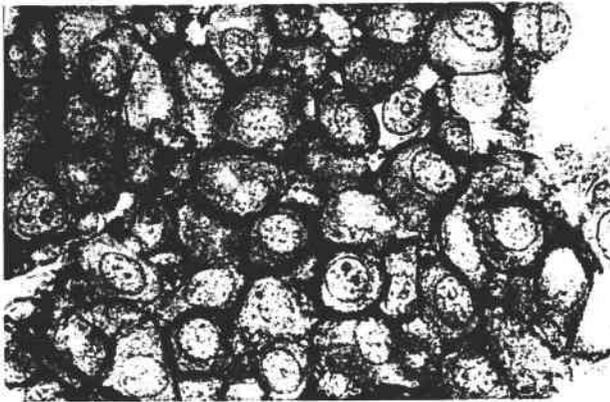


Fig. 3. - Immunomarquage membranaire des cellules néoplasiques de la composante carcinomateuse intracanalairé (Gr x 1280).
Fig. 3. - Membrane immunostaining of neoplastic cells of the intraductal carcinomatous component. (Magnification x 1280).



Fig. 4. - Immunomarquage des cellules néoplasiques de la composante carcinomateuse infiltrante (Gr x 320).
Fig. 4. - Membrane immunostaining of neoplastic cells of the infiltrating carcinomatous component. (Magnification x 320).

une bonne adaptation des dilutions d'anticorps, des durées et des conditions d'incubation. Toutefois comme d'autres auteurs, nous avons noté dans certains cas la persistance d'un discret marquage cytoplasmique d'interprétation difficile et de signification inconnue au niveau des structures épithéliales saines.

Keatings *et al.* [7] ont également étudié l'expression de l'oncoprotéine c-erbB-2 en immunohistochimie dans la maladie de Paget mammaire et extramammaire. Dans les 12 cas de maladie de Paget mammaire étudiés, il a été observé un marquage membranaire des cellules néoplasiques intra-épidermiques. Des carcinomes canalaire sous-jacents ont été égale-

ment étudiés dans 9 de ces 12 cas. Tous sont positifs pour le c-erbB-2 et dans 8 des 9 cas, la composante *in situ* était de type comédocarcinome ou solide. Dans l'étude de Lammie *et al.* [9], sur 45 patients, 41 (91 %) présentaient un marquage positif du c-erbB-2 au niveau de la maladie de Paget. Ces observations rejoignent celles de notre étude où 91 % des cas présentent des cellules de Paget immunomarquées (21 cas sur 23). Dans cette même étude de Lammie *et al.*, le marquage de l'oncoprotéine a permis d'observer aussi de petites zones de micro-invasion à l'instar de la nôtre, mais tout autre marqueur épithélial aurait sans doute apporté la même information.

En outre, dans les études de Lammie *et al.* [9], Vielh *et al.* [20] et Wolber *et al.* [21], il a été observé, comme dans notre série, un marquage à la fois cytoplasmique et membranaire du c-erbB-2 au niveau des cellules néoplasiques.

Dans une étude plus récente, De Potter *et al.* [13] ont montré qu'un facteur chimiotactique est synthétisé et libéré par les kératinocytes épidermiques. Ce facteur attire les cellules tumorales d'origine glandulaire hyperexprimant l'oncoprotéine neu. Dans cette même étude, parmi les 25 cas de maladie de Paget étudiés, 24 cas ont montré un marquage au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules tumorales (anticorps monoclonal de souris 3B5). Il a été également observé un marquage au niveau de 14 carcinomes canaux in situ et de 2 carcinomes canaux infiltrants.

Notre travail confirme que l'hyperexpression de l'oncoprotéine c-erbB-2 semble en grande partie corrélée aux caractéristiques cytologiques de la prolifération tumorale : les cellules identifiées dans les différentes composantes néoplasiques sont toutes des éléments de grande taille à cytoplasme abondant. D'autres études s'avèrent nécessaires pour évaluer l'intérêt pronostique de ce gène. Selon Slamon [18] le proto-oncogène c-erbB-2 est amplifié dans 25 à 30% des cas de carcinomes mammaires et cette amplification génique est corrélée avec un délai de rechute plus court par rapport aux tumeurs sans amplification de ce gène. L'étude de ce gène, de son amplification et de sa surexpression pourrait donc avoir un intérêt pronostique.

Notre étude, qui concerne un processus néoplasique à développement majoritairement intraépithélial (canaux et épidermique) montre que l'hyperexpression fréquemment retrouvée dans les cellules carcinomateuses n'est pas toujours en rapport avec une augmentation de l'agressivité des cellules tumorales.

Dans la série étudiée, les lésions invasives sont elles aussi caractérisées par une hyperexpression de l'oncoprotéine, mais il s'agit de lésions relativement peu agressives (6 carcinomes infiltrants à composante intracanaux prédominante, 2 carcinomes intracanaux avec présomption de micro-invasion et seulement 2 carcinomes canaux infiltrants classiques) s'accompagnant dans un seul cas d'une micro-métastase ganglionnaire.

CONCLUSION

L'hyperexpression quasi-constante que nous avons mise en évidence dans notre série concerne à la fois des néoplasies non invasives (intracanaux et intra-épidermique) et des carcinomes infiltrants apparemment peu agressifs (composante invasive minoritaire et extension ganglionnaire faible). Cette constatation semble en contradiction avec le caractère classiquement péjoratif de cette hyperexpression.

Les résultats obtenus dans notre étude apportent accessoirement un argument supplémentaire en faveur de la nature adénocarcinomateuse de la maladie de Paget du sein. Ils confirment l'identité propre de cette affection néoplasique mamelonnaire et de la composante carcinomateuse intra-glandulaire sous-jacente parmi les différentes variétés anatomo-cliniques de cancer du sein. Ils montrent surtout que l'hyperexpression de l'oncoprotéine c-erbB-2 n'est pas constamment en rapport avec l'agressivité d'une néoplasie mammaire. Il se peut qu'elle soit en rapport avec le caractère macrocellulaire de la prolifération tumorale. La fréquence de cette même hyperexpression dans les carcinomes intracanaux sans maladie de Paget d'une part, et les constatations récentes relatives aux rapports entre kératinocytes et cellules de Paget d'autre part, témoignent du rôle possible de l'oncogène dans la progression intra-épithéliale du processus néoplasique.

RÉFÉRENCES

- AKIYAMA T., SUDO C., OGAWARA H., TOYOSHIMA K., YAMAMOTO T. – The product of the human c-erbB-2 gene: a 185 kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*, 1986, 232, 1644-1646.
- ALFRED D.J., CLARK G.M., MOLINA R., TANDON A.K., SCHNITT S.J., GILCHRIST K.W., OSBORNE C.K., TORMEY D.C., MCGUIRE W.L. – Overexpression of *Her2/neu* and its relationship with other prognostic factors change during the progression of *in situ* to invasive breast cancer. *Hum. Pathol.*, 1992, 23, 974-979.
- BARTKOVA J., BARNES D.M., MILLIS R.R., GULLICK W.J. – Immunohistochemical demonstration of c-erbB-2 protein in mammary ductal carcinoma *in situ*. *Hum. Pathol.*, 1990, 21, 1164-1167.
- CHAUDARY M.A., MILLIS R.R., LANE E.B., MILLER N.A. – Paget's disease of the nipple: a ten year review including clinical, pathological and immunohistochemical findings. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1986, 8, 139-146.
- CORBETT I.P., HENRY J.A., ANGUS B., WATCHORN C.J., WILKINSON L., HENNESSY C., GULLICK W.J., TUZI N.L., MAY F.E.B., WESTLEY B.R., HORNE C.H.W. – NCL-CB11, a new monoclonal antibody recognizing the internal domain of the c-erbB-2 oncogene protein effective for use on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J. Pathol.*, 1990, 161, 15-25.
- GULLICK W.J., BERGER M.S., BENNETT P.L.P., ROTHBARD J.B., WATERFIELD M.D. – Expression of the c-erbB-2 protein in normal and transformed cells. *Int. J. Cancer*, 1987, 40, 246-254.
- KEATINGS L., SINCLAIR J., WRIGHT C., CORBETT I.P., WATCHORN C., HENNESSY C., ANGUS B., LENNARD T., HORNE C.H.W. – c-erbB-2 oncoprotein expression in mammary and extramammary Paget's disease: an immunohistochemical study. *Histopathology*, 1990, 17, 243-247.
- KERNS B.J.M., PENCE J.C., HUPER G., KINNEY R.B., IGLEHART J.D. – c-erbB-2 expression in breast cancer detected by immunoblotting and immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 1990, 38, 1823-1830.
- LAMMIE G.A., BARNES D.M., MILLIS R.R., GULLICK W.J. – An immunohistochemical study of the presence of c-erbB-2 protein in Paget's disease of the nipple. *Histopathology*, 1989, 15, 505-514.
- LOVEKIN C., ELLIS I.O., LOCKER A., ROBERTSON J.F.R., BELL J., NICHOLSON R., GULLICK W.J., ELSTON C.W., BLAMEY R.W. – c-erbB-2 oncoprotein expression in primary and advanced breast cancer. *Br. J. Cancer*, 1991, 63, 439-443.

11. MEISSNER K., RIVIERE A., HAUPT G., LONING T. – Study of neu-protein expression in mammary Paget's disease with and without underlying breast carcinoma and in extramammary Paget's disease. *Am. J. Pathol.*, 1990, 137, 1305-1309.
12. PERRENT J.J. – *c-erbB-2* oncogene as a prognostic marker in breast cancer. *Br. J. Cancer*, 1991, 63, 328-332.
13. De POTTER C.R., EECKHOUT I., SCHELFHOUT A.M., GEERTS M.L., ROELS H.J. – Keratinocyte induced chemotaxis in the pathogenesis of Paget's disease of the breast. *Histopathology*, 1994, 24, 349-356.
14. RAMACHANDRA S., MACHIN L., ASHLEY S., MONAGHAN P., GUSTERSON B.A. – Immunohistochemical distribution of *c-erbB-2* in *in situ* breast carcinoma - A detailed morphological analysis. *J. Pathol.*, 1990, 161, 7-14.
15. SCHECHTER A.L., STERN D.F., VAIDYANATHAN L., DECKER S.J., DREBIN A., GREENE M.I., WEINBERG R.A. – The *neu* oncogene: an *erb-B* - related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*, 1984, 312, 513-516.
16. SCHECHTER A.L., HUNG M.C., VAIDYANATHAN L., WEINBERG R.A., YANG FENG T.L., FRANCKE U., ULLRICH A., COUSSENS L. – The *neu* gene: an *erbB*-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science*, 1985, 229, 976-978.
17. SINGLETON T.P., NIEHANS G.A., GU F., LITZ C.E., HAGEN K., QIU Q., KIANG D.T., STRICKLER J.G. – Detection of *c-erbB-2* activation in paraffin-embedded tissue by immunohistochemistry. *Hum. Pathol.*, 1992, 23, 1141-1150.
18. SLAMON D.J., GODOLPHIN W., JONES L.A., HOLT J.A., WONG S.G., KEITH D.E., LEVIN W.J., STUART S.G., UDOLVE J., ULLRICH A., PRESS M.F. – Studies of the *HER-2/neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 1989, 244, 707-712.
19. VENTER D.J., TUZI N.L., KUMAR S., GULLICK W.J. – Overexpression of the *c-erbB-2* oncoprotein in human breast carcinomas: Immunohistological assessment correlates with gene amplification. *Lancet*, 1987, July 11, 69-72.
20. VIELH P., VALIDIRE P., KHEIRALLAH S., CAMPANA F., FOURQUET A., DI-BONITO L. – Paget's disease of the nipple without clinically and radiologically detectable breast tumor. Histochemical and immunohistochemical study of 44 cases. *Pathol. Res. Pract.*, 1993, 189, 150-5.
21. WOLBER R.A., DUPUIS B.A., WICK M.R. – Expression of *c-erbB-2* oncoprotein in mammary and extramammary Paget's disease. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1991, 96, 243-247.

2. Détermination du niveau d'amplification du proto-oncogène c-erbB-2 dans les carcinomes mammaires : Etude comparative entre un marquage non radioactif et radioactif

Nous avons recherché le nombre de copies de l'oncogène *c-erbB-2* dans les carcinomes canauxaux infiltrants par la technique de PCR *in vitro* en comparant le marquage froid à un marquage radioactif.

DETERMINATION OF AMPLIFICATION LEVEL OF THE *c-erbB-2* PROTO-ONCOGENE IN HUMAN BREAST CARCINOMAS: A COMPARATIVE STUDY BETWEEN NON-RADIOACTIVE AND RADIOACTIVE LABELLING

A. EDORH^{1,2}, R.M. PARACHE², B. N'SOSSANI², M.C. BOTTIN³, J.L. MERLIN¹,
P. COLOSETTI¹, F. GUILLEMIN¹, A. LE FAOU³ and B. RIHN³

¹Laboratoire de Recherche, Centre Régional de Lutte contre le Cancer (Centre Alexis Vautrin),
Avenue de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

²Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Centre Régional de Lutte contre le Cancer
(Centre Alexis Vautrin), Avenue de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

³Service de Microbiologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nancy,
Avenue de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

Accepted September 25, 1995

Abstract - A quantitative method of polymerase chain reaction (PCR™) using both digoxigenin and radioactive labelled probes has been used for the detection of the *c-erbB-2* proto-oncogene amplification in breast carcinomas with formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *c-erbB-2* proto-oncogene amplification has been demonstrated in 14 infiltrating ductal carcinomas. The technique consisted of the co-amplification of *c-erbB-2* and *IFN-γ* (interferon- γ) genes. The latter was considered as a single copy gene per genome-equivalent. The aim of this study was to compare two quantitative PCR techniques based on the incorporation of either digoxigenin-11-dUTP™ or ³²P-dCTP, during amplification. For the colorimetric method, using the Dig™ system, after electrophoresis and transfer, the specific bands were revealed with a chromogenic substrate of phosphatase. Their intensity estimated by scanning photometry following blot transparisation. After electrophoresis, the radioactive gel was submitted to radioautography and the band intensities evaluated by scanning spectrophotometry. For the 14 samples, a good agreement between both methods was noted. The colorimetric method is a valuable alternative to radiolabelling due to: i) time saving, ii) reagent conservation, iii) safe manipulation and iv) sensitivity of the same order for both methods.

Key words: Breast cancer, *c-erbB-2* proto-oncogene, image analysis, quantitative PCR

INTRODUCTION

The *c-erbB-2* proto-oncogene, also referred as the *neu* or *HER-2*, encodes a glycoprotein molecule with tyrosine kinase activity of 185 kDa (Schechter *et al.*, 1984; Yarden and Weinberg, 1989). The structure of this protein is homologous to that of the epidermal growth factor receptor (Yamamoto *et al.*, 1986).

The *c-erbB-2* was firstly identified as an oncogene in chemically induced neuroblastomas in rats. Its putative role in human breast cancer, has arisen recently a considerable interest. In human primary breast carcinomas, amplification of the *c-erbB-2* gene has been detected in 25 to 30% of these tumors (Slamon *et al.*, 1989) and is accompanied usually by p185 over-expression (Dawkins *et al.*, 1993; Kerns *et al.*, 1990; Tsuda *et al.*, 1989). Most of these

tumors were associated with advanced clinical and histological markers. The estimation of the number of copies of *c-erbB-2* is usually achieved by hybridization with a radio-labelled probe, by estimating directly the quantity of radio-labelled DNA fragments, or recently by competitive PCR (Orlando *et al.*, 1994). Most of these methods give uncertain or approximate results.

For ascertaining the value of a non-radioactive method in the determination of the copy number of *c-erbB-2* gene in human tumors, we have amplified this gene along with *IFN- γ* . This latter one was chosen as the single copy reference gene. PCR of the DNA extracted from paraffin-embedded breast carcinomas was performed and its results were quantified by colorigenic and radioactive labelling of amplified DNA.

MATERIALS AND METHODS

Breast Tumors Sampling

Fourteen mammary lesions, from archival materials of the Department of Pathology of the Centre Alexis Vautrin (Vandoeuvre-lès-Nancy, France) were from either mastectomy or excision biopsy specimens (Etorh *et al.*, 1995). Areas of tumor were identified macroscopically. All samples were fixed in 4% buffered formaldehyde for 12 hrs. and paraffin embedded and processed overnight using a Tissue-Tek Vip Processor™ (Laboratoires Miles, Paris, France).

Histologic Evaluation

Hematoxylin-eosin-stained tissue sections were observed and the presence of an adequate volume of cancer tissue was assessed. The carcinomas were classified using the World Health Organization (WHO, 1981) Histological Classification of Breast tumors of 1981 and graded according to Bloom and Richardson (1957). All the selected lesions were infiltrating ductal carcinomas: one of grade I, seven of grade II, six of grade III.

Reagents

Agarose NA was obtained from Pharmacia (St. Quentin-Yvelines, France) whereas *Taq* (*Thermus aquaticus*) polymerase (E.C. 2.7.7.7) came from Eurobio (Paris, France), plastic bags from Gibco-BRL/Life Technologies (Cergy Pontoise, France), bromophenol blue and ethidium bromide from Sigma Chem. (St. Louis, MO, USA). Digoxigenin-11-dUTP (Digoxigenin-3-0-methylcarbonyl- ϵ -aminocaproyl-[5-(3-aminoallyl)-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate] tetralithium salt, dNTP (100 mM, stock solution), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine-salt (BCIP), 4-nitroblue

tetrazolium chloride (NBT) were provided by Boehringer Mannheim (Meylan, France). All other chemicals were purchased from Merck (Chelles, France). The nitrocellulose membrane used was from Stratagene (La Jolla, CA, USA) and acrylamide/bisacrylamide, ammonium persulfate, N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA).

DNA Extraction and Amplification

Briefly, two sections (5 μ m thick), placed in 1.5 ml microcentrifuge tubes with 1 ml of iso-octane, were pelleted. The iso-octane was discarded and this step was repeated once. Ethanol (100%, v/v) was added for in order to remove iso-octane and evaporated. Then, 100 μ l of digestion buffer were added (50 mM Tris•HCl, 1 mM EDTA, 1% w/v of proteinase K (EC 3. 4. 21.14, Boehringer Mannheim), pH 8.5). Samples were incubated for 3 hrs. at 55°C, and proteinase K was inactivated by heating at 95°C, 10 min. PCR was carried out with 2 μ l of supernatant.

The primers were provided by Clontech Laboratories (Palo Alto, CA, USA): i) primers for *c-erbB-2* (sense: ⁵CCT-CTG-ACG-TCC-ATC-ATC-TC³, antisense: ⁵CGG-ATC-TTC-TGC-TGC-CGT-CG³); ii) primers of *IFN- γ* (sense: ⁵TCT-TTT-CTT-TCC-CGA-TAG-GT³, antisense: ⁵CTG-GGA-TGC-TCT-TCG-ACC-TC³).

The polymerase chain reaction was performed in a PCR™ apparatus (Gene E Osi, Paris, France) with PCR buffer: 10 mM Tris•HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1 mg/ml gelatine, 0.2 mM dNTP, 100 ng of genomic DNA (2 μ l), 20 pM of each primer set (*c-erbB-2* and *IFN- γ*) and 1 unit of *Taq* DNA polymerase, pH 8.3. For radioactive labelling 0.1 μ l radioactive ³²P-dCTP with a specific activity of 3000 Ci/mmol (Institut de Chimie Nucléaire, Orsay, France) was added to the PCR mixture (25 μ l) as described by Sestini *et al.* (1994). For non-radioactive labelling, 0.2 mM of dTTP were replaced with a mixture of 0.7 mM digoxigenin-dUTP™ and 1.3 mM dTTP.

The amplification consisted of 30 cycles of: i) denaturation at 94°C for 60 sec.; ii) primer annealing at 55°C for 60 sec., iii) primer extension at 72°C for 60 sec. The reaction was terminated by 10 min. of primer extension at 72°C. *IFN- γ* and *c-erbB-2* primers amplified 98 bp and 150 bp fragment, respectively.

Evaluation of the Number of Copies of *c-erbB-2*

-Non-radioactive method: Following electrophoresis the gels were incubated in denaturing buffer for 30 min. (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) and equilibrated in neutral buffer for 2 x 15 min. (NaCl 1.5 M, Tris•HCl 0.5 M, EDTA 1 mM, pH 7.2). DNA samples were transferred to nitrocellulose filter paper (Nitrocellulose, Stratagene) by a dry transfer method for 4 hrs. according to Rihh *et al.* (1995b).

The DNA was fixed at 80°C and the membrane was washed in TP1 buffer (Tris•HCl 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) for 3 min., then incubated in TP1 buffer containing 0.5% (w/v) Blocking Reagent™ (Boehringer Mannheim) for 30 min. and

rinsed again briefly in TP1 buffer. The membrane was further incubated for 30 min. in the antibody conjugate solution (anti-digoxigenin-phosphatase labelled: 1/5,000 dilution in buffer TP1), washed 2 x 15 min. in TP1 buffer, and further equilibrated for 2 min. in TP2 buffer (Tris•HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, pH 9.5). Membranes were sealed in plastic bags with 10 ml of coloring solution, consisting of buffer TP2 with 45 µl NBT solution (75 mg/ml in a mix of 0.7 v dimethylformamide and 0.3 v deionized water) and 35 µl of BCIP solution (50 mg of BCIP/ml in dimethylformamide). Following revelation of DNA bands (generally between 30 min. and 1 hr.), the membrane was washed in TE buffer (Tris•HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) for 5 min. in order to stop the reaction.

The nitrocellulose membrane was immersed in a toluene bath and fixed with a mixture of acrytol (Labonord, Villeneuve d'Ascq, France) and toluene on a glass slide to render it transparent (Rihn *et al.*, 1995a). Intensity of the staining of the PCR amplified fragments was evaluated with a scanning spectrophotometer (Dual Wavelength Flying Spot Scanner™, Shimadzu CS-9000) using the software FDU-3™ (Shimadzu, Kyoto, Japan). The scanning spectrophotometer worked with an absorption/transmission mode with autoblanck, a laser wavelength of 700 nm, a reference wavelength of 420 nm (beam sizes of 1.0 x 1.0 mm²). The ordinate of the recorder was set to lie between 0.0 to 2.0 absorbance units, and the abscissa represented the optical path in mm (Rihn *et al.*, 1995c).

– *Radioactive method:* The ³²P-dCTP amplified products were resolved following 16% polyacrylamide gel electrophoresis in triplicate. The gels were dried and autoradiographed (RPN 1675 Films™, Amersham, Paris, France) overnight at -80°C.

The radioautograms were then scanned with a Model Lumiscan 50 (Lumisys Inc., Sunnyvale, USA). Image processing and analysis was performed with the Film Image Processing System Plus software (FIPS+™, Physikalisch-Technische Werkstätten GmbH, Freiburg, Germany). The results were expressed in absorbance as a function of the beam course. The laser was 633 nm (He-Ne source). The spatial resolution of the scanner used was of 200 µm.

– *Both methods:* The level of *c-erbB-2* proto-oncogene amplification was determined comparing the signals given by the amplified fragments corresponding to *c-erbB-2* and *IFN-γ* genes respectively on the same lane. The results were expressed as the ratio of the peak area obtained with the two bands. Each sample was tested in triplicate and the mean of the results was calculated. A correction was introduced for taking into account the different sizes of the amplified fragments. The peak area for *c-erbB-2* was multiplied by the ratio of the amplified products (*c-erbB-2*/ *IFN-γ*) i.e. 0.65. The final result was considered as representative of the number of copy of *c-erbB-2* gene per tumor cell.

RESULTS AND DISCUSSION

Although tumors were of the same histopathological type, a great difference of number of copy of *c-erbB2* gene was noted. After amplification of extracted DNA and scanning, the ratio of the peak areas of both genes gave values varying from 1 to 15 (Table 1). However no correlation could be established between the histopathological grade

Table 1 Determination of *c-erbB2* copy number in ductal carcinomas.

Tumor Grade	<i>c-erbB-2</i> / <i>IFN</i> Ratio		Approximate <i>c-erbB-2</i> Copy Number per Genome Equivalent
	Radioactive Labelling	Colorigenic Labelling	
I	1.02	1.32	1
III	0.60	1.33	1
II	0.63	0.90	1
III	0.65	1.46	1
II	1.14	1.16	1
II	2.86	1.84	2 to 3
II	2.91	2.02	2 to 3
II	2.71	1.67	2 to 3
II	1.88	2.63	2 to 3
II	2.04	1.62	2 to 3
III	2.46	2.00	2 to 3
III	1.77	2.95	2 to 3
III	3.94	2.61	2 to 3
III	14.41	14.91	14 to 15

and the number of copies of the *c-erbB-2* gene. In most cases, 1 to 4 copies were found. The only high amplification level with 14 copies corresponded to a grade III lesion. Minute differences were noted between the two labelling methods which results were in good concordance. Fig. 1 shows a typical result obtained by colorigenic (Fig 1A) and radioactive detection (Fig. 1B) of the amplified fragments. The radioactive and colorigenic methods

radioautogram (Borresen *et al.*, 1990; Gutman *et al.*, 1989; Machotka *et al.*, 1989; Olsson *et al.*, 1991; Slamon *et al.*, 1987; Tavassoli *et al.*, 1989; Tsuda *et al.*, 1989). Gutman *et al.* (1989) have mixed different quantities of extracted tumor DNA with mouse DNA, keeping constant the total quantity of DNA. The *c-erbB-2* gene of mouse and tumor, respectively, were compared. A direct quantification after competitive PCR has also been proposed by photographic

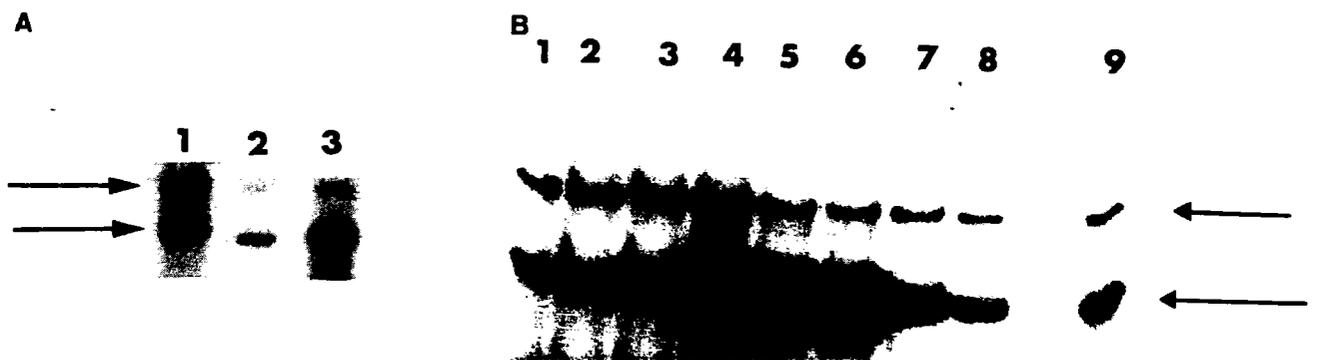


Fig. 1 Southern blot of *c-erbB-2* and *IFN- γ* genes co-amplification products in infiltrating ductal breast carcinomas. **A**) Colorigenic labelling: tumor A (lane 1) shows a 2-fold amplification; tumor B (lane 2): 4-fold amplification; tumor C (lane 3): 15-fold amplification of *c-erbB-2*. **B**) ³²P labelling: tumor A, (lanes 1, 2, 3) shows 4-fold amplification of *c-erbB-2*; tumor B, 14-fold amplification (lanes 4, 5, 6: same as tumor C, 1A); tumor C (lanes 7, 8, 9), 3-fold amplification. —> (upper) fragment corresponding to *IFN- γ* (150 bp); —> (lower) fragment corresponding to *c-erbB-2* (98 bp).

gave very identical results although they correspond to separate amplifications. Digoxigenin-dUTP™ labelling give strong staining of band making easy the scanning of transpirised membranes (Fig. 2).

Different techniques have been used for estimating the *c-erbB-2* gene amplification in breast tumors. Dot blot of dilutions of crude DNA preparations and ³²P labelled probes (Dawkins *et al.*, 1993; Olsson *et al.*, 1991; Paterson *et al.*, 1991; Ro *et al.*, 1989) can give only a rough estimate and non-specific hybridization cannot be ruled out. Gene amplification followed by Southern blotting and hybridization permits also an estimation of the amplification level of the *c-erbB-2* gene by densitometric evaluation of the

evaluation of the intensity of band fluorescence in BET-containing gels (Sestini *et al.*, 1994).

For the evaluation of the number of copies of *c-erbB-2* gene in tissues a reference is necessary. The most favoured method arising in the comparison to a single copy genome (Borresen *et al.*, 1990; Dawkins *et al.*, 1993; Gutman *et al.*, 1989; Machotka *et al.*, 1989; Olsson *et al.*, 1991; Paterson *et al.*, 1991; Ro *et al.*, 1989; Slamon *et al.*, 1987; Tavassoli *et al.*, 1989; Tsuda *et al.*, 1989). Another method is the comparison with the mouse *c-erbB-2* gene which is present as a single copy gene (Gutman *et al.*, 1989). Another possibility is the case of a haploid genome which gives a unique copy of the gene (Olsson *et al.*,

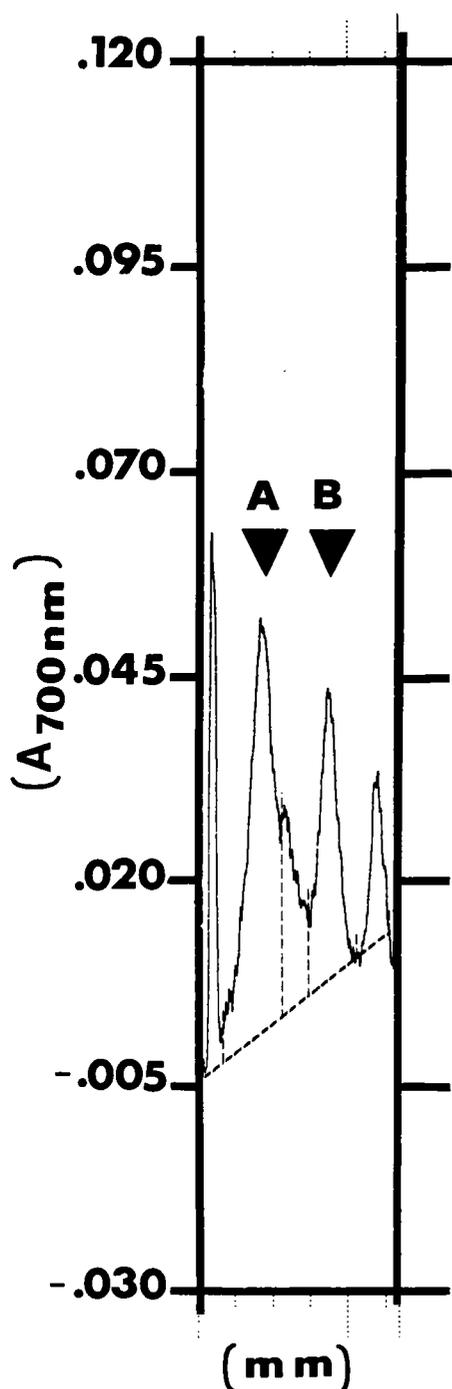


Fig. 2 Colorigenic method for the estimating the *c-erbB-2* copy number. Densitogram of the absorbance (left and right ordinates) versus the optical course onto the blot. **Peak A** corresponding to the *c-erbB-2* proto-oncogene amplified fragment; **Peak B** corresponding to the amplified fragment from the reference *IFN- γ* gene.

1991). But we, we have chosen the *IFN- γ* gene which is present as a single copy in the human genome.

However, when estimating the number of copies of the *c-erbB-2* gene, the sample must consist almost exclusively of tumor tissue to prevent any underestimation. This was the case in our study. Other pitfall must be averted. Direct estimation by hybridization is not very sensitive. The establishment of a relation between the number of copies present before gene amplification and the quantity of amplified DNA after reaction is difficult since several variables cannot be controlled by the experimenter (Sestini *et al.*, 1994).

The estimation of the number of copy of a target gene is possible by using competitive PCR introducing an internal standard (e. g., a competitor DNA fragment amplified with the same primers but distinguishable from that one studied by size of restriction enzyme cleavage site) (Ferré *et al.*, 1994; Sestini *et al.*, 1994). Thus co-amplification of *c-erbB-2* and *IFN- γ* genes may be less reliable than the preceding technique. However, in our study, as primers are of close G+C% allowing the use of the same annealing temperature, as the amplified fragment sizes are not very different, and as a correcting factor has been introduced for taking into account the difference in size, we can consider that a good estimate of the number of *c-erbB-2* copies in breast tumors was obtained.

A great variation in the number of copies of *c-erbB-2* gene in breast tumor has been reported by the studies reported above. We have shown that even if one type of tumor is studied, this number of copies varies in a wide range without any apparent relation with the grading of the lesion. However our study enclosed a limited number of cases and further cases should be added.

CONCLUSION

Non-radioactive labelling of DNA is not of common

use for estimating a gene copy number. However, our results show clearly that digoxigenin-dUTP™ labelling provides the same results than ³²P labelling when considering accuracy and sensitivity. Such a non-radioactive method should be favoured since results are obtained more rapidly, reagents may be conserved over months, and their manipulation does not require specific installations.

REFERENCES

- Bloom, H.J. and Richardson, W.W., Histological grading and prognosis in breast cancer: a study of 1,409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br. J. Cancer* 1957, **11**: 359-377.
- Borresen, A.L., Ottestad, L., Gaustad, A., Andersen, T.I., Heikkilä, Jahnsen, T., Tveit, K.M. and Nesland J.M., Amplification and protein over-expression of the *neu/HER/c-erbB-2* protooncogene in human breast carcinomas: relationship to loss of gene sequences on chromosome 17, family history and prognosis. *Br. J. Cancer* 1990; **62**: 585-590.
- Dawkins, H.J.S., Robbins, P.D., Sarna, M., Carrello, S., Harvey, J.M. and Sterrett, G.F., *c-erbB-2* amplification and overexpression in breast cancer: Evaluation and comparison of Southern blot, slot dot, ELISA and immunohistochemistry. *Pathology* 1993, **25**: 124-132.
- Etorh, A., Parache, R.M., Migeon, C., N'sossani, B. and Rihn, B., Expression de l'oncoprotéine *c-erbB-2* dans la maladie de Paget mammaire: étude immunohisto-chimique à l'aide de trois anticorps. *Pathol. Biol.* 1995, **43**: 584-589.
- Ferré, F., Marchese, A., Pezzoli, P., Griffin, S., Buxton, E. and Boyer, V., Quantitative PCR: an overview. In: *The Polymerase Chain Reaction*. Mullis, K.B., Ferré, F. and Gibbs, R.A. (eds.), Birkhäuser, Boston, 1994, pp. 67-88.
- Gutman, M., Ravia, Y., Assaf, D., Yamamoto, T., Rozin, R. and Shiloh, Y., Amplification of *c-myc* and *c-erbB-2* protooncogenes in human solid tumors: Frequency and clinical significance. *Int. J. Cancer* 1989, **44**: 802-805.
- Kerns, B.J.M., Pence J.C., Huper, G., Kinney, R.B. and Iglehart, J.D., *c-erbB-2* expression in breast cancer detected by immunoblotting and immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 1990, **38**: 1823-1830.
- Machotka, S.V., Garrett, C.T., Schwartz, A.M. and Callahan, R., Amplification of the proto-oncogenes *int-2*, *c-erbB-2* and *c-myc* in human breast cancer. *Clin. chim. Acta* 1989, **184**: 207-218.
- Olsson, H., Borg, A., Fernö, M., Ranstam, J. and Sigurdsson, H., *Her-2/neu* and *int-2* proto-oncogene amplification in malignant breast tumors in relation to reproductive factors and exposure to exogenous hormones. *J. natn. Cancer Inst.* 1991, **83**: 1484-1487.
- Orlando, C., Sestini, R., Zentilin, L., Gelmini, S., Pinzani, P., Giacca, M. and Pazzagli, M., Image analysis in quantitative PCR. An application for the measurement of *c-erbB-2* oncogene amplification in DNA from human tumors. *J. Biolumin. Chemilumin.* 1994, **9**: 223-228.
- Paterson, M.C., Dietrich, K.D., Danyluk, J., Paterson, A.H.G., Lees, A.W., Jamil, N., Hanson, J., Jenkins, H., Krause, B.E., McBlain, W.A., Slamon, D.J. and Fourny, R.M., Correlation between *c-erbB-2* amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. *Cancer Res.* 1991, **51**: 556-567.
- Rihn, B., Bottin, M.C., Coulais, C. and Martinet, N., Evaluation of non-radioactive labelling of deoxyribonucleic acids. Part two: colorigenic methods and comparison with chemiluminescent methods. *J. biochem. biophys. Meth.* 1995a, **30**: 103-112.
- Rihn, B., Coulais, C., Bottin, M.C. and Martinet, N., Evaluation of non-radioactive labelling and detection of deoxyribonucleic acids. Part one: chemiluminescent methods. *J. biochem. biophys. Methods* 1995b, **30**: 91-102.
- Rihn, B., Coulais, C., Bottin, M.C., Zissu, D. and Etorh, A., Use of non-radioactive methods for the determination of transgene expression, sequence and copy-number. *Cell. mol. Biol.* 1995c, **41**: 907-915.
- Ro, J., El-Naggar, A., Ro, J.Y., Blick, M., Frye, D., Frascini, G., Fritsche, H. and Hortobagyi, G., *c-erbB-2* amplification in node-negative human breast cancer. *Cancer Res.* 1989; **49**: 6941-6944.
- Schechter, A.L., Stern, D.F., Vaidyanathan, L., Decker, S.J., Drebin, J.A., Greene, M.I. and Weinberg, R.A., The *neu* oncogene: an *erbB-2* related gene encoding a 185,000-Mr tumor antigen. *Nature* 1984, **312**: 513-516.
- Sestini, R., Orlando, C., Zentilin, L., Gelmini, S., Pinzani, P., Bianchi, S., Selli, C., Giacca, M. and Pazzagli, M., Measuring *c-erbB-2* oncogene amplification in fresh and paraffin-embedded tumors by competitive polymerase chain reaction. *Clin. Chem.* 1994, **40**: 630-636.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. and McGuire, W.L., Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the *HER-2/neu* oncogene. *Science* 1987, **235**: 177-182.
- Slamon, J.D., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., Press, M.F., Studies of the *HER-2/neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989, **244**: 707-712.
- Tavassoli, M., Quirke, P., Farzaneh, F., Lock, N.J., Mayne, L.V. and Kirkham, N., *c-erbB-2/c-erbA* co-amplification indicative of lymph node metastasis, and *c-myc* amplification of high tumor grade, in human breast carcinoma. *Br. J. Cancer* 1989, **60**: 505-510.
- Tsuda, H., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Hirota, T., Tsugane, S., Yamamoto, H., Miyajima, N., Toyoshima, K., Yamamoto, T., Yokota, J., Yoshida, T., Sakamoto, H., Terada, M. and Sugimura, T., Correlation between long-term survival in breast cancer patients and amplification of two putative oncogene co-amplification units: *hst-1/int-2* and *c-erbB-2/ear-1*. *Cancer Res.* 1989, **49**: 3104-

3108.

World Health Organization, *Histological Typing of Breast Tumors* (2 nd ed), WHO, Geneva, 1981, pp. 18-31.

Yamamoto, T., Ikawa, S., Akiyama, T., Semba, K., Nomura, N., Miyajima, N., Saito, T. and Toyoshima, K., Similarity of protein encoded by the human *c-erbB-2* gene to

epidermal growth factor receptor. *Nature* 1986, **319**: 230-234.

Yarden, Y. and Weinberg, R.A., Experimental approaches to hypothetical hormones: Detection of a candidate ligand of the *neu* proto-oncogene. *Proc. natn. Acad. Sci USA* 1989, **86**: 3179-3183.

3. Expression de *c-erbB-2*, *p53*, *c-Ha-ras*, *pS2* dans les carcinomes canauxaux infiltrants (CCI).

Nous avons détecté par immunohistochimie la présence des protéines *c-erbB-2*, *p53*, *c-Ha-ras*, *pS2* dans les carcinomes canauxaux infiltrants (CCI) et nous avons comparé les résultats d'amplification génique quantitative de l'oncogène *c-erbB-2* à ceux de l'immunohistochimie.

3.1. Expression du gène *c-erbB-2*

Les tumeurs présentant un marquage cytoplasmique avec renforcement membranaire ont été considérées comme positives (Figure 12). 13 cas de CCI sur les 37 présentaient un marquage positif (35 %), se répartissant en 1 cas de grade I (33 %), 5 cas de grade II (31 %), et 7 cas de grade III (39 %). Malgré le petit nombre de cas de grade I, il ne semble pas y avoir de différence entre les différents grades dans le pourcentage d'expression du *c-erbB-2*.

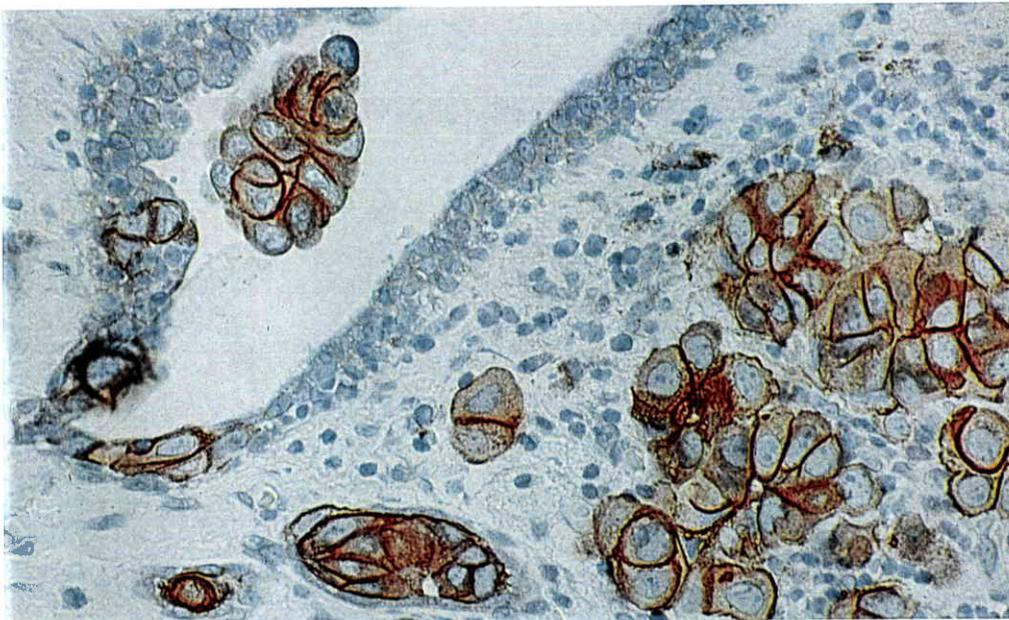


Figure 12 : *c-erbB-2* : Marquage membranaire des cellules néoplasiques des composantes invasive et intracanauxale d'un carcinome canauxal infiltrant de grade III (Gr. x 250).

3.2. Expression du gène *p53*

L'oncoprotéine *p53* s'accumule dans le noyau (Figures 13 et 14). Nous avons considéré comme positives les tumeurs ayant plus de 10 % de noyaux marqués. Sur 37 cas, seuls 9 CCI ont été considérés comme positifs (24,3 %), 0 de grade I, 1 de grade II (6,2 %), 8 de grade III (44,5 %). Ces taux sont tout à fait comparables à ceux déterminés par Martin (1995) et montrent le caractère péjoratif de l'expression de la *p53* dans les tumeurs du sein (Lohman et coll., 1993).

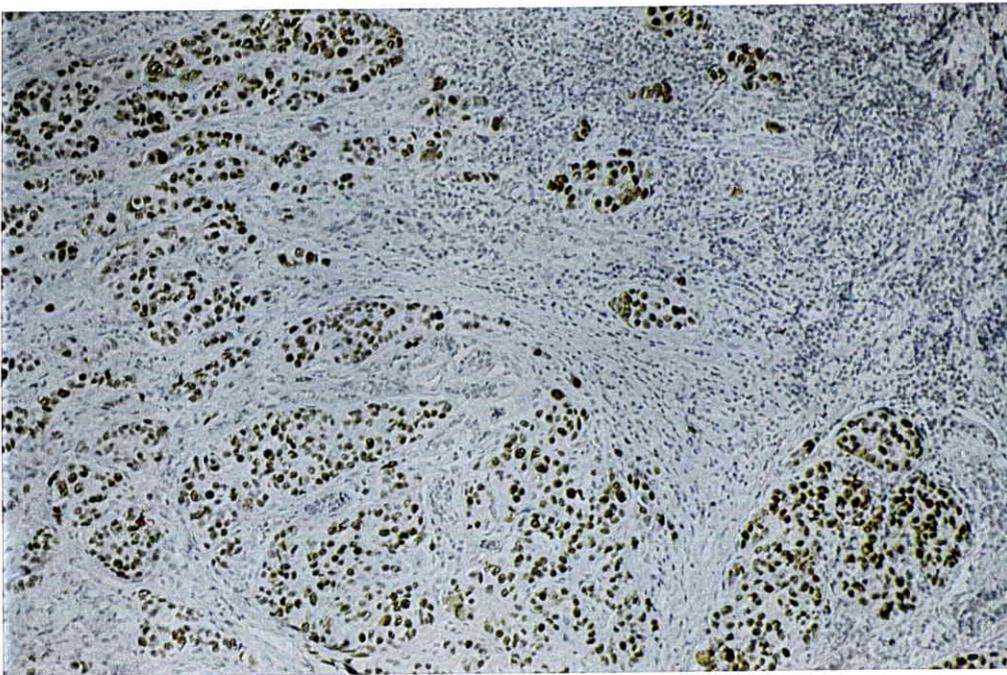


Figure 13 : *p53* : Carcinome canalaire infiltrant de grade III (Gr. x 63).

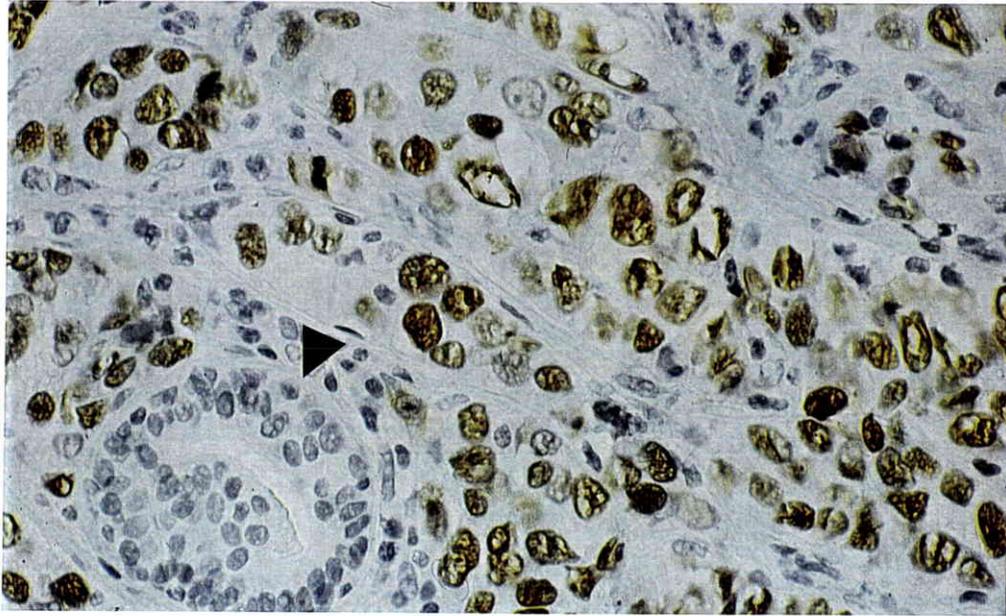


Figure 14 : p53 : Carcinome canalaire infiltrant de grade III. A noter, l'absence de marquage des cellules d'un canal résiduel normal (Gr. x 250).

3.3. Expression du gène *pS2*

La protéine pS2 est présente dans le cytoplasme (Figures 15 et 16). Le marquage par les anticorps est hétérogène. Les tumeurs ont été considérées comme positives si plus de 10 % des cellules étaient marquées. Au total, 18 cas étaient positifs (48 %), avec le taux diminuant avec la gravité : 2 positifs de grade I (66, 7 %); 9 de grade II (56 %), 7 de grade III (39 %). 62 % des tumeurs exprimant la pS2 ont des récepteurs pour les estrogènes. Nos résultats sont proches de ceux de Schwartz et coll., 1991 et de Henry et coll., 1991 et confirme que la présence de pS2 est un facteur de bon pronostic.

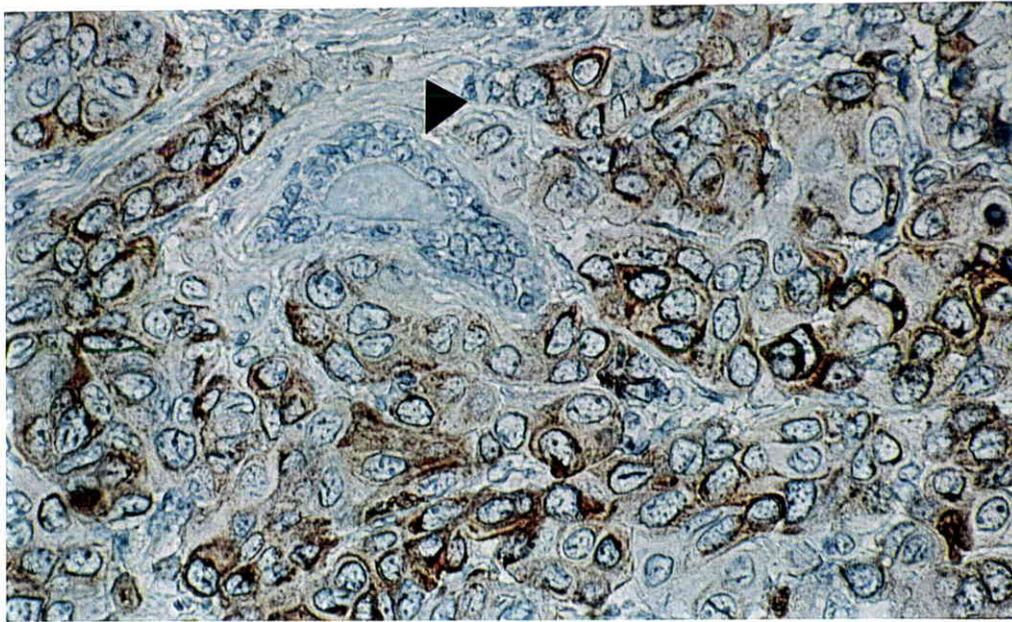


Figure 15 : pS2 : Cellules tumorales d'un carcinome canalaire infiltrant de grade III. A noter, l'absence de marquage des cellules d'un canal résiduel normal (Gr. x 250).

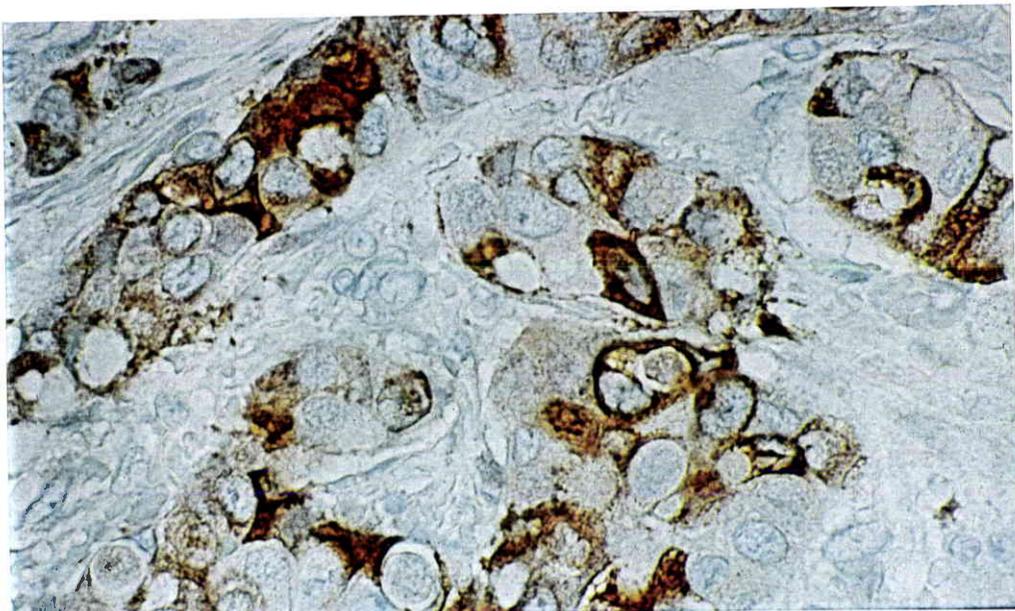


Figure 16 : pS2 : Immunomarquage cytoplasmique au niveau d'environ 60 % des cellules néoplasiques d'un carcinome canalaire infiltrant de grade II (Gr. x 400).

3.4. Expression du gène *c-Ha-ras*

La protéine *ras* est présente dans le cytoplasme (Figures 17 et 18), mais la lecture des préparations est difficile, en raison d'un bruit de fond souvent important. 8 cas étaient positifs (21,6 %) avec un taux croissant selon le grade : 0 de grade I, 2 de grade II (12,5 %), 6 de grade III (33,3 %). Dans les carcinomes mammaires, le taux d'expression du *c-Ha-ras* varie de 0 à 100 % (Gulbis et Galand, 1993). Cette grande variabilité pourrait être liée à des problèmes techniques liés à la qualité des anticorps et à la lecture des résultats et rendre difficile toute interprétation. La recherche d'ARNm ou la recherche d'amplification pourrait peut-être mieux établir une relation entre cancer mammaire et expression des gènes *ras*.

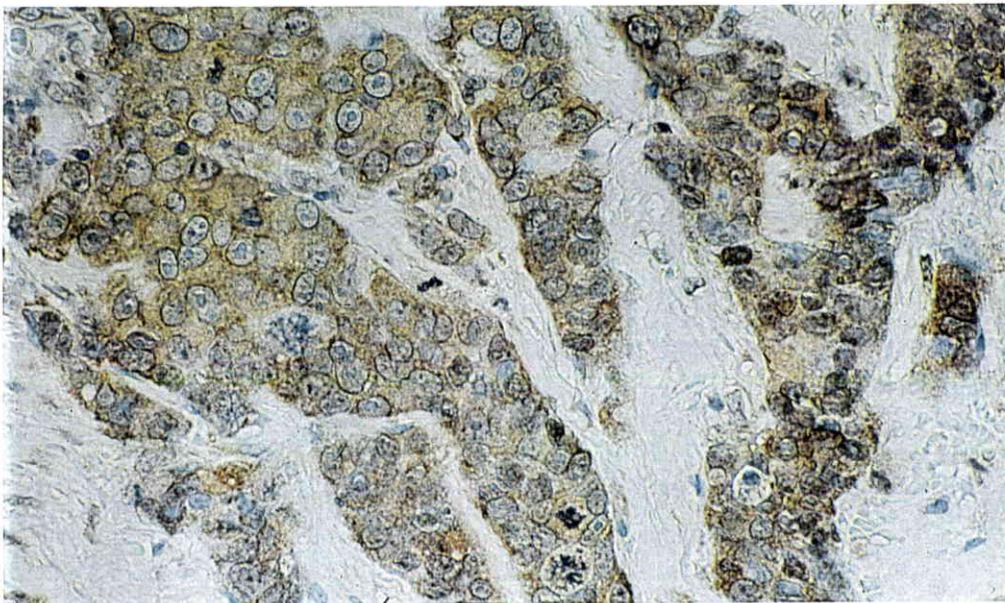


Figure 17 : *c-Ha-ras* : Carcinome canalaire infiltrant de grade III (Gr. x 250).

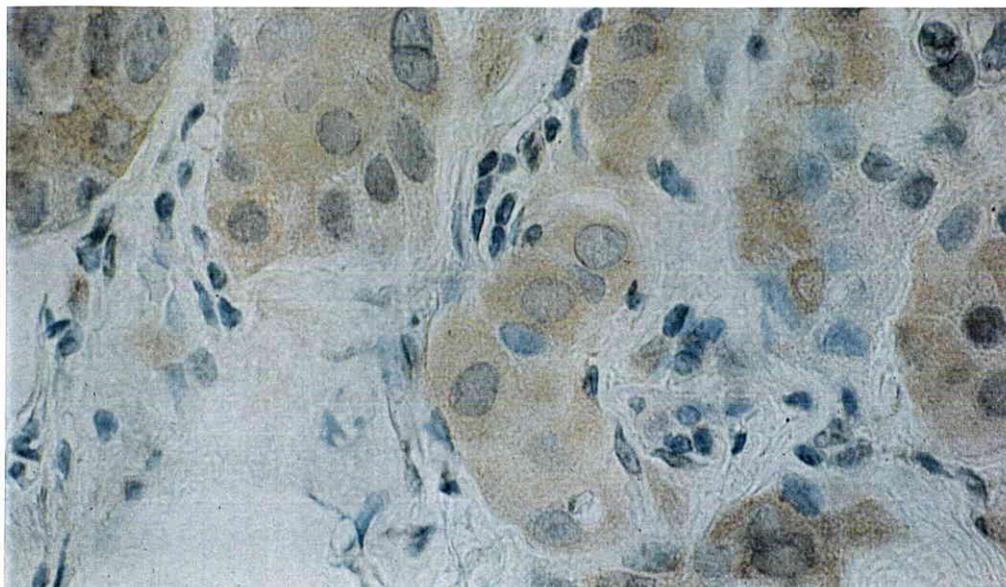


Figure 18 : c-Ha-ras : Carcinome canalaire infiltrant de grade III (Gr. x 400).

3.5. Comparaison de l'expression de ces quatre gènes

Les résultats présentés dans le Tableau 4 montre que (i) p53 paraît surtout exprimé dans les CCI de grade III, ce qui va dans le sens de mutations tardives de p53, (ii) la protéine c-Ha-ras est également associée aux carcinomes infiltrants de haut grade, (iii) la présence de pS2 ne paraît pas être corrélée au nombre de copies de c-erbB-2, (iv) mais pS2 est exprimée quand p53 ne l'est pas, (v) de même p53 est détectable (donc muté) quand c-erbB-2 ne l'est pas.

3.6. Expression et niveau d'amplification de c-erbB-2 dans les carcinomes canauxaux infiltrants

Dans 37 lésions, l'expression de la protéine c-erbB-2 a été estimée par immunohistochimie et le nombre de copies du gène c-erbB-2 a été évalué par PCR quantitative en utilisant le gène de *IFN- γ* comme référence (Tableau 4).

Tableau 4 : PCR Quantitative (incorporation directe de la Dig-11dUTP) et Immunohistochimie sur carcinomes canaux infiltrants de grades I, II et III (c-erbB-2), et Immunohistochimie sur carcinomes canaux infiltrants de grades I, II et III (pS2, p53, c-Ha-ras).

Types histologiques	N°	Valeur corrigée de c-erbB-2	Valeur de IFN- γ	Rapport $\frac{c-erbB-2}{IFN-\gamma}$	c-erbB-2	p53	pS2	c-Ha-ras
CCI (I)	1	6294	1712	4	+	-	+	-
	2	19676	11612	2	-	-	+	-
	3	•	•	•	-	-	-	-
CCI (II)	4	41937	36226	1	-	-	+	-
	5	8103	8144	1	-	-	-	-
	6	6545	1717	4	-	-	+	-
	7	12207	13604	1	-	-	-	-
	8	63291	37958	2	+	-	-	+
	9	40662	15452	3	-	-	-	-
	10	•	•	•	-	-	+	-
	11	9355	4837	2	-	-	-	-
	12	23610	21199	1	+	-	+	-
	13	6615	7845	1	-	+	+	+
	14	9975	4076	2	+	-	+	-
	15	14890	2965	5	-	-	+	-
	16	•	•	•	+	-	+	-
	17	2530	2728	1	-	-	+	-
	18	•	•	•	+	-	-	-
	19	•	•	•	•	-	-	-
CCI (III)	20	7751	11818	1	-	+	-	-
	21	27741	18104	2	-	-	-	-
	22	12024	9024	1	-	+	-	-
	23	20504	14090	1	-	+	-	-
	24	31714	9602	3	-	-	+	+
	25	19174	12948	1	-	-	+	+
	26	26281	13290	2	+	-	+	+
	27	24370	18757	1	+	+	+	-
	28	3077	4320	1	-	+	-	-
	29	10127	4412	2	-	+	-	-
	30	10261	1167	9	+	+	-	+
	31	32829	4192	8	-	-	+	-
	32	30354	2036	15	+	-	+	+
	33	30390	1797	17	+	-	+	-
	34	•	•	•	+	-	-	+
	35	40717	8705	5	+	+	-	-
	36	•	•	•	-	-	-	-
	37	•	•	•	•	-	-	-

Des deux types de marquages utilisés pour la PCR, nous n'avons retenu que le marquage froid à la Dig11-dUTP qui a donné les résultats les plus cohérents.

Le rapport c-erbB-2/IFN- γ qui correspond au nombre de copies du gène *c-erbB-2* par équivalent-génome a été comparé aux résultats de l'expression de c-erbB-2 par immunohistochimie. Seuls, 29 prélèvements (sur 37) ont pu être étudiés (2 CCI de grade I, 12 de grade II, 15 de grade III). 8 prélèvements n'ont pas donné de résultats par le marquage froid pour des raisons inexplicables (manque de sensibilité ou erreur technique).

Etant donnée l'imprécision des techniques utilisées, les résultats ont été regroupés de la manière suivante. Les rapports c-erbB-2/IFN- γ supérieurs ou égaux à quatre ont été seuls considérés comme pouvant indiquer une amplification du gène *c-erbB-2* et l'immunohistochimie comme négative ou positive (+ ou -). Sur 21 échantillons ayant un rapport c-erbB-2/IFN- γ inférieur à quatre, 5 (24 %) étaient positifs en immunohistochimie. Par contre, sur 8 tumeurs avec un rapport c-erbB-2/IFN- γ supérieur ou égal à 4, cinq (63 %) étaient positifs en immunohistochimie.

Bien que non significatifs, ces résultats tendent à montrer qu'il existe une corrélation entre le nombre de copies du gène *c-erbB-2* et l'expression de la protéine. Une telle amplification du gène a été décrite par Patterson et coll. (1991) avec la présence de trois copies ou plus dans les tumeurs (Patterson et coll, 1991., Borressen, 1990; Gutman et coll., 1989; Ro, 1989; Berger et coll., 1988). Cette amplification a été observée dans des tumeurs et jusqu'à 15 copies du gène ont été observées. Cette observation est renforcée par la présence de 5 tumeurs sur 6 avec rapport c-erbB-2/IFN- γ supérieur à 4 associés au grade III. Une augmentation du nombre de copies du *c-erbB-2* est associée à un pronostic défavorable. Nos résultats demandent cependant à être confirmés, car nous n'avons effectué qu'une détermination et il faudrait faire la moyenne des résultats de trois PCR complètes, séparées et réalisées sur un même tissu afin d'obtenir une meilleure estimation du rapport c-erbB-2/IFN- γ et éviter des variations liées à l'efficacité d'amplification. De plus, la détermination de l'amplification du gène *c-erbB-2* est sujette à des variations du fait de l'hétérogénéité tumorale où le stroma de

l'échantillon peut représenter jusqu'à 50 % de la masse tumorale. Seules, des études systématiques à partir de cas cliniques devraient permettre d'améliorer nos connaissances en étudiant simultanément l'expression de plusieurs oncogènes dans des lésions proches tant sur le plan morphologique que sur le plan immunohistochimique. Cette étude devrait permettre de vérifier (i) l'existence de l'association d'un ou de plusieurs oncogènes à un type donné de transformation maligne, (ii) de mieux connaître le mode de survenue des dérégulations des oncogènes dans les cellules tumorales, (iii) et de déterminer les facteurs prédictifs d'évolution des lésions.

CHAPITRE IV

CONCLUSION

Actuellement, la théorie unificatrice expliquant la genèse des cancers est basée sur une rupture d'équilibre entre les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Certains gènes cellulaires remplissant des fonctions normales importantes dans la division cellulaire peuvent dans certaines circonstances, échapper aux contrôles dont ils font normalement l'objet. Ces gènes peuvent ainsi devenir des oncogènes actifs et entraîner la formation de cancers. Il est donc important d'étudier l'interaction de plusieurs oncogènes qui peuvent initier la transformation néoplasique de certains tissus. En retour un même oncogène peut intervenir dans la cancérogenèse de plusieurs types tissulaires différents. L'étude des oncogènes peut ouvrir une voie nouvelle dans l'approche des traitements anticancéreux. Par exemple, on pourrait envisager des traitements bloquant l'action des oncogènes voire des gènes suppresseurs de tumeurs activés et essayer de rétablir les fonctions normales. On peut penser construire dans le futur des vecteurs permettant d'insérer une séquence génique dans les cellules tumorales et faire disparaître la prolifération cellulaire. Comme le dit Tobin (1995), "des sortes de missiles à tête chercheuse capable d'envahir le coeur des cellules perverses pour s'emparer de leurs commandes génétiques, et les convertir". Ainsi, le traitement des cancers dans la genèse desquels l'altération d'un gène suppresseur de tumeur serait impliqué consisterait idéalement en l'introduction de la copie normale de ce gène dans les cellules tumorales. Il a été montré que la croissance tumorale d'un rétinoblastome humain greffé chez la souris *nude* était inhibé par l'introduction d'une copie normale du gène RB. De même, la transfection dans des lignées cellulaires de gliome, d'ostéosarcome et de cancer colique de la copie normale du gène *p53* inhibait leur croissance tumorale.

Pour certains cancers, on peut donc espérer que progressivement apparaîtront des techniques permettant une approche nosologique cohérente, des tests fiables susceptibles d'orienter l'approche thérapeutique et peut-être un jour des thérapies géniques spécifiques touchant les cellules cancéreuses tout en préservant les cellules normales. L'étude de l'expression des oncogènes ou anti-oncogènes dans les tumeurs du sein peut contribuer à cet effort diagnostique, thérapeutique et pronostique.

DEUXIEME PARTIE

UTILISATION DE SOURIS TRANSGENIQUES *v-Ha-ras* EN TOXICOLOGIE

1. Historique et utilité de souris transgéniques

En 1986, Palmiter et Brinster (1986) ont mis au point la technique de transgénèse. Cette technique a été rapidement utilisée pour étudier les gènes impliqués dans le cancer (Adams et Cory, 1991). Ces recherches ont permis d'étudier l'expression des gènes dans des tissus cibles, la formation de tumeurs et l'étude, plus large, de la pathogenèse des maladies liées au dysfonctionnement des gènes impliqués. Ces souris sont appelées transgéniques, car en dehors de leurs propres séquences d'ADN, elles possèdent en plus de leur propre patrimoine héréditaire, des séquences supplémentaires appelées transgène. L'élaboration de ces animaux transgéniques permet d'étudier les conséquences qualitative et quantitative de l'expression du gène impliqué (Adams et Cory, 1991; Molina et coll., 1995). Elle permet également d'évaluer les similitudes physiopathologiques avec les maladies humaines et d'étudier *in vivo* la progression spontanée des lésions tumorales. Les animaux transgéniques représentent un outil de travail considérable dans les pathologie inflammatoire, infectieuse, vasculaire et nutritionnelle, en immunologie et dans certaines maladies héréditaires. Ainsi, un important effort a été entrepris pour caractériser les gènes associés à différentes maladies, à établir leur fonction spécifique et les conséquences biologiques découlant des altérations (activations ou inactivations) de ces gènes (Goldsworthy *et al.*, 1994).

2. Techniques de transgénèse

Actuellement, deux principales sortes de construction d'animaux transgéniques sont utilisées : la transgénèse telle qu'elle a été mise au point par Palmiter et Brinster et la recombinaison homologe qui utilise les cellules souches embryonnaires (cellules ES pour *Embryonic Stem cells* : Hogan et coll., 1986; Monk, 1987; Camper, 1987; Jaenisch, 1988).

2.1. Transgénèse "classique"

Mise au point par Palmiter et Brinster en 1986, elle consiste en une micro-injection de gènes clonés dans l'oeuf fécondé de souris et nécessite plusieurs étapes à savoir, (i) le clonage de la construction génique au sein de laquelle se trouve le gène étudié, (ii) la micro-injection de cette construction dans l'oeuf, (iii) la réimplantation des oeufs micro-injectés dans l'utérus de femelles préparées à la nidation dites pseudogestantes, (iv) l'analyse du génome des souriceaux et de leurs descendants. La construction génique est formée de trois parties importantes : (i) les séquences exoniques et éventuellement introniques du gène étudié, (ii) les séquences promotrices et régulatrices d'un gène permettant l'expression du gène étudié dans des organes cibles et enfin (iii) des signaux de polyadénylation et de terminaison de la transcription permettant de stabiliser la transcription en messenger transgénique.

Plusieurs étapes sont nécessaires dans la réalisation de la micro-injection et par la suite de la réimplantation : superovulation de femelles normales par injection séquentielle de deux hormones gonadotrophiques, puis accouplement à des mâles normaux, sacrifice des femelles et prélèvement des oeufs 20 heures après la superovulation dans l'ampoule de l'oviducte, micro-injection du transgène dans l'un des noyaux de l'oeuf prélevé sous microscope à l'aide de micromanipulateurs et réimplantation des oeufs micro-injectés dans l'*infundibulum* de l'oviducte de femelles dites pseudogestantes, préparées à la nidation, obtenues par accouplement avec des mâles vasectomisés. L'analyse des animaux obtenus après réimplantation des oeufs micro-injectés a pour but de rechercher l'existence de fondateurs portant le transgène et

pouvant par croisement, être à l'origine d'une lignée transgénique. L'analyse de l'ADN extrait de la queue des souriceaux est réalisée par *Southern blot* tout en utilisant tout ou partie du transgène comme sonde, et permet de prouver la réussite de la transgénèse. Par la suite, on analysera le transgène dans la lignée obtenue, à savoir le nombre de sites d'intégration et le nombre de copies par site. Suivront alors une analyse de l'expression du transgène au fur et à mesure de la descendance et une analyse phénotypique permettant une étude morphologique précise afin de déterminer la stabilité de la construction transgénique.

2.2. Recombinaison homologue

Cette technique utilise des cellules souches embryonnaires (cellules ES) et permet de créer des lignées murines mutantes aux anomalies génétiques définies et introduites par mutagenèse dirigée. Ces cellules ES ont été préalablement cultivées et sélectionnées *in vitro* pour un événement de recombinaison homologue entre un segment du gène étudié (construit par génie génétique) et le gène endogène homologue. Après avoir sélectionné un clone de cellules ES pour l'hétérozygotie de la mutation engendrée, la totipotence des cellules ES est utilisée pour créer des animaux mosaïques en les réimplantant dans la *blastula* dans la zone à l'origine des gonades. Les animaux mosaïques pour le transgène en F1 donneront naissance à des animaux hétérozygotes puis homozygotes dans les générations F2 et suivantes. Cette mutagenèse ciblée permet par la création de modèles animaux, d'étudier *in vivo*, au cours du développement, les fonctions d'un gène inactivé quand la mutation créée a eu pour but d'empêcher toute transcription et traduction du gène, permettant ainsi d'étudier dans les lignées homozygotes, les conséquences de l'absence d'expression du gène. En utilisant la technique de la transgénèse "classique", il est difficile de savoir combien de copies des transgènes et à quel endroit du génome ceux-ci sont intégrés, alors que la technique du gène ciblé dans les cellules ES permet elle une intégration du gène altéré à la place du gène normal.

3. Transgénèse et pathogénèse des cancers

3.1. Les animaux transgéniques : utilité pour l'étude de la pathogénèse des cancers

Les animaux transgéniques sont utiles dans la compréhension de la pathogénèse du cancer. Par exemple, le ciblage de l'expression d'un oncogène *ras* activé dans la glande mammaire provoque des adénocarcinomes mammaires chez des souris transgéniques femelles. Par ailleurs, l'utilisation des souris transgéniques a permis de démontrer le rôle de gène suppresseur de tumeur qu'est *p53* (Donehower et coll., 1992; Jack et coll., 1994). En outre, l'analyse morphologique de modèles de cancérogenèse mammaire par le biais de l'hyperexpression ciblée de *c-erbB-2*, *ras* ou *myc* a montré que le type cytologique prédominant de la tumeur engendrée était variable selon l'oncogène en cause et donc que le phénotype de la tumeur pouvait être un reflet du génotype (Cardiff et coll., 1991).

Jusqu'à présent, plus d'une cinquantaine de types d'animaux transgéniques ont été élaborés. Bon nombre de ces transgènes codent des protéines impliquées dans les processus néoplasiques (Hunter, 1991) : facteurs de croissance (*Transforming Growth Factor α* : *TGF α* et *Int-2*), récepteurs des cytokines (*c-ErbB-2* et *Ret*), signaux de transduction (protéines *ras*, sérine/thréonine kinase (*Pim -1*), tyrosines kinases (*Abl*) et les protéines nucléaires servant de facteurs de transcription ou régulant directement la réplication cellulaire (*Myc*, *N-Myc*, *L-Myc*, *Fos*, *Jun*, *p53*).

En général, le transgène ne provoque pas directement des tumeurs, mais établit une prédisposition et l'émergence d'un clone malin. En portant un transgène activé (par exemple un oncogène *ras*), les animaux peuvent être considérés comme génétiquement initiés, donc prédisposés aux tumeurs. Néanmoins pour cet oncogène, on note une prolifération cellulaire dans les *acini* pancréatiques (Quaife et coll., 1987), dans les cellules hépatiques (Sandgren et coll., 1989) et dans les kératinocytes (Bailleul et coll., 1990). Le potentiel oncogénique de *ras* n'est pas en relation avec sa capacité d'accroître la prolifération d'une manière ubiquitaire, mais il est fonction de la nature et de l'inductibilité des zones régulatrices situées en amont du transgène.

Dans bon nombre de constructions transgéniques, le transgène est régulé par le *Long Terminal Repeat* (LTR) de tumeurs mammaires provenant du rétrovirus murin MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*). Ce promoteur est stimulé par les progestines. Il a été observé que les souris LTR-*Myc*, LTR-*Neu* et LTR-*v-Ha-ras* ont toutes développé des adénocarcinomes mammaires, mais ce développement tumoral mammaire se fait d'une manière sporadique et n'atteint pas l'ensemble de l'épithélium mammaire.

3.2. Souris transgéniques portant *v-Ha-ras*

Le modèle des Oncomice[™] (Neo 01, Du Pont) a été utilisé pour évaluer le potentiel cancérigène de produits chimiques. La construction génétique réalisée dans ce cas est obtenue après adjonction du promoteur du *Mouse Mammary Tumor Virus* (MMTV) au gène *v-Ha-ras*. Le promoteur du MMTV est une portion du génome du rétrovirus B qui est capable d'induire un carcinome mammaire chez la souris (Figure 19). Ces promoteurs sont composés de séquences LTR (*Long Terminal Repeat*) possédant :

- un site d'intégration à l'ADN représenté par les séquences *int*,
- un site de fixation du récepteur des hormones glucocorticoïdes situé dans la région U3 entre -200 et -50 pb avant le site d'initiation : ces séquences possèdent les propriétés de type *enhancer* en présence d'hormones gluco-corticoides et augmentant l'activité du promoteur hétérologue situé en aval,
- un site de promotion, la *TATAA box* permettant la transcription du gène situé en aval.

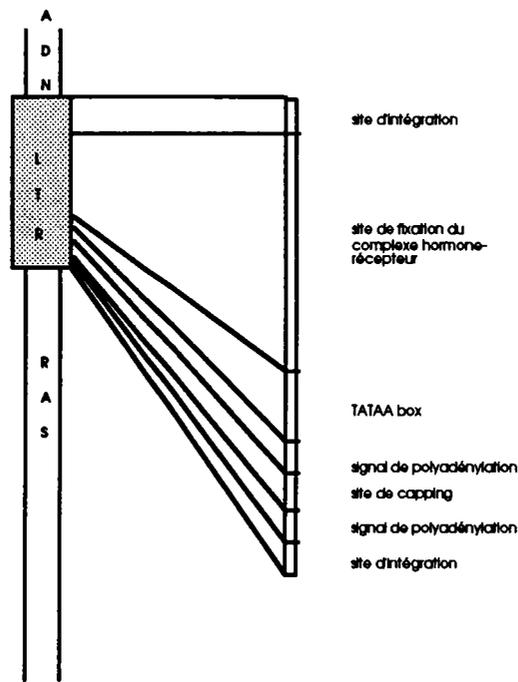


Figure 19 : Organisation de la structure du transgène "promoteur du MMTV/v-Ha-ras " (Edorh, 1991).

Le site de fixation du complexe hormone-récepteur est spécifique mais non restrictif en ce sens qu'il permet l'induction de la transcription sous l'action de différentes hormones, à savoir les glucocorticoïdes, les progestines, les androgènes et les minéralocorticoïdes. Les récepteurs de ce groupe possèdent tous un élément en doigt de zinc permettant l'interaction du complexe hormone/récepteur avec l'ADN. Le récepteur des glucocorticoïdes a été mis en évidence dans le foie, le poumon, le rein, l'intestin, le cœur, le muscle, la peau et les lymphocytes.

Dans le cas des souris transgéniques, les séquences *enhancer* contrôlent activement la promotion du gène v-Ha-ras et le transgène résultant de la fusion MMTV/v-Ha-ras possède *per se* un fort pouvoir oncogène puisque le promoteur fort contrôle l'équivalent rétroviral (v-Ha-ras) du gène c-Ha-ras (mutations activantes de la protéine ras au niveau des codons 12 et 59).

Les souris transgéniques (pour v-Ha-ras) expriment dans plusieurs types cellulaires ce gène transformant et ouvrent une voie prometteuse pour l'étude des

mécanismes impliqués dans la transformation cancéreuse (Colburn, 1989; Compere et coll., 1989; Jenkins et Copeland, 1989). En effet :

- les effets biologiques et l'expression de cet oncogène peuvent être suivis dans tous les types cellulaires (plus de 200 types différents) et pendant toute la vie de l'animal,
- la différenciation cellulaire peut être perturbée par le transgène et de ce fait explorée : en particulier, l'étude attentive des stades prénéoplasiques devient possible,
- la coopération d'oncogènes peut être étudiée *in vivo*,
- ce test animal tient compte du métabolisme *in vivo* des cancérogènes chimiques utilisés pour intoxiquer les animaux.

Les cancérogènes chimiques administrés aux animaux transgéniques peuvent avant ou après leur métabolisme agir sur d'autres gènes ou agir de manière épigénétique et éventuellement potentialiser l'action du transgène afin de favoriser la transformation néoplasique. Comme cela a déjà été souligné, la progression d'une cellule vers la malignité est perçue comme un processus séquentiel se déroulant par étapes : ces étapes peuvent correspondre à l'acquisition de nouveaux oncogènes activés. En exploitant le modèle de souris transgéniques exprimant un oncogène activé, on peut faire l'hypothèse que la transformation néoplasique serait plus rapide qu'avec un test conventionnel.

3.3. Souris nullizygotés pour *p53*

Par le biais de la technique de la recombinaison homologe, Harvey et coll. (1993) ont élaboré des souris avec un ou deux allèles de lignées cellulaires de *null p53* (allèles inactivés de *p53*). Les souris nullizygotés pour *p53*, portant les deux allèles inactivés, se développent normalement, mais elles sont très sensibles à la formation de tumeurs spontanées précoces.

Le gène *p53* est muté dans de nombreux cancers humains acquis (poumon, sein, colon) ou à transmission héréditaire (syndrome de Li Fraumeni), cas dans lesquels le gène *p53* est muté au niveau de l'exon 7. Cependant, il a été prouvé que le gène *p53* n'est pas nécessaire au développement embryonnaire de la souris autorisant de ce fait

l'élaboration de souris transgéniques homozygotes pour le gène *p53* muté. Dans l'étude de Donehower et coll. (1992), le gène *p53* a été muté par introduction d'une cassette *neo* de 450 pb dans l'exon 5 (essentiel à l'activité de la protéine) et injecté par électroporation dans les cellules embryonnaires sélectionnées sur un milieu spécifique pour la présence de l'insert et criblées par amplification génique en chaîne. Ces cellules embryonnaires souches sont injectées dans des blastocytes les rendant chimères. Certaines souris chimères ont transmis à leur descendance par recombinaison homologue la mutation de *p53*, permettant dès la lignée F2 d'obtenir des souris homozygotes et hétérozygotes pour *p53* muté. Les souris homozygotes développent entre 18 et 25 semaines des lymphomes généralisés, mais aussi des hémangiosarcomes, ostéosarcomes, adénomes bronchiques et gonadoblastomes. Dans une étude, 19 souris homozygotes sur 26 développent des lymphomes, 7 souris développent deux tumeurs différentes et deux souris possèdent trois tumeurs (Donehower et coll., 1992). Soixante quinze pour cent des animaux montrent des néoplasmes avant 6 mois, alors que seules 20 % des souris hétérozygotes développent des tumeurs en 18 mois. La grande incidence des lymphomes est d'abord attribuée au "fond génétique" des souris avec 75 % de C57BL/6 et 25 % de 129/Sv. En effet, les souris normales C57BL/6 ont relativement une grande incidence à développer des lymphomes dont l'âge moyen d'apparition se situe autour de 27 mois. L'absence de *p53*, accélère vraisemblablement une prédisposition spécifique inhérente à un type particulier de tumeur. Ces auteurs ont donc émis l'hypothèse selon laquelle le "fond génétique" des souris déficientes pour *p53* joue un rôle important dans la détermination de la spécificité des types tumoraux. Pour tester si le "fond génétique" joue en fait un rôle crucial dans le développement tumoral des souris déficientes en *p53*, ils ont placé l'allèle déficient *p53* (*p53 null*) dans la lignée germinale des souris à 100 % 129/Sv. Ils ont postulé que le "fond génétique" de ces souris serait suffisamment différent de celui des souris ayant à la fois le mélange C57BL/6-129/Sv, ce qui leur permettrait d'observer des différences spécifiques inhérentes à la tumorigenèse. Ils ont observé que : (i) les souris 129/Sv déficientes pour *p53* développent des tumeurs plus tôt que les souris dont

le "fond génétique" est mélangé (mélange C57BL/6-129/Sv), (ii) le spectre des tumeurs diffère au niveau des deux sortes de "fond génétique", mais d'une manière inattendue. En effet, les souris 129/Sv et C57BL/6-129/Sv ont développé à la fois un nombre élevé de lymphomes, mais la moitié des souris mâles 129 /Sv déficientes pour *p53* ont développé des tumeurs testiculaires (tératocarcinomes primitifs). 10 % seulement des souris mâles avec le mélange C57BL/6-129/Sv ont développé cette forme de tumeur. En conséquence, malgré l'hypothèse selon laquelle le "fond génétique" joue un rôle au niveau du spectre des tumeurs observées chez les souris déficientes pour *p53*, on remarque néanmoins que certains types tumoraux surviennent indépendamment du fond génétique tels les lymphomes et les ostéosarcomes. Ces tumeurs surviennent tardivement par rapport aux lymphomes vraisemblablement parce que l'index mitotique des lymphocytes est plus important que celui des ostéoblastes, les rendant, de *facto*, plus sensibles aux mutations aléatoires.

Ce modèle de souris transgéniques est très intéressant car les souris nullizygotes pour *p53* se développent normalement et permettent :

- l'établissement de banques de cellules tumorales,
- la réalisation de banques de soustraction d'ARNm afin de déterminer les oncogènes spécifiquement exprimés dans les tumeurs,
- l'étude de l'action suppressive *in vivo* de la protéine p53 et sa relation avec l'apparition sporadique des tumeurs prouvant l'existence d'autres événements génétiques et épigénétiques,
- l'aide à la compréhension de la pathogenèse des tumeurs des personnes atteintes par la maladie de Li Fraumeni,
- le criblage des agents initiateurs et promoteurs (agents alkylants, méthylants, xénobiotiques, mycotoxines...).

3.4. Souris transgéniques pour *neu*

Le gène *c-neu* (également appelé *c-erbB-2*) activé et possédant une mutation ponctuelle au niveau du domaine transmembranaire a été altéré dans une lignée de

MMTV-*neu* (Muller et coll., 1988). Des souris mâles et femelles ont développé de façon synchrone des adénocarcinomes envahissant toute la glande. Ceci peut être considéré comme une cancérogenèse en une étape, puisque au bout de 90 jours, tous les animaux ont développé des tumeurs mammaires. D'autres lignées ont développé de façon plus stochastique des tumeurs (Bouchard et coll., 1989). Dans ce cas, la cinétique des tumeurs est différente puisque 50 % des femelles et 50 % des mâles présentent des tumeurs respectivement à 89 et 114 jours. Cette constatation suggère que le nombre d'étapes nécessaires pour le développement d'un carcinome est dépendant de l'oncogène ciblé.

Il faut néanmoins garder à l'esprit qu'il existe une période de latence avant l'apparition de tumeurs et cette période peut être raccourcie en cas de coopération entre oncogènes. Par exemple, les animaux surexprimant *ras* et *myc* dans la glande mammaire développent des adénocarcinomes plus rapidement que ceux exprimant seulement *ras* (Pattengale et coll., 1989).

4. Transgénèse et mutagenèse *in vivo*

Récemment, les souris transgéniques ont été utilisées en mutagenèse *in vivo*. Ces modèles de souris transgéniques contenant des bactériophages λ navettes (λ shuttle vector) possédant un cible bactérien (*lac Z* ou *lac I*).

Deux variétés de constructions transgéniques ont été réalisées portant le génome du bactériophage λ (d'une taille de l'ordre de 50 kb). Actuellement, il existe sur le marché commercial deux lignées consanguines de souris transgéniques pour le bactériophage λ : les souris BigBlue™ brevetées par Stratagene et Muta™ brevetées par Hazleton (Gossen et coll., 1989; Gossen et Vijg, 1993). Ces souris possèdent un vecteur navette susceptible d'exister dans un organisme pro et eucaryotique - le bactériophage λ - intégré d'une manière stable dans leur génome. Ce vecteur navette est construit avec un gène cible *lacZ* pour les souris Muta™ et le gène *lacI* pour les souris BigBlue™. Ces gènes cibles se comportent vis-à-vis des mutations comme n'importe quel autre gène cellulaire. Ce vecteur navette possède la propriété d'être très facilement récupéré à partir de l'ADN total puis encapsidé *in vitro* et transfecté dans une bactérie hôte.

Brièvement, après broyage des tissus, l'ADN est extrait, quantifié et hydrolysé par une terminase qui coupe les extrémités *cos* du bactériophage λ permettant son encapsidation *in vitro*. La transfection s'effectue sur des souches d'*Escherichia coli* *lacZ*⁺ ou *lacZ*⁻ selon le cas. Après transfection du gène *lacZ* (souris Muta™), les souches d'*Escherichia coli* *lacZ*⁻ poussent en présence de X-gal et d'IPTG (substitut de la β -galactosidase) et sont à l'origine de plaques bleues pour les colonies non mutantes (portant le gène *lacZ*) et de plaques blanches pour les colonies mutantes portant le gène *lacZ* inefficace (Myhr, 1991). Dans ce cas, après transfection du gène *lacI* (souris BigBlue™), les souches *lacZ*⁺ apparaissent blanches si le gène *lacI* transfecté est opérationnel (non muté). En effet *lacI* code une protéine répresseur du gène *lacZ* empêchant l'expression de ce gène et donc supprimant la sécrétion de β -galactosidase, ce qui implique qu'en l'absence de mutation, les colonies sont bleues (Kohler et coll.,

1991). Le gène *reporter* transfecté est 1100 pb pour *lacI* et de 3200 pb pour *lacZ*, le premier étant plus aisé à séquencer afin de déterminer la mutation en cause.

Ces constructions géniques permettent de cibler la voie d'intoxication l'organe d'étude; il devient aisé d'étudier un organe avec un index mitotique élevé (moelle osseuse), un tissu reproducteur ou post-mitotique (cerveau). Par ailleurs, ces systèmes permettent d'étudier le taux de mutations spontanées en fonction du sexe, de la lignée de souris, des systèmes de réparation et du vieillissement. Le taux de mutations spontanées varie de $5,7$ à $40 \cdot 10^{-6}$: cette variabilité est fonction de l'organe étudié, de la localisation du transgène sur les chromosomes de souris, de la lignée de souris, mais ne semble pas dépendre du nombre de copies du transgène par équivalent-génome (Moore et coll., 1992). La relation entre la prolifération cellulaire *in vivo* et la mutagenèse peut aussi être examinée en utilisant les souris transgéniques (Mirsalis et coll., 1993a; Mirsalis et coll., 1993b). Ces animaux commencent à être utilisés dans l'étude du pouvoir mutagène des xénobiotiques, le rôle de la biotransformation et des données pharmaceutiques peuvent être corrélées avec le pouvoir mutagène. En général, le taux de mutations est 50 fois supérieur au taux de mutations spontanées dans le cas de substances alkylantes comme l'éthylnitrosourée, le chlorambucil ou le benzo(a)pyrène (Young et coll., 1992). Cet exemple illustre la possibilité d'utiliser des voies d'administration différentes, par exemple voie cutanée pour le diméthylbenzanthracène et voie intrapéritonéale pour l'éthylnitrosourée (Hoorn et coll., 1993; Kohler et coll., 1991; Thompson et coll., 1992). La voie d'intoxication aérienne (vapeurs) a été utilisée récemment pour le butadiène à raison de 625 ppm/jour/5 jours. Cette expérience a montré une fréquence de mutations deux fois supérieure dans les poumons des animaux intoxiqués, ceci en l'absence de mutations significativement plus élevées au niveau du foie et de la moelle osseuse (Recio et coll., 1992). Par ailleurs, ce modèle a permis l'étude de l'activation du butadiène en butadiène époxyde *in vitro* à l'aide de microsomes d'animaux transgéniques.

Ce modèle de souris transgéniques est donc un modèle promoteur pour l'étude du pouvoir mutagène direct ou indirect (après bioactivation) *in vivo*. Il permet notamment de quantifier le niveau de mutation dans les différents tissus.

5. Autres applications de la transgénèse en toxicologie

Les perspectives de recherches permises par ces modèles sont variées :

- la comparaison du spectre de mutations pour un même xénobiotique *in vitro* et *in vivo*, en déterminant la nature des mutations (délétion, transversion, transition, insertion),
- l'étude de la mutagénicité de xénobiotiques *in vivo* en tenant compte de l'état physiologique de la souris (gestation, vieillissement, retentissement sur la génération F1), du métabolisme et de la biodisponibilité du xénobiotique ou dans des états pathologiques particuliers (surrénalectomie, ovariectomie, abolition du cycle entéro-hépatique), de même qu'après action d'inducteurs de peroxysomes (phtalates, clofibrate),
- l'exploration des systèmes de réparation,
- l'étude de l'impact des agents physiques *in vivo* devient réalisable (irradiation par les UV ou RX), .
- la création de banque de tumeurs permettant d'autres études ultérieures, comme par exemple, comprendre l'action d'un même oncogène dans des tissus différents à des moments différents et étudier ainsi les différentes réponses cellulaires : mitose, apoptose, quiescence ou différenciation (Williams et Smith, 1993). En effet, la surexpression de l'oncogène *T* du virus simien SV40 dans le foie de souris transgéniques portant cet oncogène transforme les hépatocytes alors que sa surexpression dans la rétine entraîne une apoptose des cellules rétinienne (Khan et Briand, 1993),
- le développement progressif et systématique des tumeurs dans les lignées transgéniques rend la dissection des étapes prénéoplasiques facilement réalisable : par exemple, dans un modèle d'hépatocarcinogénèse ciblée par le biais de l'expression de la protéine T, il a été mis en évidence avant la phase d'adénomatose multinodulaire,

l'existence de phénomènes apoptotiques et de prolifération cellulaire augmentée constituant une véritable étape pré-néoplasique.

- les études des effets anti-néoplasiques ou chimiopréventifs peuvent permettre des essais de nouveaux agents anti-cancéreux comme cela a été réalisé avec des lignées de souris transgéniques pour *wap-ras* (*White Acidic Protein-ras*) : Nielsen et coll. (1992), ou des molécules comme les dérivés du rétinol avec des souris transgéniques *p53 knockout* (Hursting et coll., 1995), voire des ARN antisens spécifiques (par exemple anti-*ras*). Dans l'étude de Nielsen et coll. (1992), les souris transgéniques mâles *wap-ras* développent des adénocarcinomes salivaires et/ou mammaires et l'oncoprotéine humaine *ras* est hyperexprimée à la fois dans les tumeurs mammaires et de la glande salivaire. Ces mêmes auteurs ont créé par sélection deux types de souris transgéniques *wap-ras/F*. Le type 69-2 *wap-ras/F* (mâle) développe des tumeurs mammaires multiples dès la puberté. L'apparition de la tumeur a été retardée par un traitement à la cyclophosphamide avant la puberté. Les tumeurs mammaires observées chez les souris traitées par la cyclophosphamide pèsent 0,57 plus ou moins 0,09 g/souris tandis que les souris non traitées pèsent plus de 2,36 plus ou moins 0,25 g/souris. Ces résultats prouvent que les souris 69-2F peuvent être utilisées pour évaluer des essais thérapeutiques destinés à intervenir dans les processus précoces de la tumorigenèse avant que la tumeur ne devienne palpable. Ces auteurs ont également noté que les tumeurs salivaires et mammaires sont sensibles à la cyclophosphamide et au 5-fluorouracile, mais non au méthotrexate. Ainsi, l'utilisation des souris transgéniques *wap-ras* pourraient permettre la découverte de nouvelles thérapies contre les néoplasies. Hursting et coll. (1995), ont étudié sur des souris transgéniques mâles *p53 knockout*, l'action de la dihydroépiandrostérone (DHEA), de la quercitine, du d-limonène et d'un dérivé de l'acide rétinoïque, pour évaluer dans un premier temps la cinétique d'apparition de la tumorigenèse spontanée et ensuite déterminer si le développement tumoral peut être influencé par des agents chimiopréventifs. La tumorigenèse (surtout l'apparition de lymphomes) a été retardée chez les souris traitées par la DHEA et par conséquent une mortalité relative comparée à celle des souris non traitées. Les trois

autres produits (quercitine, d-limonène, all-*trans* rétinol), pris séparément, n'ont eu aucun effet sur le développement tumoral spontané chez ces souris. Ainsi donc, le développement tumoral chez ces souris peut être retardé par le DHEA. Ces souris *p53 knockout* servent de modèles pour développer des stratégies pouvant aider à diminuer les risques de tumorigenèse résultant de la perte de la fonction suppressive de tumeur de *p53*.

6. Utilisation des animaux transgéniques pour évaluer le potentiel cancérigène des toxiques

Les souris transgéniques permettent une évaluation de l'interaction des cancérigènes avec des gènes altérés (oncogènes) connus pour être des événements génétiques importants dans le développement des cancers chez l'homme. Elles permettent donc la mise en oeuvre de test de cancérogenèse *in vivo*. Ce test de cancérogenèse *in vivo*, en écourtant le développement des tumeurs et en permettant d'obtenir un polymorphisme tumoral étendu, constitue un paradigme utile tant pour l'étude des produits agissant comme initiateurs que pour ceux agissant comme promoteurs de la transformation cellulaire. Par exemple, dans une étude récente, Witty et coll. (1995), ont déterminé le rôle de la stromélysine-1, membre de la famille des métalloprotéinases, dans la cancérogenèse mammaire. Des souris transgéniques exprimant la stromélysine-1 de rat activée sous contrôle du promoteur/enhancer du MMTV (MMTV-STR1), ont été traitées avec le 7, 12-diméthylbenzanthracène (DMBA) pour induire des tumeurs mammaires. De façon surprenante, l'expression de la stromélysine au moment du traitement a réduit le nombre de souris ayant développé des tumeurs mammaires, en particulier des adénocanthomes, de 65 à 32 %. Par contre, quand les souris transgéniques exprimant à la fois le *Transforming Growth Factor α* (*TGF α*) et la stromélysine sous contrôle des séquences MMTV/LTR étaient traitées par le DMBA, aucune différence significative n'a été observée entre le nombre de souris ayant développé des tumeurs comparé à celui des souris exprimant le *TGF α* et les souris témoins ou non traitées. Une augmentation quatre fois plus importante du nombre

des cellules apoptotiques a été détectée chez les souris transgéniques comparée aux souris témoins de même espèce mais non transgéniques lors de l'administration du DMBA. Cette observation suggère que la réduction de la tumorigénicité induite par le DMBA est probablement due, au moins d'une part, à une augmentation du taux de *turnover* des cellules chez les souris transgéniques exprimant la stromélysine-1. Quand les adénocarcinomes se développent chez ces souris transgéniques exprimant la stromélysine-1, aucune altération n'a été détectée au niveau de l'invasion ou au niveau du potentiel métastatique de ces tumeurs. Ces résultats prouvent que l'expression de la stromélysine-1, est insuffisante dans l'acquisition du développement des adénocarcinomes mammaires (acquisition de forme invasive et du phénotype métastatique), mais que la dégradation par les métalloprotéinases peut favoriser la prolifération cellulaire et l'apoptose.

7. Mesure de l'expression de v-Ha-ras et séquençage de gènes par une méthode non radioactive

Des souris transgéniques portant le gène v-Ha-ras ont été utilisées pour mettre en évidence le potentiel cancérigène de différents toxiques dont la N-méthyl N-nitrosourée (Edorh, 1991a) et le 2-butoxyéthanol (Keith et coll., 1996 à paraître). Dans un premier temps il a été vérifié par des méthodes de marquage de sondes et de révélation non-radioactifs (colorimétrie et chimioluminescence) que ces souris portent le transgène *ras* et l'expriment dans les organes hématopoïétiques (rate et thymus) ainsi que dans le rein et le foie. Nous avons pu déterminer que le transgène est présent à raison de deux ou trois copies par équivalent-génome.

Tous les animaux présentent le transgène v-Ha-ras dans leur génome dans un rapport transgène/équivalent génome de 2 à 3. L'expression de ce transgène est variable dans les différents organes et tumeurs obtenues. Une banque de tumeurs et d'ADN tumoral a été d'autre part élaborée. Ces résultats sont présentés dans les pages suivantes.

USE OF NON-RADIOACTIVE METHODS FOR THE DETERMINATION OF THE EXPRESSION, THE SEQUENCE AND THE COPY-NUMBER OF TRANSGENE IN MICE

Bertrand RIHN, Marie-Claire BOTTIN, Catherine COULAIS, Danielle ZISSU
and Aleodjrodo EDORH

Institut National de Recherche et de Sécurité, Avenue de Bourgogne, BP 27, 54501 Vandoeuvre, France

Accepted July 6, 1995

Abstract - Marshall's observation that "toxicology goes molecular", is turning out to be more true than ever; namely as it is observed that toxicological endpoints are the point of interaction between proteins and genes following the administration of toxicants. Transgenic mice represent a valuable tool for studying the adverse effects of chemicals in genetically engineered animals such as *p53* deficient mice, or mice carrying the *v-Ha-ras* oncogene. The latter were used in our laboratory for such toxicological assessments of chemicals. In order to verify that the transgene was expressed in normal, as well as in tumor cells, the transgene was detected in different tissues fixed with various solutions using *in situ* hybridization. It was also specifically retrotranscribed from paraffin-embedded tissues and consequently sequenced using a *Taq* polymerase reaction. We found that the transgene was expressed in various organs. It carries a specific mutation of codon 12 leading to the activation of its encoded product (transducin: p21^{v-Ha-ras}). Moreover using a laser scanning densitometer, it has been demonstrated that 2 to 3 copies of the transgene were present per genome-equivalent in some tissues. All experiments were realized using non-radioactive labelling and detection (chemiluminescent or colorigenic) methods. Indeed, the screening of such animals was realized in a easier and a safer manner using the methods described in this paper than the usual methods based on the use of radiolabelled precursors.

Key words: Transgene, *v-Ha-ras*, non-radioactive, molecular biology

INTRODUCTION

Transgenic mouse models provide many valuable insights into: i) the molecular mechanisms of tumorigenesis (Webster and Muller, 1994); ii) the evaluation of "classical" anticancer or antisens therapeutics (Izawa *et al.*, 1992; Nielsen *et al.*, 1992); iii) the testing of chemopreventive agents such as vitamin A; iv) the realization of a library of cultured cancer cells and their normal counterpart cells and v) the elucidation of the mechanisms involved in cell transformation caused by toxic exposures (Ando *et al.*, 1992; Breuer *et al.*, 1991; Harvey *et al.*, 1993; Keith *et al.*, 1995; Storer *et al.*,

1995). In this study we have used a particular animal paradigm, namely the *v-Ha-ras* transgenic mouse. This transgenic strain carries the viral Harvey *ras* (*v-Ha-ras*) oncogene under the control of the mouse mammary tumor virus (MMTV) promoter (Sinn *et al.*, 1987).

The *v-Ha-ras* oncogene differs from the rodent *c-Ha-ras* proto-oncogene by only two amino acids and is activated as follows: the p21^{v-Ha-ras} transducin encoded by the *v-Ha-ras* gene stimulates a continuous cell growth and thus increases tumor formation. This transgenic mouse model is a powerful tool for the investigation of predictable

carcinogenesis (Keith *et al.*, 1995). Both males and females spontaneously develop breast carcinomas, parotid adenocarcinomas as well as Harderian hyperplasias. However, the occurrence of these tumors is significantly increased when the mice are intoxicated by initiator or promoter agents.

Consequently the *v-Ha-ras* transgenic mice are considered as initiated mice, i.e. mice presenting a stable and heritable activation of the *Ha-ras* gene. Since cellular transformation is a multistep process, including loss of genetic material, or/and chromosome alteration, gene demethylation, impaired gene repair, oncogene activation and tumor suppressor gene inactivation (Vogelstein, 1989), both non-genotoxic agents and genotoxic agents are screenable with transgenic mouse models (Goldworthy *et al.*, 1994; Marshall, 1993) such the *v-Ha-ras* paradigm used in this study.

However before using such mice, it is necessary to screen them for the presence, the expression and the stability of the transgene. These initial studies are reported in the current work.

MATERIAL AND METHODS

Mice

Thirty transgenic mice were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA) with the authorization of DuPont Company (Boston, MA, USA). This FVB/N mice strain carries the viral Harvey *ras* (*v-Ha-ras*) oncogene controlled by the mouse mammary tumor virus (MMTV) promoter. The MMTV/*v-Ha-ras* fusion gene contains the MMTV LTR region required for glucocorticoid control, promoter action and capping, and controls the expression of the fused *v-Ha-ras* oncogene with activating mutations in its codons 12 and 59 (Sinn *et al.*, 1987).

Seven weeks old transgenic mice were randomly selected and numbered by tattoo. Males were housed 1/cage and females 5/cage in polycarbonate cages covered with spun-bonded polyester cage filters. Room temperature was $21 \pm 1^\circ\text{C}$, the pressure was 5 cm H_2O above the atmospheric pressure. Relative humidity ranged from 40-60% and fluorescent light was 12 hrs./day. Animals were fed with pellet rations and water *ad libitum*.

Mice were monitored weekly for weight, appearance of palpable mammary tumors and dyspnea. Criteria for

experiment termination were: appearance of tumors, dyspnea, blue teguments and weight loss greater than 10% per week.

Tumor or organ specimens were fixed in Bouin's, Clarke's and in 4% formalin solutions, embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin/eosin for histological examination.

DNA Extraction and Amplification

The technique described here was used for the determination of the number of transgene copies per genome equivalent, as well as for the sequencing of the *v-Ha-ras* cDNA. Briefly, two tissue sections (5 μm wide) were deposited in 1.5-ml tubes and recovered with 1 ml of octane. The tubes were centrifuged at 12000 g for 5 min. and only the pellet was retained. This step was repeated and the pellet was washed once with 100% ethanol. After ethanol evaporation, 100 μl of digestion buffer (50 mM Tris•HCl, 1 mM EDTA, 1% SDS, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of proteinase K (EC 3.4.21.14), pH 8.5) were added to the pellet. Samples were incubated for 3 hrs. at 55°C and proteinase K was inactivated by further heating at 95°C for 10 min. PCR was carry out with 1 μl of supernatant aliquot.

For gene copy number determination, DNA from transgenic lung was used and the primers were: i) *v-Ha-ras* sense primer (number 4206) 5'-TACAAGCTTGTGGTGGTGGGCGCTA and antisense primer (number 4212) 5'-GGCACTATACTCTTCTTGACCTGT; ii) *c-Ha-ras* sense primer 5'-CTTGGCTAAGTGTGCTTCTCATT and antisense primer 5'-CACCTCTGGCAGGTAGGCAGAGC. Controls were achieved in the absence of both antisens primers.

The polymerase chain reaction was performed in a Minicycler™ apparatus (MJ Research, Watertown, MA, USA) with PCR™ buffer: 10 mM Tris•HCl, 1.5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 0.1 mg/ml gelatin, 0.2 mM of each dNTP, in presence of 1 μl of extracted DNA, 25 pM of primer and 1 unit of *Taq* DNA polymerase (EC 2.7.7.7., Boehringer, Meylan, France), pH 8.3.

The PCR™ cycles were performed as follows. First cycle: i) denaturation at 94°C for 180 sec.; ii) primer annealing at 55°C for 120 sec.; iii) primer extension at 72°C for 60 sec. Twenty nine subsequent cycles followed: i) denaturation at 89°C for 90 sec.; ii) primer annealing at 55°C for 120 sec.; iii) primer extension at 72°C for 60 sec. and a 31th cycle, with a 10 min.-period of primer extension.

cDNA Cloning and Sequencing

Before sequencing, the amplified DNA fragments were cloned in the pBluescript II SK(+) vector using the pCR-Script SK(+) cloning kit according to the manufacturer instructions (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Briefly, a 200 ng of a PCR insert was added to 10 μl of a ligation reaction containing 1 x universal buffer, 0.5 mM ATP and 50 ng of *Sfr* I-digested pCR-Script SK(+) DNA. Then the enzymes T4 DNA ligase (4U, EC 6.5.1.1.) and *Sfr* I were added. The reaction was allowed to proceed at room temperature for 1 hr. before being heat-treated at 65°C for 10 min. A 2- μl aliquot of the reaction

was next used to transform 40 μ l of XL1-Blue MRF' Kan supercompetent *E. coli* cells. White (putative positives) transformants were used for "miniprep" plasmid purification according to Lech and Brent (1989). In order to select for the clones carrying the 187 bp insert, the "miniprep" plasmids were hydrolyzed using *Ksp* I and *Dra* II restriction enzymes. The plasmids with a digestion fragment of 305 bp (187 pb of specific insert + 118 pb of the multiple cloning site) were amplified with the specific primers of v-Ha-ras, and a representative positive plasmid (showing an amplified product of 187 bp) was used for further sequencing.

Non-radioactive sequencing of recombinant plasmids was carried out following the protocol of the DigTMTaq DNA sequencing kit (Boehringer Mannheim, Meylan, France). In short, after alkaline denaturation of 1 μ g of plasmid, 2 pmol of the M13/pUC sequencing primer 5'-labelled with digoxigenin (5'-GTAAAACGACGGCCAGT) was used for the annealing reaction at 55°C for 10 min. After addition of 3 U of Taq polymerase, the extension termination was realized at 70°C. Following standard electrophoresis, the sequencing gel was blotted onto a NylonTM membrane (Boehringer Mannheim, Meylan, France) by capillarity and the sequencing products were UV-fixed onto the membrane. The membrane was then incubated in presence of alkaline phosphatase/anti-digoxigenin antibodies conjugate using as a chemiluminescent substrate, AMPPDTM (10 μ g/ml, Tropix, Bedford, MA, USA), before being exposed to XARTM films (Kodak, Rochester, NY, USA) for 2 hrs. Following the chemiluminescent reaction, a colorigenic revelation was achieved using 4-nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) as described by Rihn *et al.* (1995a).

In situ Hybridization

Buffered formalin tissues were deparaffined with xylene, washed in 100% ethanol and air dried. The labelled probe (v-Ha-ras sense or antisense primers; see section "Labelling and Validation of Probes") was added (200 ng/slide) to 50 μ l deionized formamide, 30 μ l of 25% (w/v) dextran sulfate and 10 μ l 20 x SSC for hybridization in a humid chamber at 37°C for 2 hrs. The slides were then washed twice in 2 x SSC at room temperature for 10 min. and twice in 0.2 x SSC for the same time. The detection was based on the use of antidigoxigenin antibody-alkaline phosphatase conjugate (1/1000) in 0.1 M Tris•HCl, 0.1 M NaCl and 0.05 M MgCl₂ (pH 9.5) to which NBT/BCIP had been added.

mRNA Expression in Organs obtained with various Fixatives

Mammary tumors and kidneys were fixed in three different fixatives solutions: i) Bouin's; ii) Clarke's solution (alcohol/acetic acid; 2/1 v/v) and iii) 4% buffered paraformaldehyde. Five tissue sections (7 μ m) were stirred with 1 ml of iso-octane according to the method described by Stanta and Schneider (1991). After three extractions, the pellet was washed twice with 0.5 ml ethanol and finally dried under vacuum. The pellet was suspended in 200 μ l of 1 M guanidium thiocyanate, 25 mM 2- β -mercaptoethanol, 0.5% lauroyl sarcosine, proteinase K 1.2 mg, 50 mM Tris•HCl (pH 7.5) and incubated at 45°C for 6 hrs.

Briefly, following a phenol/chloroform extraction, the nucleic acids were precipitated in isopropanol using 4 μ g of glycogen, suspended in 40 μ l final volume containing 50 mM Tris•HCl, 50 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 10 mM dithiothreitol, 10 mM random hexamers, RNasinTM inhibitor (Sigma, St. Louis, MI, USA) 40 U and *DNase* I-*RNase* free (EC 3.1.21.1.), pH 8.3. DNA was hydrolyzed for 1 hr. at 37°C. Following *DNase* I inactivation (10 min. at 95°C), 20 μ l of the hydrolysate were used for cDNA transcription with 50 U of M-MuLV reverse transcriptase (EC 2.7.7.49.) at 37°C for 1 hr. while the remaining 20 μ l were used for negative control. The amplification was carried out in 200 μ l final volume with the sense and antisense primers (10 pmol each) of v-Ha-ras defined above using the same buffer as for retrotranscription, 5 U of Taq polymerase and 8 mM KCl. The cycler program was 35 times: 40 sec. at 60°C, 30 sec. at 72°C, 40 sec. at 92°C. The samples were electrophoresed in TBE-agarose gels, transferred to a nylon membrane and, following a hybridization with 20 ng of PCR-labelled probe (see below), the specific DNA was revealed using a chemiluminescent DIGTM revelation previously described (Rihn *et al.*, 1995b).

Labelling and Validation of Probes

The oligonucleotide probes (200 pmol) used for *in situ* studies were end-labelled with a mixture of dATP (0.5 mM) and digoxigenin-dUTP (0.05 mM) with 2.5 U of terminal transferase (EC 2.7.7.31.) in the reaction buffer (200 mM potassium cacodylate, 25 mM Tris•HCl, 0.25 mg/ml BSA, 5 mM CoCl₂, pH 6.5). The reaction was incubated at 37°C and the labelled probe was precipitated with 0.1 vol. of 4 M LiCl and 3.0 vol. of prechilled ethanol in the presence of 20 μ g of glycogen and 10 mM of EDTA. Following precipitation, the obtained pellet was dried and suspended in TE buffer.

The amplified v-Ha-ras probes were randomly labelled using the same PCR procedure as above, but replacing 2.0 mM dTTP by 1.3 mM dTTP + 0.7 mM digoxigenin-dUTP in order to obtain digoxigenin-labelled probes (Lanzillo, 1990). The labelled probes were precipitated overnight at -20°C with 2.0 μ l of 0.5 M EDTA, 6.2 μ l of 4 M LiCl and 150 μ l of absolute ethanol. The pellets were washed twice with a 20% (v/v) aqueous ethanol solution and dried under vacuum using an Alpha 1-4TM freeze dryer and an Alpha RVC rotational-vacuum-concentrator (Christ, Osterode/Harz, Germany).

Following quantification by UV absorbance (1 unit A_{260nm} = 37 μ g single-strand DNA and 1 unit A_{260nm} = 50 μ g of double-strand DNA), the labelled probes were serially diluted in 100 μ l of 10 mM Tris•HCl, EDTA 1 mM (pH 8.0) denatured by adding 100 μ l of 0.4 N NaOH, 25 mM EDTA for 5 min., deposited onto Nytran N12TM membranes using a Minifold apparatus (Schleisher and Schuell, Darmstadt, Germany). After further neutralization using 3 M NaCl, 0.5 M Tris•HCl (pH 7.8), the membrane was equilibrated in 6 x SSC solution and the probes were crosslinked onto the membrane by UV (UV StratalinkerTM 1800, 1.20 mJ/cm² of membrane) (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

Membrane blocking and colorigenic probe detection were

carried out using the procedure described above.

Evaluation of the Transgene Copy-Number

Two primers which match specifically at their 3'-OH end with the *v-Ha-ras* gene were used in combination with one primer set which specifically amplifies the *c-Ha-ras* gene (one primer matching perfectly in 3'-OH, and one primer matching an intronic sequence lacking in the *v-Ha-ras* gene). Both sets of primers were used in the same PCR™ reaction and yielded an amplification (as described in the "mRNA Expression in mammary Tumors" section) of 187 bp and 207 bp DNA fragments for the *v-Ha-ras* and *c-Ha-ras* genes, respectively. Following this step, the PCR products were serially diluted (1/2 to 1/32), electrophoresed, transferred onto a nitrocellulose membrane (Stratagene), and hybridized using the *v-Ha-ras* probe labelled with Dig-d-UTP™. Colorigenic revelation was performed as described by Rihn *et al.* (1995a). Immersion of the membranes in a toluene bath renders them transparent, and they were then fixed with Scott's concentrate (Surgipath™, Labonord, Villeneuve d'Ascq, France) on a glass slide in order to allow the quantification of the colored bands using a scanner spectrophotometer (Dual Wavelength Flying Spot Scanner CS-9000™, Shimadzu, Kyoto, Japan), that employs a software program FDU-3™ (Shimadzu). The scanner densitometer operated in absorbance/transmission mode, at a wavelength of 550 nm (reference wavelength of 420 nm) and a beam size of 2.0 x 0.4 mm². The recorded parameters were: ordinate from - 0.1 to 2.0 absorbance units, abscissa in mm corresponding to the optical course of the beam for all peaks.

RESULTS AND DISCUSSION

Following a period of 2 to 6 months, transgenic *v-Ha-ras* mice (Oncomice Neo 01) spontaneously develop mammary adenocarcinomas, as well as Harderian adenomas and lymphomas. The transgene expression was initially determined by *in situ* hybridization using a tailed antisense probe. The label efficiency of the 20 mer-tailed probe was measured as indicated in the "Labelling and Validation of Probes" section: a dilution corresponding to 5 fmol of the labelled probe gave a marked signal using colorigenic detection (Fig. 1A).

As shown in fig. 2A an unambiguous signal was detected by *in situ* hybridization in the mammary adenocarcinoma HP4884 at a magnitude of 400. mRNA of *v-Ha-ras* were not detected using a sense oligonucleotide probe (Fig. 2B). Using the NBT/BCIP revelation protocol (Fig. 2A), as well as the

Fast Red™ (Fig. 2C), the coloration seemed located in the nuclear compartment of the cell. In order to verify this observation, the slides were examined at a magnification of 1000 times (Fig. 2D). This fig. shows intense nuclear and nucleolar coloration with NBT/BCIP indicating the presence of *v-Ha-ras* pre-mRNA. This is not surprising since *Ha-ras* mRNAs have a very short life in the cytoplasm and are rapidly degraded (Barbacid, 1987; Lowy and Willumsen, 1993), their nuclear and nucleolar localizations indicate that pre-mRNA are processed in the nuclear matrix and are localized in spliceosomes (Lawrence *et al.*, 1989), and the transgene construct favors extremely elevated synthesis of *v-Ha-ras* mRNA in the organs under steroid hormone control such as the mammary gland (Sinn *et al.*, 1987).

Indeed, the mutated *v-Ha-ras* gene is actively expressed due to the presence of the glucocorticoid response element (GRE, an enhancer sequence) and the TATAA box of the MMTV in the 5' regulatory region of the transgene. Nevertheless, it is not possible to assign the signal obtained in the mammary gland to the proto-oncogene (*c-Ha-ras*) or the transgene (*v-Ha-ras*) mRNA on the basis of *in situ* hybridization using a common probe for the detection of *v-Ha-ras* as well as *c-Ha-ras* mRNAs.

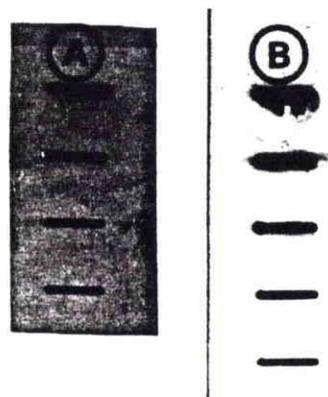


Fig. 1 *Probe validation.* A) Slot-dot of serial dilutions of the tailed oligonucleotide 4212 (from 5 pmol to 5 fmol); B) Slot-dot of serial dilutions of the PCR-labelled *v-Ha-ras* fragment (187 bp, from 500 fmol to 50 amol). The labeling reaction was achieved as indicated in the section "Labelling and Validation of Probes".

Therefore the mRNA of *v-Ha-ras* were detected using a specific retrotranscription followed by polymerase chain amplification (RT-PCR) technique. As described in the "DNA Extraction and Amplification" section, two primers designed to match at their 3'-OH end with the specific mutations of the *v-Ha-ras* gene at codon 12 and 59 were used in order to amplify only the *v-Ha-ras* mRNA. Fig. 3 shows the expression of *v-Ha-ras* mRNA (cDNA) in various organs of transgenic mice such as the kidney, mammary tumor and the thymus (result not shown). The cDNAs of the blot were revealed with an homologous probe labelled according to the PCR protocol described in the "Labelling and Validation of Probes". The label was efficient as 50 amol of the 187 bp fragment gave a clear signal on the dot-blot of the probe validation (Fig. 1B).

A representative sample of *v-Ha-ras* cDNA was used for cloning in pBluescript II SK(+) vector as described in the "DNA Cloning and Sequencing" section. The sequence obtained using the labelled Dig™ sense primer is shown in fig. 4A. As expected, the sequence was typical of a *v-Ha-ras* cDNA with the specific transition of G to A in codon 12 (mutation: gly→arg). As has been described elsewhere (Rihn *et al.*, 1995a), the same blot can be submitted to a second revelation using a chemiluminescent substrate for the phosphatase conjugate (namely AMPPD™) following the NBT/BCIP coloration shown in fig. 4A. Both revelations of a given part of the same vector sequence are illustrated in fig. 4B. It can here be seen that a similar band intensity is revealed for the dideoxy-terminated fragments. Contrary to many

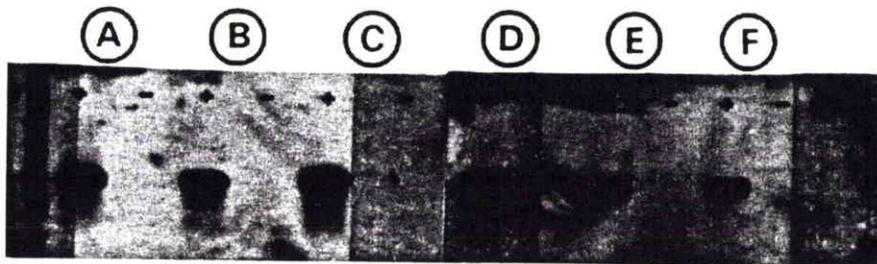


Fig. 3 Southern blot of amplified *v-Ha-ras* cDNA following RT-PCR; exemple of the tissues of animal HP 4745. lane A: kidney cDNA (HP 4745, Bouin's fixative); lane B: mammary tumor cDNA (HP 4745, Bouin's fixative); lane C: kidney cDNA (HP 4745, Clarke's fixative); lane D: mammary tumor cDNA (HP 4745, Clarke's fixative); lane E: kidney cDNA (HP 4745, buffered formalin fixative), lane F: mammary tumor cDNA (HP 4745, buffered formalin fixative); (+) and (-) with and without reverse transcriptase. Lanes A to F, chemiluminescent detection. The procedure is described in the "mRNA Expression in Organs obtained from various Fixatives" section.

It is noteworthy that regardless of the fixative solution used (Bouin's, Clarke's and buffered formalin solutions), a clear signal appeared following mRNA extraction. As for *in situ* hybridization, the mRNA were also still detectable using a 4-hrs. fixation in either of the three buffers tested in this work, even if it is thought that Bouin's solution causes crosslinking between proteins and DNA, and prevents DNA amplification (Nuovo, 1992). In contrast, buffered formalin does not alter the DNA molecule. However, in our study, only short fragments of well expressed mRNAs were retrotranscribed, allowing an efficient mRNA recovery whatever the fixative used.

observations (see Discussion in Rihn *et al.*, 1995a), the chemiluminescence (Fig. 4B) based method did not improve the colorigenic signal recorded on the blot (Fig. 4A). Chemiluminescence did not improve the sensitivity of the detection, but did yield a faster revelation; two hrs. instead of an overnight-period essential for obtaining a clear colorigenic signal or an radioautographic revelation when a radiolabelled nucleotide is used.

For the determination of copy-number of the transgene per genome-equivalent, a specific set of primers was designed for both *v-Ha-ras* transgene and c-

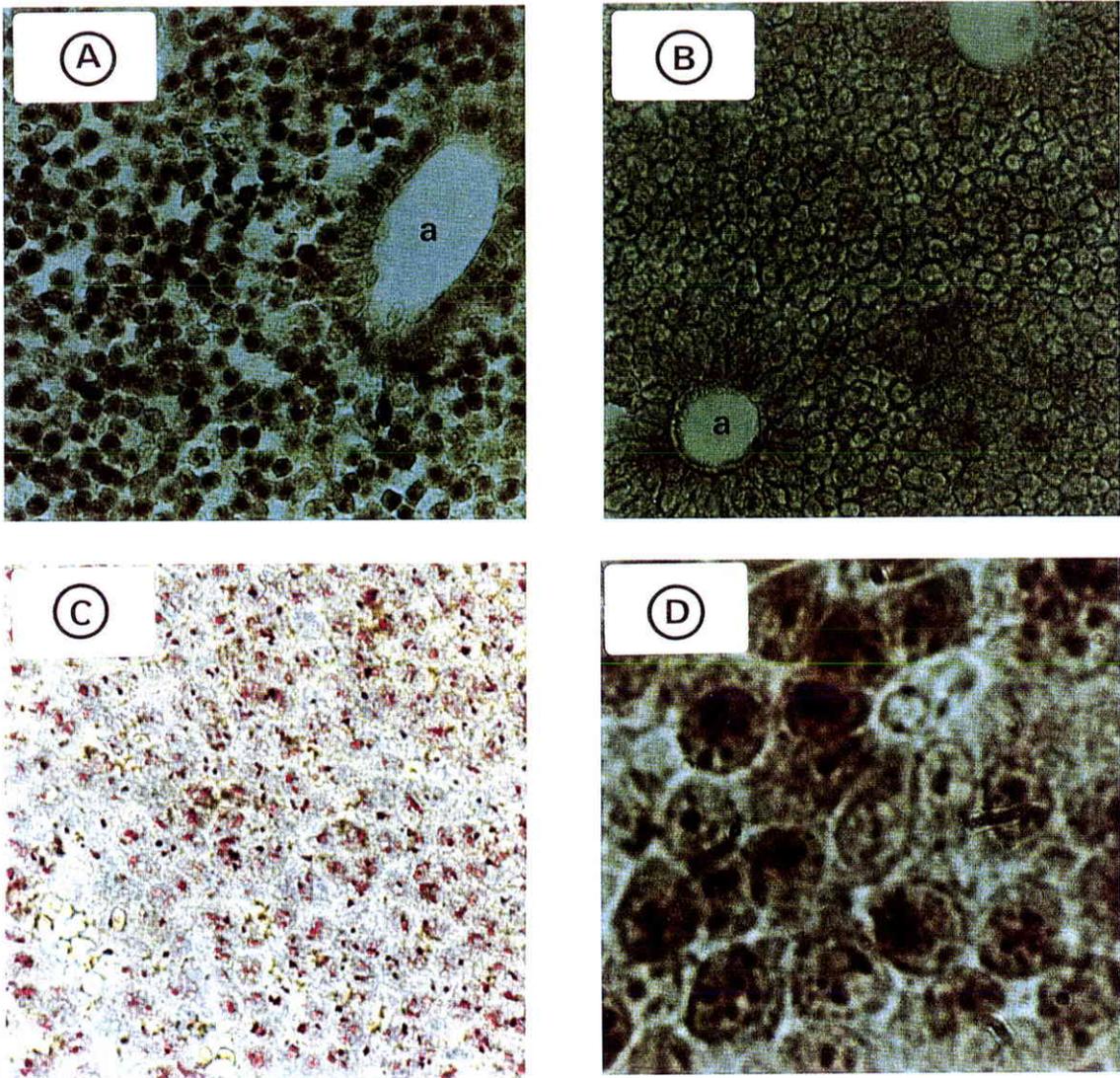


Fig. 2

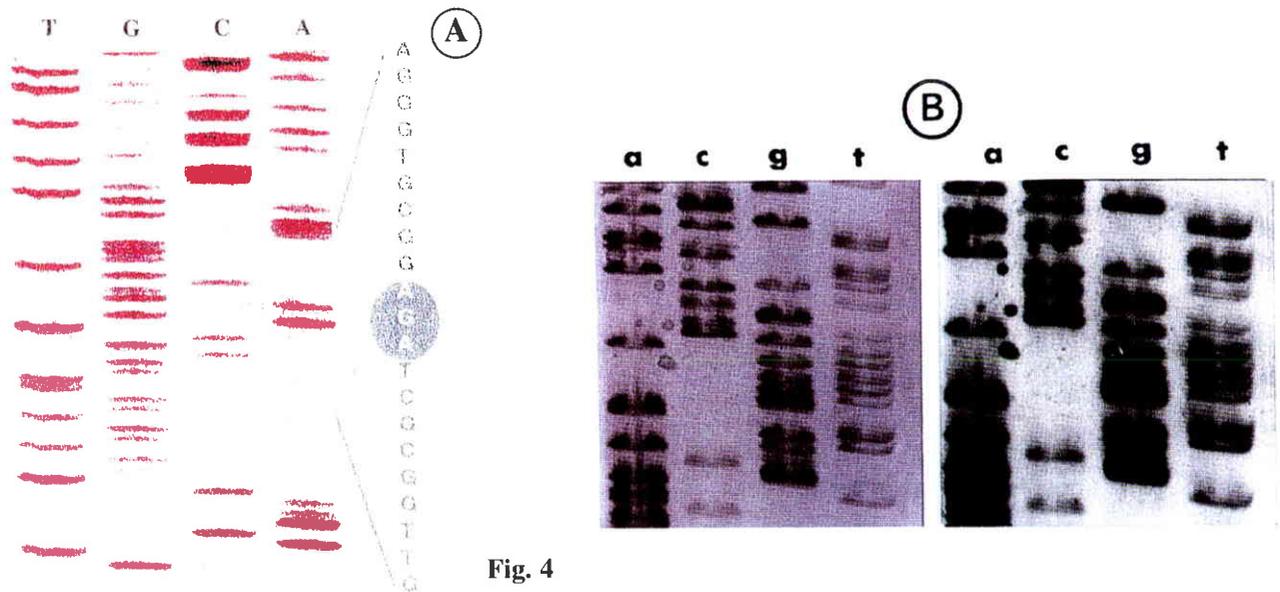


Fig. 4

Ha-*ras* proto-oncogene as described in the section "DNA Extraction and Amplification". The v-Ha-*ras* gene was specifically amplified due to the mismatch of both primers at their 3'-OH end with the cellular Ha-*ras* proto-oncogene and pseudogene and conversely, the primers specific for the c-Ha-*ras* gene did not amplify either the v-Ha-*ras* gene or the Ha-*ras* pseudogene due to their intronic location. Under these conditions, the c-Ha-*ras* genes and v-Ha-*ras* transgene gave two products of 207 and 187 bp, respectively, following amplification and hybridization (Fig. 5A). After immersion of the colored blot in a toluene bath and fixation on a glass slide, these bands were scanned using a laser spectrophotometer, and the value of the absorbance at 550 nm was recorded as a function of the shift of the laser beam. The peaks thus obtained are shown in fig. 5B. Whatever the dilution, the absorbance value of the v-Ha-*ras* peak, was two to three fold greater than the value of the c-Ha-*ras* peak, indicating that this representative transgenic mouse harbored 2 to 3 copies of transgene per genome-equivalent (Table 1). Our experiment shows that

colorimetry (namely, relative colorigenic quantitation) is relevant for non-radioactive labelling and detection, and provides a numeric-based evaluation of the color density and an analysis without the need for radioactivity. Indeed, in the past, blotted DNA quantitation was only performed with chemiluminescent or radiolabelling detection using luminometers or β - γ scintillation counters, respectively (Rohan *et al.*, 1990). Generally, relative quantitative PCR (Q-PCR) was achieved by amplifying together target DNA with an internal control and by comparing the ratio of target DNA versus control DNA (either endogenous or exogenous). This last technique has been used with a temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) to improve the relative quantitation of the target DNA (Ferré *et al.*, 1994; Riesner *et al.*, 1992). The copy-number determination of the transgene is essential for the analysis of copy-number stability in transgenic animals and is therefore a significant part of the validation process which allows one to use transgenic animals for the assessment of chemical toxicity (Dycaico *et al.*, 1994).

Table 1 Area values of the scanned peaks of fig. 5B

		Dilution				
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
Arbitrary	v-Ha- <i>ras</i>	184,000	134,000	74,000	36,000	10,500
Units	c-Ha- <i>ras</i>	55,800	24,300*	44,600	17,500	4,400

The values corresponded to the relative units under each area. *This value is probably under estimated.

Fig. 2 *In situ* hybridization of Ha-*ras* mRNA; example of the HP 4884 mammary tumor. A) Mammary gland section of an adenocarcinoma (HP 4884); hybridization with the tailed antisense oligonucleotide 4212; coloration with NBT/BCIP. a: acinus; B) Same tumor (HP 4884); hybridization with the tailed sense oligonucleotide 4206; coloration with NBT/BCIP; a: acinus; C) Same tumor (HP 4884); hybridization with the tailed antisense oligonucleotide 4212; coloration with Fast Red™; D) Same tumor (HP 4884); hybridization with the tailed antisense oligonucleotide 4212; coloration with NBT/BCIP. Magn. A-C) x 400; D) x 1000

Fig. 4 *Non-radioactive sequences*. A) Example of a cloned v-Ha-*ras* cDNA fragment showing the specific G→A transition, colorigenic detection; B) Colorigenic detection of a part of pBluescript II SK(+) using NBT/BCIP (left) and chemiluminescent detection of the same part using AMPPD (right) as described in the "cDNA Cloning and Sequencing" section.

It is now possible to use molecular biology techniques with non-radioactive DNA labelling and detection, and our work on transgenic mice demonstrates their feasibility and relevance for toxicological studies.

REFERENCES

- Ando, K., Saitoh, A., Hino, O., Takahashi, R., Kimura, M. and Katsuki, M., Chemically induced forestomach papillomas in transgenic mice carrying mutant human *c-Ha-ras* transgenes. *Cancer Res.* 1992, **52**: 978-982.
- Barbacid, M., *RAS* genes. *Ann. Rev. Biochem.* 1987, **56**: 779-827.
- Breuer, M., Wientjens, E., Verbeek, S., Slebos, R. and Berns, A., Carcinogen-induced lymphomagenesis in *pim-1* transgenic mice: dose dependence and involvement of *myc* and *ras*. *Cancer Res.* 1991, **51**: 958-963.
- Dycaico, M.J., Provost, G.S., Kretz, P.L., Ransom, S.L., Moores, J.C. and Short, J.M., The use of shuttle vectors for mutation analysis in transgenic mice and rats. *Mutat. Res.* 1994, **307**: 461-478.
- Ferré, F., Marchese, A., Pezzoli, P., Griffin, S., Buxton, E. and Boyer, V., Quantitative PCR: an overview. In: *The Polymerase Chain Reaction*. Mullis, K.B., Ferré, F. and Gibbs, R.A. (eds.), Birkhäuser, Boston, 1994, pp. 67-88.
- Goldsworthy, T.L., Recio, L., Brown, K., Donehower, L.A., Mirsalis, J.C., Tennant, R.W. and Purchase, I.F.H., Symposium overview: transgenic animals in toxicology. *Fund. Appl. Toxicol.* 1994, **22**: 8-19.
- Harvey, M., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Butel, J.S., Bradley, A. and Donehower, L.A., Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in *p53*-deficient mice. *Nature Gen.* 1993, **5**: 225-229.
- Izawa, M., Takayama, S., Shindo-Okada, N., Doi, S., Kimura, M., Katsuki, M. and Nishimura, S., Inhibition of chemical carcinogenesis *in vivo* by azatyrosine. *Cancer Res.* 1992, **52**: 1628-1630.
- Keith, G., Coulais C., Edorh, A., Bottin, M.C. and Rihn, B., Ethylene glycol monobutyl ether has neither epigenetic nor genotoxic effects in rats and transgenic mice. *Occup. Hyg.* 1995, accepted: July 25, 1995.
- Lanzillo, J.L., Preparation of digoxigenin-labelled probes by the polymerase chain reaction. *BioTechniques* 1990, **8**: 621-622.
- Lawrence, J.B., Singer, R.H. and Marselle, L.M., Highly localized tracks of specific transcripts within interphase nuclei visualized by *in situ* hybridization. *Cell* 1989, **57**: 493-502.
- Lech, K. and Brent, R., Resolution and recovery of large DNA fragments. In: *Current Protocols in molecular Biology*, vol. 1, Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (eds.), Wiley Interscience, New York, 1989, pp. 1.6.5.
- Lowy, D.R. and Willumsen, B.M., Function and regulation of *RAS*. *Ann. Rev. Biochem.* 1993, **62**: 851-891.
- Marshall, E., Toxicology goes molecular. *Science* 1993, **259**:

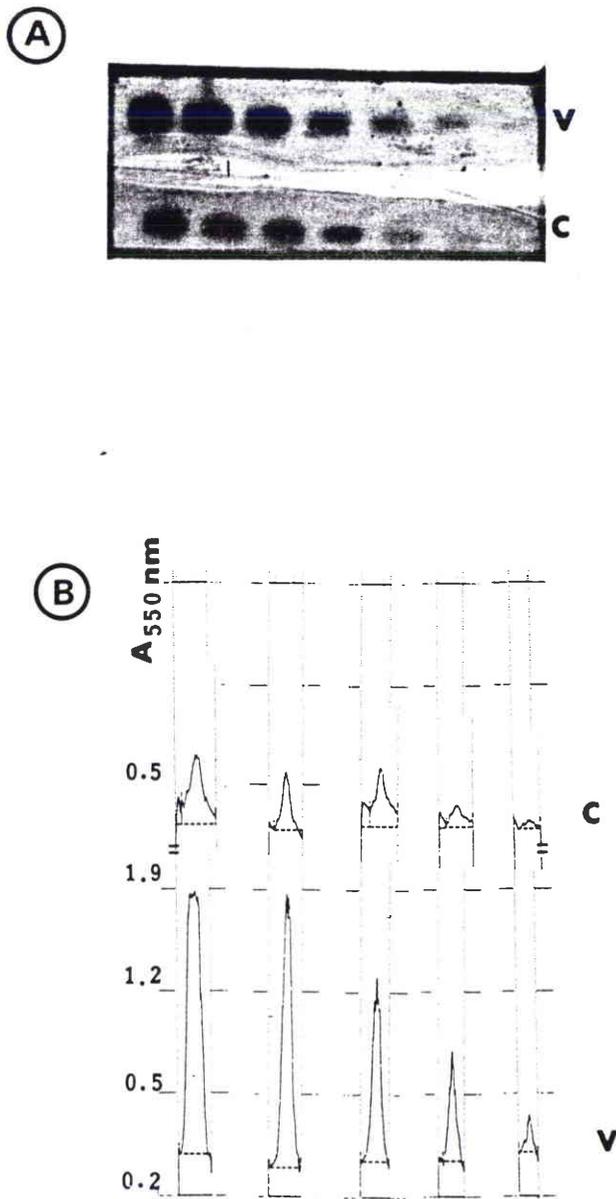


Fig. 5 Evaluation of the transgene copy-number on a colored blot using a scanner densitometer. **A)** Hybridized blot of the *v*-*Ha-ras* DNA dilutions (upper) and *c*-*Ha-ras* DNA dilutions (lower), coloration of the nitrocellulose membrane with NBT/BCIP followed by immersion in a toluene bath and fixation onto a glass slide; **B)** Plot of the absorbance versus optical course for each peak; **c:** *c*-*Ha-ras* fragment; **v:** *v*-*Ha-ras* fragment.

- 1394-1398.
- Nielsen, L.L., Gurnani, M. and Tyler, R.D., Evaluation of the *wap-ras* transgenic mouse as a model system for testing anticancer drugs. *Cancer Res.* 1992, **52**: 3733-3738.
- Nuovo, G.J., In: *PCR in situ Hybridization: Protocols and Applications*. Raven Press, New York, 1992, pp. 83-156.
- Riesner, D., Steger, G., Wiese, U., Wulfert, M., Heibey, M. and Henco, K., Temperature-gradient gel electrophoresis for the detection of polymorphic DNA and for quantitative polymerase chain reaction. *Electrophoresis* 1992, **13**: 632-636.
- Rihn, B., Bottin, M.C., Coulais, C. and Martinet, N., Evaluation of non-radioactive labeling and detection of deoxyribonucleic acids. Part Two: Colorigenic methods and comparison with chemiluminescent methods. *J. biochem. biophys. Meth.* 1995a, **30**: 91-102.
- Rihn, B., Coulais, C., Bottin, M.C. and Martinet, N., Evaluation of non-radioactive labeling and detection of deoxyribonucleic acids. Part One: Chemiluminescent methods. *J. biochem. biophys. Meth.* 1995b, **30**: 103-112.
- Rohan, R.M., King, D. and Frels, W.I., Direct sequencing of PCR-amplified junction fragments from tandemly repeated transgenes. *Nucl. Acids Res.* 1990, **18**: 6089-6095.
- Sinn, E., Müller, W., Pattengale, P., Tepler, I., Wallace, R. and Leder, P., Coexpression of MMTV/*v-Ha-ras* and MMTV/*c-myc* genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes *in vivo*. *Cell* 1987, **49**: 465-475.
- Stanta, G. and Schneider, C., RNA extracted from paraffin-embedded human tissues is amenable to analysis by PCR amplification. *BioTechniques* 1991, **11**: 304-308.
- Storer, R.D., Cartwright, M.E., Cook, W.O., Soper, K.A. and Nichols, W.W., Short-term carcinogenesis bioassay of genotoxic procarcinogens in *PIM*TM transgenic mice. *Carcinogenesis* 1995, **16**: 285-293.
- Vogelstein, B., Many gene changes found in cancer. *Science* 1989, **246**: 1386-1388.
- Webster, M.A. and Muller, W.J., Mammary tumorigenesis and metastasis in transgenic mice. *Semin. Cancer Biol.* 1994, **5**: 69-76.

8. Effets des éthers de glycol sur des souris transgéniques

Puis nous avons étudié l'action d'un éther de glycol, le 2-butoxyéthanol, sur (i) la formation de tumeurs mammaires de souris, (ii) la formation d'adduits hydrophiles et hydrophobes, (iii) la méthylation du gène *ras* et de l'ensemble du génome. Depuis deux décennies, des études ont été entreprises pour mesurer les effets toxiques de ces produits, surtout ceux dérivés de l'éthylène-glycol. Plusieurs effets ont été mis en évidence dont les effets sur la reproduction (testiculaires) et effets hématologiques. Ils pénètrent dans l'organisme par les voies respiratoires et par les voies cutanées. La voie cutanée est dans certains cas la voie de pénétration prépondérante. Dans l'organisme, concernant les dérivés de la série éthylénique, la voie de métabolisation aboutit, par oxydation du groupement hydroxy en groupement acide, à la formation d'un acide alkoxyacétique spécifique.

Nous avons montré que le 2-butoxyéthanol administré par mini-pompe osmotique pendant 15 jours (dose totale 10 mmol/kg), était dénué d'effets génotoxique et épigénétique tels qu'ils sont mesurés par (i) la méthylation de l'ADN total, (ii) la méthylation du transgène *v-Ha-ras* et (iii) l'absence de formation d'adduits hydrophobes et hydrophiles sur l'ADN. De plus, le 2-butoxyéthanol n'a pas induit la formation de tumeurs chez les animaux transgéniques portant *v-Ha-ras*. Ces résultats sont présentés dans les pages suivantes. D'autres effets épigénétiques n'ont pas été testés sur ce modèle animal.

ETHYLENE GLYCOL MONOBUTYL ETHER HAS NEITHER EPIGENETIC NOR GENOTOXIC EFFECTS IN ACUTE TREATED RATS AND IN SUBCHRONIC TREATED *v-HA-ras* TRANSGENIC MICE

G. KEITH,* C. COULAIS,† A. EDORH,* M. C. BOTTIN,† B. RIHN†

**Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, UPR 9002, 15 rue Descartes 67084 Strasbourg Cedex, France* and †*Institut National de Recherche et de Sécurité, avenue de Bourgogne, BP 27, 54501 Vandoeuvre Cedex, France*

The epigenetic and genotoxic actions of ethylene glycol monobutyl ether (2-butoxyethanol) have been studied in rats and transgenic mice. One acute dose (120 mg/kg) was administered *per os* in rats and the animals were killed 24 hr later. In the case of transgenic mice (carrying the *v-Ha-ras* oncogene controlled by the Mouse Mammary Tumor Virus promoter) 1500 mg/kg were administered over 2 weeks using subcutaneously implanted osmotic minipumps. The latter animals were terminated 5, 10, 15, 60, 90 and 120 days after the first day of administration. The effect of 2-butoxyethanol was examined at the DNA level of 5 organs: liver, brain, kidney, spleen and testis using ³²P postlabelling methods. The possible formation of hydrophobic adducts and the 5-methyldeoxycytosine content in the DNA of treated rats and transgenic mice were thus investigated. Moreover, the methylation of the *ras* genes, as well as tumor formation in mice were assessed. Neither hydrophobic nor hydrophilic adducts were detected in the DNA of treated rodents compared to controls. No differences were detected between the level of 5-methyldeoxycytosine in the DNA of chemically treated rats and that of the control group. In addition, the study of the methylation of the *ras* genes did not reveal any significant differences between the control group and treated animals. At necropsy, there was no statistical difference in the tumor formation between control mice and transgenic mice exposed to 2-butoxyethanol after 120 days. In conclusion, 2-butoxyethanol displayed neither epigenetic, nor genotoxic effects in acute treated rats and in subchronic treated transgenic mice carrying *v-Ha-ras* oncogene.

KEY WORDS: Ethylene glycol monobutyl ether, transgenic mice, rats, methylation, DNA adducts, tumor, epigenetic effect, genotoxicity

1. INTRODUCTION

Ethylene glycol ethers (EGEs) are chemicals which are used in a variety of industrial processes (Grant, 1985; Browning, 1994) because of their high miscibility in water and in a large number of organic solvents. However, these compounds cause some concern

For correspondence: B. Rihn, Institut National de Recherche et de Sécurité, avenue de Bourgogne, BP 27, 54501 Vandoeuvre, Cedex, France. E-mail: rihn @ inrs.fr Ph/Fax: +33 83502062

in occupational health because it has been reported that they induce hematopoietic disorders, and display developmental and reproductive toxicity, especially in male germ cells, both in human and in laboratory animals (Hardin, 1983; Cheever 1989; Spano, 1991; Smialowicz 1992). Although some EGEs are known to be hematopoietic or testicular toxicants at doses ranging from 100 to 900 mg/kg body weight in rodents, no mutagenic action has been reported so far. The only toxicological data available correspond to morphological or enzymic changes induced either in whole rodents or *in vitro* assays (Ghanayem, 1989).

The aim of this work was to study the action of ethylene glycol monobutyl ether (2-butoxyethanol), one of the most widely used compounds of the ethylene glycol ether class (Cicolella, 1992), on the molecular level i.e. on DNA. Indeed, to the best of our knowledge, epigenetic effects of ethylene glycol ethers have never been reported, although this could explain the reproductive disorders or the bone marrow action of some representatives of this class of chemicals.

They could act on DNA methylation especially at the m5dCpdG doublets, which are heritable and have various genomic patterns during development and differentiation (Holliday, 1993), and on tumor cells (Gloudemans, 1992; Vachtenheim, 1994). The methylation status of dCpdG is shown in the current work by the use of *Hpa* II, a methylation sensitive restriction enzyme, and *Msp* I which digests DNA at the same sequence (CCGG) regardless of whether deoxycytosine is methylated or not.

In addition, the toxicity of 2-butoxyethanol in the target organ (testis, spleen, liver, but also in kidney, bone-marrow and brain) was investigated by studying the overall level of m5dC in rats and mice.

Since 2-butoxyethanol is metabolized into 2-butoxyacetaldehyde, which could react (e.g. other aldehydes: glutaraldehyde and acetaldehyde) on DNA at the molecular level and thus lead to the formation of DNA-adducts which are very often implicated in cancer pathogenesis (Miller, 1981), we have checked for such DNA-adduct formation upon 2-butoxyethanol treatment in rats and mice by using the ³²P postlabelling method of Randerath (Randerath, 1981; Randerath, 1985; Reddy, 1986).

Transgenic mice should provide valuable bioassays for potential carcinogens testing (Adams and Cory, 1991). As these mice can be considered as initiated (namely carrying and expressing an oncogene, a particular animal paradigm has been used, namely *v-Ha-ras* transgenic mice (Rihn *et al.*, 1995). This transgenic mouse strain carries the viral Harvey *ras* (*v-Ha-ras*) oncogene controlled by the mouse mammary tumor virus (MMTV) promoter (Sinn, 1987). The *v-Ha-ras* oncogene differs from the rodent *c-Ha-ras* protooncogene by only two amino acid substitutions leading to its activation.

The p21^{ras} transducin encoded by the oncogene stimulates continuous cell growth and thus leads to tumor formation. It is therefore a powerful tool for the investigation of predictable carcinogenesis. Both males and females spontaneously develop breast carcinoma, parotid adenocarcinoma as well as Harderian hyperplasia. However the occurrence of these tumors is significantly increased following intoxication by initiator or promoter agents. In addition the *ras* oncogene has been found prevalent in a variety of human carcinomas and is mutated (activated) in 10 to 30% of all human and rodent tumors (Bos, 1989). Our hypothesis was that 2-butoxyethanol could act as a non-geno-

toxic carcinogen and thus could show an acceleration of tumorigenesis in treated animals as compared to a control group.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Chemicals

Ethylene glycol monobutyl ether (2-butoxyethanol) (CAS number 11-76-2, FW = 118.2) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). It was >99% pure according to high performance liquid chromatography (data not shown). The restriction enzymes *Kpn* I, *Hpa* II, *Msp* I, nuclease P₁ (EC 3.1.30.1), micrococcal nuclease (EC 3.1.30.1), spleen phosphodiesterase (EC 3.1.16.1), Dig-11-dUTPTM (digoxigenin 3-O-methyl-carbonyl- ϵ -amino-caproyl-[5-(3-aminoallyl)-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate]), all products for non-radioactive detection and labelling of nucleic acids, DigTM detection, and labelling kit were from Boehringer, Mannheim, Germany. The detections of hybridized probes were performed using the chemiluminescent substrate AMPPDTM (or 3-(2'-spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3''-phosphoryloxy) phenyl-1, 2-dioxetane from Tropix Inc. (Bedford, MA, U.S.A.).

$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP was obtained from Amersham (Bucks, U.K.). T₄ polynucleotide kinase (EC 2.7.1.78) was obtained from US Biochemicals (Cleveland, Ohio, USA), apyrase (EC 3.6.1.5.) from Sigma (St Louis, Mo, U.S.A.) and the cellulose thin layers (F1440) were from Macherey Nagel (Dassel, Germany). The polyethylenimine-cellulose (PEI-cellulose) plates were prepared in our laboratory according to the method of Randerath *et al.* (1981).

2.2 Animals

Sprague Dawley rats (~260 g) were treated with a single dose of 2-butoxyethanol *per os* (120 mg/kg) in water (0.015 ml/g body weight) and the animals were killed 24 hours later. The brain, testis, liver, spleen, kidney of 3 treated and 3 control animals were used for DNA extraction. Transgenic mice (Oncomice Neo 01TM) were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA, U.S.A.) under Du Pont license (Boston, MA, U.S.A.). This FVB/N strain carries the viral Harvey *ras* (*v-Ha-ras*) oncogene controlled by the mouse mammary tumor virus (MMTV) promoter. The MMTV/*v-Ha-ras* fusion gene contains the MMTV LTR region which is required for glucocorticoid control, promoter action, capping and it controls the expression of the fused *v-Ha-ras* oncogene (Sinn, 1987). Seven week old transgenic mice (~25 g) were randomized and numbered by tattoo. Males were housed one/cage and females five/cage in polycarbonate cages covered with spun-bonded polyester cage filters. Room temperature was $21 \pm 1^\circ\text{C}$, the pressure was 5 mm H₂O above atmospheric pressure, humidity ranged from 40–60 % and fluorescent light was 12 hr/day. Animals consumed pellet feed and water *ad libitum*. Fifty animals (25 females and 25 males) were implanted subcutaneously, for two weeks, at the back with minipumps (2002 AlzetTM, Alza Corp., Palo Alto, CA, U.S.A.) filled in such a way that they continuously delivered 2-butoxyethanol (pumping rate: ~0.5 $\mu\text{l/hr}$, 120 mg/kg/day). Untreated animals (25 females and 25

males) were infused with saline only. The doses of 2-butoxyethanol were calculated in order to deliver 1500 mg/kg. The infusion did not cause any adverse effect on food and water consumption. At each sampling date an equal number of treated and control animals of both sexes were killed. The number of animals per group was 8, 8, 12, 24, 24, 24 at days 5, 10, 15, 60, 90, and 120 after pump implantation, respectively. Mice were monitored weekly for body weight and appearance of palpable mammary tumors. For histologic examination, tumor or organ specimens were fixed in Bouin's and in 4% formalin solutions, embedded in paraffin, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin for classification. For the 120 day-range (24 animals), the mammary glands were dissected and separately processed.

2.3. Labelling of cDNA Probes

The DNA probes were labelled using a classical PCR procedure but replacing 2.0 mM dTTP by 1.3 mM dTTP + 0.7 mM digoxigenin-dUTPTM in order to obtain digoxigenin labelled probes (Lanzillo, 1990). The amplified DNA fragment corresponded to the 789 bp product from the base number 161 to 950 (rat *c-Ha-ras* gene, accession number M13011, Genbank, NIH, MA, USA). The labelled probes were precipitated overnight at -20°C with 2.0 µl of 0.5 M EDTA, 6.2 µl of 4 M LiCl and 150 µl of absolute ethanol. The pellets were washed twice with a 70 % aqueous ethanol solution (v/v) and dried under vacuum.

2.4. DNA Extraction and Hybridization

Genomic DNA was isolated by standard procedures using proteinase K (EC 3.4.21.14) digestion and chloroform extractions. Aliquots (5 µg) were incubated with restriction endonucleases *Kpn* I (20 units) and *Hpa* II (20 units) or *Kpn* I (20 units) and *Msp* I (20 units). Digestion of unmethylated *Hpa* II sites was controlled by the addition of 5 µg of pMNU-1 (ATCC, N° 41049, Rockville, MA, U.S.A.), a plasmid constructed by inserting a 6.8 kbp *Bam* HI fragment containing the MNU-*Ha-ras* gene into *Bam* HI site of pBR 322. All digests were completed as indicated by cleavage of pMNU-1 DNA. Following electrophoresis in 1.0% TAE-agarose, the hydrolyzed DNA was denatured, neutralized and, transferred under vacuum using a 20 fold SSC solution onto Nytran N13TM membranes (Schleicher and Schuell, Dassel, Germany). The DNA was UV fixed onto the membranes and further treated according to the manufacturer instructions. Non-radioactive detection using AMPPDTM was carried out as indicated in the supplier manual. Membranes were exposed for 3 to 4 hours to Kodak X-OMATTMAR film (Eastman Kodak, Rochester, NY, U.S.A.) at room temperature.

2.5. Determination of m5d Cytosine Content and Hydrophilic DNA-Adducts

The m5dC contents of DNA were determined using ³²P postlabelling. DNA was first digested into 3'-phosphate nucleosides by a mixture of micrococcal nuclease and spleen phosphodiesterase, and were postlabelled by $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP and T₄ polynucleotide kinase. After digestion of the excess of ATP by potato apyrase, the ³²P-5',3'-diphosphonucleosides were digested into ³²P-5'-monophosphate nucleosides by nuclease P₁ (this en-

zyme has 3' phosphomonoesterase activity). Separation of the labelled mononucleotides was performed by chromatography on cellulose thin-layer developed with the following solvents: 1st dimension, isobutyric acid/25% NH₄OH/H₂O (50/1.1/28.9, by vol.); and 2nd dimension, monosodium phosphate 0.1M, pH 6.8/ammonium sulfate/n-propanol (100/60/2, v/w/v). The labelled nucleotides were detected by autoradiography and the radioactivity was counted either by scintillation counting after scraping the spots from the cellulose plates, or using a Bio-imager analyser Bas2000 (Fuji, Japan). Search for hydrophilic DNA-adducts, which could have been formed by action of 2-butoxyethanol metabolites onto DNA, was explored by overexposure of the autoradiograms.

2.6. Hydrophobic DNA-Adducts Analysis

The detection of hydrophobic DNA-adducts was performed using the ³²P postlabelling method developed by Randerath *et al.* (1981, 1985) and Reddy *et al.* (1986). The DNA was digested into 3'-phosphonucleotides by means of micrococcal nuclease and spleen phosphodiesterase and the adducts were privileged versus the normal nucleotides by nuclease P₁ enrichment. The adducts were postlabelled using γ^{32} P-ATP and T₄ polynucleotide kinase and the excess of γ^{32} P-ATP was eliminated by potato apyrase digestion. At this stage, the adducts were chromatographed on several PEI-cellulose TLCs. The first solvent (sodium dihydrogenatephosphate 2.3 M, pH = 5.7) allowed the separation of the hydrophobic adducts from inorganic phosphate and pyrophosphate occurring from apyrase treatment of ATP, and from the small amount of major nucleotides that have been left by the successive enzymatic treatments. Further migrations containing urea were used to separate the hydrophobic adducts (Tomlinson, 1963). The solvent for dimension 2 was urea 6.25 M, lithium formate 3.25 M (pH = 3.5), and for dimension 3, was urea 7.5 M, lithium formate 4.25 M (pH = 3.5). Finally, the TLC plates were immersed in a 1.7 M monosodium phosphate solution to wash out the remaining radioactivity of non-hydrophobic adducts which could have been left after the other migrations.

We have either separated the postlabelled adducts directly or after an additional digestion by venom phosphodiesterase (EC 3.1.15.1.). This latter enzyme is used to digest any bonds between adducts and adjacent nucleotides which could have been left after the above hydrolysis steps (Keith and Dirheimer, 1995).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Methylation of Ha-ras Genes of Transgenic Mice

Digestion of genomic DNA from mouse testis with *Msp* I revealed three fragments of 700, 230 and 60 bp derived from the v-Ha-ras transgene, and a 470 bp fragment corresponding to two restriction fragments (473 bp + 468 bp) belonging to the c-Ha-ras protooncogene (Figure 1). After digestion of genomic DNA with *Hpa* II, the fragments that were detected using *Msp* I were absent. However, in the *Hpa*-digested DNAs several larger hybridizing fragments were found (4.8 Kbp for the c-Ha-ras protooncogene

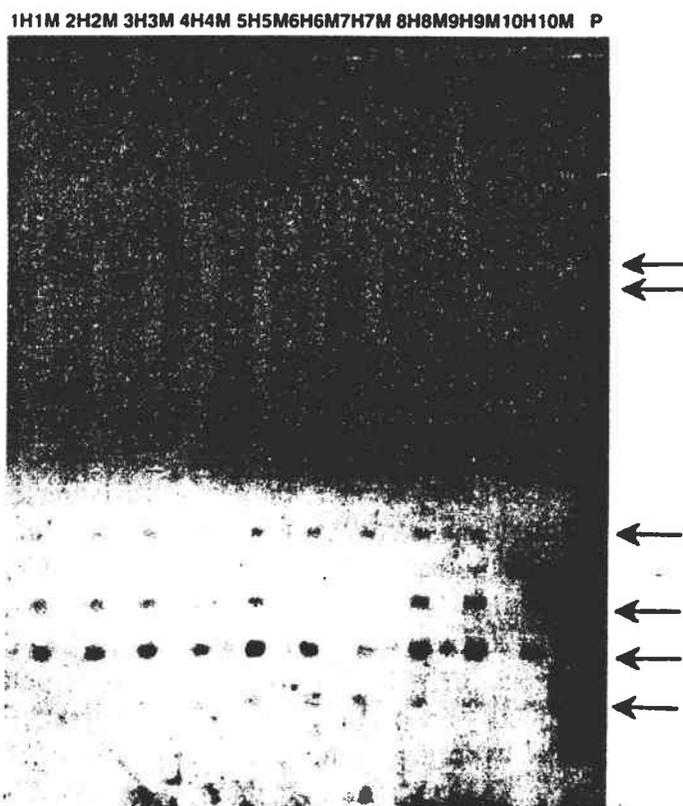


Figure 1 Southern blot hybridization with a Dig-dUTPTM-labelled *ras* complementary DNA probe (P). The DNAs were digested with *Hpa* II (H) or *Msp* I (M). The lanes correspond to testis DNA from control mice (1: before treatment, 2: 5 + 10 days, 3: 15 + 60 days, 4: 90 + 120 days) and from treated mice (5: 5 days, 6: 10 days, 7: 15 days, 8: 60 days, 9: 90 days, 10: 120 days). Arrows from top to bottom: ~4.8 kbp (c-Ha-*ras* protooncogene), ~3.7 kbp (*v*-Ha-*ras* transgene), ~700 bp (*v*-Ha-*ras* restriction fragment), ~470 bp (c-Ha-*ras* restriction fragment), ~230 bp (*v*-Ha-*ras* restriction fragment), ~60 bp (*v*-Ha-*ras* restriction fragment).

and 3.7 Kbp for the *v*-Ha-*ras* transgene) due probably to methylation of the dCpdG base pairs in the *ras* genes.

The testicular DNA digestion patterns in the mouse were similar for both control (lanes 1–4) and 2-butoxyethanol-exposed mice (lanes 5–10) regardless of the elapsed time. The same was found in DNA from spleen, brain, kidney and liver (data not shown). According to these results, one could conclude that the methylation status of the Ha-*ras* genes was not affected by a subchronic administration of 2-butoxyethanol. In fact, this chemical did not act as a demethylating agent. In addition, these results demonstrate that in testis and spleen, which are both organs with high mitosis rates, 2-butoxyethanol does not alter the activity of the maintenance dCpdG methylase. Indeed, during DNA replication the maintenance dCpdG methylase recognizes the hemimethylated DNA, and methylates the newly formed strand. If this enzyme was to be affected or inhibited, demethylated DNA and gene expression should result. In the subchronic mouse experiments that are shown here, 2-butoxyethanol did not induce any demethylation of the Ha-*ras* genes. Conversely, 2-butoxyethanol did not induce 5-mdC formation as shown by the *Msp* I digestion patterns for both genes (Figure 1). The intensity

of the *Msp* I-digested DNA fragments was comparable in both control and chemically-exposed animals. Thus because m5dC was more liable to deamination than dC, consequently to m5dC → T transition mutation (Holliday, 1993), it seems unlikely that 2-butoxyethanol induces any mutation by dC methylation.

3.2. Methylation Level of the Whole Genomes of Rats and Mice and Hydrophilic Adduct Determination in Mice

In addition to the *Ha-ras* genes' methylation assessments, the overall methylation level of the DNA under subchronic or acute treatment performed on transgenic mice or rats was also investigated. The results are shown in Figure 2A and 2B for the spleen DNA. The methylation pattern did not vary with either subchronic or acute 2-butoxyethanol exposure, thus suggesting that the chemical did not induce any changes in the level of DNA methylation. The same pattern was found in all other organs evaluated. The mean values of m5dC content of DNA from mice and rats revealed no significant variation in rats (brain, kidney, liver, spleen and testis) and mice (brain, bone marrow, spleen and testis) (Table I). These results led to the conclusion that the methylation of the whole genome was neither affected by acute nor by subchronic 2-butoxyethanol exposures.

In order to check for other modified nucleotides which could carry aliphatic side chains, the autoradiograms of the chromatograms in which the m5dC contents were detected were overexposed. The modified nucleotides mentioned (*i.e.* hydrophilic adducts which should migrate in the neighborhood of the major nucleotides, but at levels far below those of the latter) could be due to 2-butoxyethanol metabolites after detoxification. Indeed it is known that 2-butoxyacetaldehyde is one such metabolite

Table I Methylation levels of the DNA extracted from different organs originating from animals treated with 2-butoxyethanol compared to control animals. The results are expressed in percentages of m5dC related to total cytidylic acid derivatives (m5dC + C). They correspond to the mean values of 5 assays (mice) and 15 assays (rats) performed on each type of DNA. No differences between groups were found.

	CONTROL		MICE (MALES)				RATS (MALES)	
	Day 0	120	10	15	TREATED		CONTROL	TREATED
					60	90	Day 1	Day 1
Brain	3.0	3.1	2.9	3.1	3.3	3.2	3.5	4.0
Bone marrow	3.9	3.3	4.0	3.9	3.8	4.3	ND	ND
Spleen	5.2	5.1	5.2	4.8	5.2	5.5	3.6	3.9
Testis	3.9	3.8	3.7	3.9	4.1	3.9	3.4	3.7
	CONTROL		MICE (FEMALES)				RATS (MALES)	
	Day 60	120	10	TREATED		CONTROL	TREATED	
				60	90	120	Day 1	Day 1
Brain	4.2	3.7	3.1	3.9	3.6	3.6	3.5	4.0
Bone marrow	4.1	4.1	5.2	3.7	4.0	3.7	ND	ND
Spleen	4.6	5.1	4.6	4.6	5.8	5.5	3.6	3.9
Testis	-	-	-	-	-	-	3.4	3.7
Liver	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.5	3.8
Kidney	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.0	3.6

that can lead to such adducts by interacting with DNA. Such modified nucleotides can be detected at a level as low as one among 10^5 nucleotides. No differences could be seen between the nucleotide content of control DNA and the DNA of exposed mice or rats, regardless of the organs tested. An example of spleen DNA is shown in Figures 2C and 2D. However, contamination by very small amounts of ribonucleotides (major ones and modified ones) coming from transfer RNA or ribosomal RNA, could be detected, and were found to be at the same level in all the samples.

3.3. Tumor Formation in Transgenic Mice

Necropsy and histological examinations were recorded for the 120 day-sampling. The mammary glands in six control female mice showed cellular hyperplasia versus 5 of the exposed ones. Only one control female had a papillary cystic adenoma of the mam-

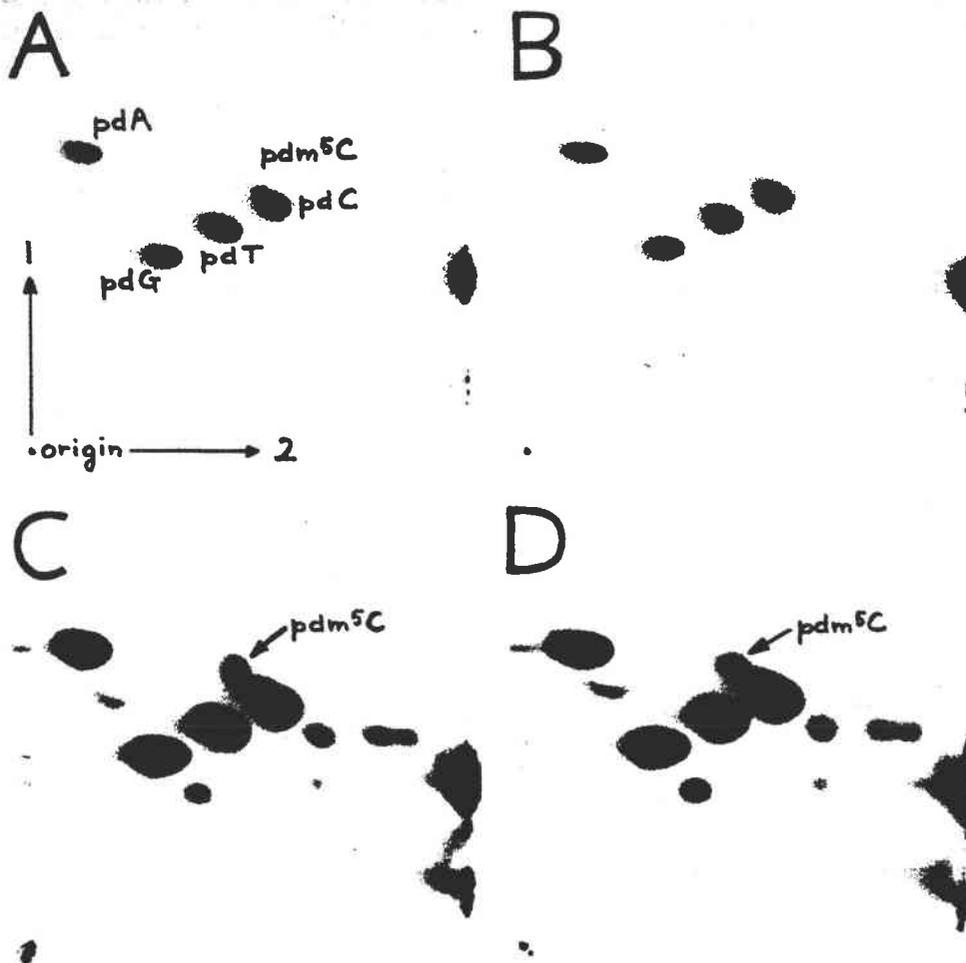


Figure 2 TLC maps of ^{32}P -labelled nucleotides obtained from mouse spleen DNA. A: DNA from control animals. B: DNA from 2-butoxyethanol treated animals. C: Idem as A, but with overexposure of autoradiograms. D: Idem as B, but with overexposure of autoradiograms. 1: first dimension, and 2: second dimension.

mary glands, and one treated mouse showed an anaplastic carcinoma of the bladder. The *v-Ha-ras* transgenic mice carrying an activated oncogene under active promotion (due to the presence of the MMTV promoter) are considered as initiated mice *i.e.*, mice presenting a stable and heritable mutation at the *Ha-ras* gene. Non-genotoxic agents such as those which activate the protein kinases, or mitogenic, or methylating agents could be screened using this test (Goldsworthy *et al.*, 1994; Vaino, 1995). The occurrence of tumors in *Ha-ras* and *p53* knockout transgenic mice increased as well as the latency time decreased when such animals were treated with genotoxic or non-genotoxic agents (Breuer *et al.*, 1991; Tennant *et al.*, 1995). Moreover using *c-Ha-ras* transgenic mice, a single *i.p.* injection of 50 mg/kg of N-methyl-N-nitrosourea induced papillomas in the forestomach following 12 weeks at 100% incidence (Izawa *et al.*, 1992). Using the *pim 1* model, Breuer *et al.* (1991) showed that N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) induced lymphomas in a dose dependent manner. With a medium dose of 60 mg/kg of ENU the incidence of lymphomas at 120 days was 90%. The *pim-1* transgenic mice were found approximately 25 times more susceptible to ENU-induced lymphomagenesis than non transgenic mice.

In our study such effects were not shown as neither the tumor occurrence nor the latency period were affected by 2-butoxyethanol treatment. Therefore it could be hypothesized that this chemical does not promote initiated cells carrying the *v-Ha-ras* oncogene. But further studies (especially long term studies) are necessary in order to evaluate this transgenic animal model.

3.4. Hydrophobic Adducts Formation in Rats DNA

Because no differences in the methylation patterns and the formation of hydrophilic adducts were found in the DNA of 2-butoxyethanol treated and control animals, we checked further for hydrophobic adducts. Our hypothesis was that 2-butoxyethanol could be an inducer of cytochrome P₄₅₀, and could therefore lead to the formation of hydrophobic adducts as found in DNA of animals that have been treated with estrogens. Indeed Liehr (1986) demonstrated the formation of hydrophobic DNA-adducts whose chemical structures were not directly related to the estrogens that were injected, using the postlabelling method. Another assumption was that 2-butoxyethanol could increase the level of the I compounds (*i.e.* initial compounds) present in animals after aging and/or related to the diet (Randerath, 1991). We therefore extensively screened the DNA digests after postlabelling in order to detect the formation of hydrophobic adducts in DNA from treated animals as compared to the control animals. The autoradiograms obtained after venom phosphodiesterase hydrolysis of the labelled digests are shown here (Figure 3) since this improvement gave much cleaner and simpler maps than those without that treatment.

Some major adducts, which differ slightly from organ to organ, appear in both DNA from treated and control animals. These adducts were probably the so-called I-compounds (Randerath, 1991). No obvious differences could be seen in these DNA (Figure 3 A,C,E,G and I for the treated animals and Figure 3 B,D,F,H and J for the control animals). One can therefore conclude that 2-butoxyethanol did not lead to the formation of hydrophobic DNA-adducts in the treated animals.

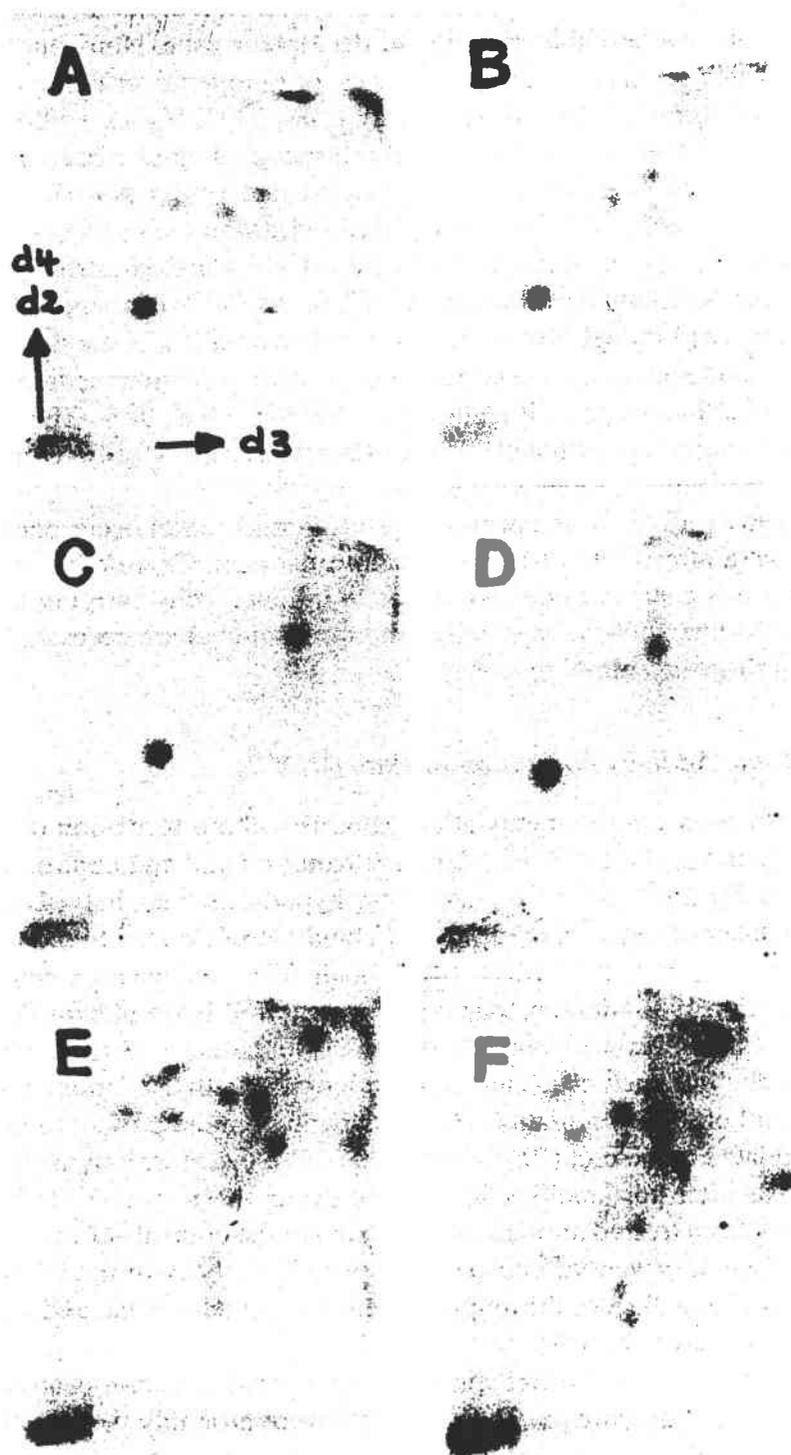


Figure 3 Continued

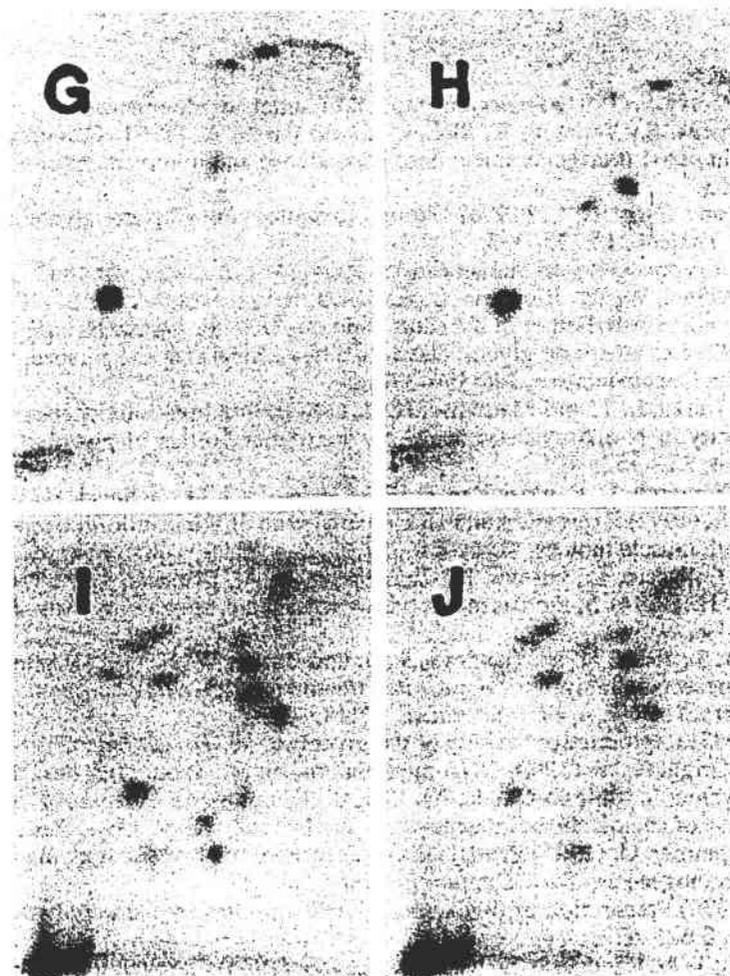


Figure 3 TLC maps of ^{32}P -labelled DNA-adducts obtained from control and 2-butoxyethanol-treated rats. *A, C, E, G* and *I* correspond to DNA samples from control animals and *B, D, F, H* and *J* correspond to DNA samples from treated animals DNA. Samples were from brain (*A,B*), kidney (*C,D*), liver (*E,F*), spleen (*G,H*) and testis (*I,J*). First dimension was run on a separate plate: d2, d3 and d4 correspond to dimension 2, 3 and 4 respectively.

To summarize, 2-butoxyethanol treatments of rats and transgenic mice carrying *ras* oncogenes did not cause any particular effects at the DNA level considering the following endpoints: adduct level, methylation status and tumor formation at 120 days in transgenic *v-Ha-ras* genes. Therefore the hematological, testicular and other cellular effects which have been described previously by others (Hardin, 1983; Grant, 1985; Spano, 1991) may be due to other factors such as non-specific cytotoxicity, cell proliferation or apoptosis deregulation.

Acknowledgements

This work was supported by a grant (Convention N° 800384) from INRS. The skillful technical assistances of G. MOREL and L. DELSAUT and the pathological studies of D. ZISSU are gratefully acknowledged.

References

- Adams, J. M. and Corry, S. (1991) Transgenic models of tumor development, *Science*, **254**:1161–1166.
- Breuer, M., Wienjens, E., Verbeek, S., Slebos, R. and Berns, A. (1991) Carcinogen-induced lymphomagenesis in *pim-1* transgenic mice: dose dependence and involvement of *myc* and *ras*. *Canc. Res.*, **51**:958–963.
- Browning, R. G. and Curry, S. C. (1994) Clinical toxicology of ethylene glycol monoalkyl ethers. *Hum. Experim. Toxicol.*, **13**:325–335.
- Bos, J. L. (1989) *Ras* oncogenes in human cancer: a review. *Canc. Res.*, **49**:4682–4689.
- Cheever, K. L., Weigel, W. W., Richards, D. E., Lal, J. B. and Plotnick, H. B. (1989) Testicular effects of Bis(2-methoxyethyl)ether in the adult male rat. *Toxicol. Indust. Health*, **5**:1099–1109.
- Cicoella, A. (1992) Les éthers de glycol: état actuel des connaissances, perspectives de recherche. *Cahiers de Notes Documentaires*, **148**:359–378.
- Ghanayem, B. I., Burka, L. T. and Matthews, H. B. (1989) Structure-activity relationships for the *in vitro* hemotoxicity of N-alkoxyacetic acids, the toxic metabolites of glycol ethers. *Chem.-Biol. Interact.*, **70**:3–4, 339–352.
- Gloudemans, T., Popiesch, I., Van der Ven, L. T. M., Lips, C. J. M., Schneid, H., Den Otter, W. and Sussenbach, J. S. (1992) Expression and GpC methylation of the insulin-like growth factor II gene in human smooth muscle tumors. *Canc. Res.*, **52**:6516–6521.
- Goldsworthy, T. L., Recio, L., Brown, K., Donehover, L. A., Mirsalis, J. C., Tennant, R. W. and Purchase, I. F. H. (1994) Symposium overview: transgenic animals in toxicology. *Fund. Appl. Toxicol.*, **22**:8–19.
- Grant, D., Shulsh, S., Jones, H. B., Gangolli, S. D. and Butler, W. H. (1985) Acute toxicity and recovery in the hemopoietic system of rat after treatment with ethylene glycol monomethyl and monobutyl ethers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **77**:187–200.
- Hardin, B. D. (1983) Reproductive toxicity of the glycol ethers. *Toxicology*, **27**:91–102.
- Holliday, R. and Grigg, G. W. (1993) DNA methylation and mutation. *Mut. Res.*, **285**:61–67.
- Izawa, M., Takayama, S., Shindo-Okada, N., Doi, S., Kimura, M., Katsuki, M. and Nishimura, S. (1992) Inhibition of chemical carcinogenesis *in vivo* by azatyrosine. *Canc. Res.*, **52**:1628–1630.
- Keith, G. and Dirheimer, G. (1995) Postlabelling: a sensitive method for studying DNA adducts and their role in carcinogenesis. *Curr. Opinion Biotechnol.*, **6**:3–11.
- Lanzillo, J. L. (1990) Preparation of digoxigenin-labeled probes by the polymerase chain reaction. *BioTechniques*, **8**:621–622.
- Liehr, I. G., Avitts, T. A., Randerath, E. and Randerath, K. (1986) Estrogen-induced endogenous DNA adduction: possible mechanism of hormonal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **83**:5301–5305.
- Miller, E. C. and Miller, J. A. (1981) Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Cancer*, **47**:1055–1064.
- Randerath, K., Reddy, M. V. and Gupta, R. C. (1981) ³²P postlabelling test for DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **78**:6126–6129.
- Randerath, K., Randerath, E., Agrawal, H. P., Gupta, R. C., Schurdak, M. E. and Reddy, M. V. (1985) Postlabelling methods for carcinogen DNA-adducts analysis. *Environ. Health Perspect.*, **62**:57–65.
- Randerath, E., Hart, R. W., Turtutto, A., Danna, T. F., Reddy, R. and Randerath, K. (1991) Effects of ageing and caloric restriction on I-compounds in liver, kidney, and white blood cell DNA of male Brown-Norway rats. *Mech. Ageing Devel.*, **58**:279–296.
- Reddy, M. V. and Randerath, K. (1986) Nuclease P₁ mediated enhancement of sensitivity of ³²P postlabelling test for structurally diverse DNA-adducts. *Carcinogenesis*, **7**:1543–1551.
- Rihn, B., Coulais, C., Bottin, M. C., Edoth, A. and Martinet, N. (1995) Use of non-radioactive methods for the determination of the expression, the sequence, and the copy-number of transgene in mice. *Cel. Mol. Biol.*, **41**:907–917.
- Sinn, E., Muller, W., Pattengale, P., Tepler, I., Wallace, R. and Leder, P. (1987) Coexpression of MMTV/*v-Ha-ras* and MMTV/*c-myc* genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes *in vivo*. *Cell*, **49**:465–475.
- Smialowicz, R. J., Williams, W. C., Riddle, M. M., Andrews, D. L., Luebke, R. W. and Copelan, C. B. (1992) Comparative immunosuppression of various glycol ethers orally administered to Fischer 344 rats. *Fund. Appl. Toxicol.*, **18**:621–627.
- Spano, M., Amendola, R., Bartoleschi, C., Emiliani, S., Cordelli, E., Petit, J. M., Julien, R. and Ratinaud, M. H. (1991) Evaluation of 2-methoxyacetic acid toxicity on mouse germ cells by flow cytometry. *J. Toxicol. Environ. Health*, **34**:157–176.
- Tennant, R. W., French, J. E. and Spalding, J. (1995) Chemical effects in transgenic mice. *The Internatl. Toxicologist*, **7**:13–S–1.

- Tomlinson, R. V. and Tener, G. M. (1963) The effect of urea, formamide and glycols on the secondary binding forces in ion exchange chromatography of polynucleotides on DEAE cellulose. *Biochemistry*, **2**:697-702.
- Vachtenheim, J., Horakova, I. and Notova, H. (1994) Hypomethylation of CCGG sites in the 3' region of *H-ras* protooncogene is frequent and is associated with *H-ras* allele loss in non-small cell lung cancer. *Canc. Res.*, **51**:1145-1148.
- Vaino, H. (1995) Molecular approaches in toxicology: change in perspective. *J. Occup. Environ. Health*, **37**:14-18.

9. Conclusion

Les souris transgéniques permettent une évaluation de la corrélation des cancérogènes génotoxiques (ou non) avec des altérations de gènes spécifiques connus pour être des évènements génétiques importants dans le développement des cancers chez l'homme. Elles permettent également de disséquer les étapes pré-néoplasiques, de faire des analyses morphologiques phénotypiques poussées, de mettre en route des stratégies de traitements classiques ou par le biais de thérapies géniques. Une bonne connaissance de ces étapes peut permettre de déboucher sur des stratégies de dépistages de lésions précoces pré-néoplasiques pouvant aider au mieux un traitement visant éventuellement à éviter le développement tumoral.

De plus, les modèles de souris transgéniques autorisent un abord mécanistique de la biologie des cancers et par voie de conséquence une toxicologie moléculaire, en déterminant de quelle manière exacte les substances issues de l'industrie peuvent agir sur les gènes impliqués dans la différenciation et la croissance cellulaire.

Bien que l'impact futur des animaux transgéniques en toxicologie est difficile à prévoir, la compréhension du développement tumoral chez ces animaux est plus aisée et peut aider à comprendre le développement tumoral chez l'Homme.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'étude de l'expression des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs dans les lésions cancéreuses mammaires est importante. Elle permet de définir dans certains cas des critères pronostiques de gravité et d'évolution de ces lésions. Ces travaux ont également un intérêt fondamental car ils permettent d'associer une altération du fonctionnement cellulaire au phénomène de transformation. Le modèle de souris transgéniques v-Ha-ras permet l'étude des mécanismes cellulaires associés à l'apparition des tumeurs sous l'action d'un seul paramètre externe. Ce modèle expérimental même imparfait pourrait permettre de comprendre les mécanismes de survenue de ces tumeurs.

Ces deux approches sont donc complémentaires et doivent être menées en parallèle pour tenter de mieux appréhender le processus cancéreux chez l'Homme.

ANNEXES

ANNEXE 1

1. Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne *in situ*

La réaction de polymérisation en chaîne après transcription inverse (RT-PCR *in situ*) a été récemment décrite par Nuovo (1992). Elle permet d'étudier directement la présence, la répartition et la concentration relative des ARN messagers (Nuovo, 1992a). Elle a été utilisée pour la recherche des séquences virales chez l'homme : Papillomavirus (Nuovo, 1992b : 185-220), et Virus de l'Immunodéficience Humaine (Nuovo, 1992c).

2. Matériel et méthodes

2.1. Prélèvements

Nous avons tenté de mettre en évidence (RT-PCR *in situ*) des ARN messagers v-Ha *ras* (faiblement exprimés donc non détectables par hybridation *in situ*, à partir de tissus) dans les tumeurs mammaires de souris transgéniques.

2.2. Méthodes

2.2.1. Préparation de l'échantillon

Des coupes de tissus congelés de 6 à 8 μm sont montées sur des lames (Probe-On Plus Microscope slides, CML, Nemours, France) conçues pour permettre l'introduction du milieu réactionnel après montage sous lamelle. Des échantillons sont conservés à -70°C . Les coupes sont fixées 5 min avec une solution de paraformaldéhyde tamponnée à 3 % (pH 7,4). Les lames sont lavées dans 3 bains de PBS de 5 min chacun et rincées à l'eau bidistillée, stérile.

2.2.2. Transcription inverse *in situ*

Les lames sont recouvertes de 100 μ L de solution de transcription *in situ* recouvertes d'un parafilm, placées directement sur le bloc chauffant d'un thermocycleur (PHC-3 : Dri-Block^R Cycler, Techne-OSI, Maurepas-France) et incubées 1 heure à 37°C. Le milieu réactionnel consiste en : Tampon de réaction (x 10), dATP, dCTP, dGTP, dTTP (25 mM chacun), RNAsin (30 u/mL), MgCl₂ (50 mM), DTT (0,1 mM), amorce antisens v-Ha-ras, Boehringer Mannheim), M-MLV Reverse Transcriptase (200 u/mL, Boehringer Mannheim), 1 % BSA (Bovine serum albumin, 10 %), ADN de sperme de saumon (200 mg/mL), H₂O bidistillée et stérile. Les coupes sont incubées pendant une heure à 37°C.

2.2.3. Réaction de polymérisation en chaîne *in situ*

Après séchage partiel de la lame, un cercle de 2 cm de diamètre est tracé avec un stylo gras (PAP penTM). Ceci permettra de contenir la solution d'amplification durant la réaction de PCR.

Une seconde lame sur laquelle est également tracé un cercle de même dimension, de façon à ce qu'ils se correspondent, recouvre la préparation après addition de 60 μ L de milieu réactionnel. Deux lamelles rectangulaires sont placées sur la partie rodée de la lame pour augmenter le volume du milieu réactionnel [Tampon de réaction (x 10), dATP, dCTP, dGTP, dTTP (25 mM chacun), MgCl₂ (50 mM), amorce sens v-Ha-ras, amorce antisens v-Ha-ras, Taq polymérase (Boehringer Mannheim)]. La préparation est scellée à l'huile minérale. La lame est placée sur le bloc chauffant du thermocycleur et soumise à 30 cycles d'amplification : dénaturation (fusion de l'ADN) : 94°C 1 min, hybridation (appariement des amorces) : 55°C, 1 min, élongation des brins néosynthétisés : 72°C, 1 min. La réaction se termine par une phase d'élongation de 12 min.

2.2.4. Lavages

La préparation est lavée 10 min dans différentes concentrations de tampon SSC (2 fois concentrée, 1 fois concentrée, 0,5 fois concentrée) à température ambiante.

2.2.5. Détection des produits amplifiés

Les préparations sont équilibrées dans du tampon malate (acide maléique 100 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,5). La réaction est bloquée avec du tampon malate contenant 2 % de sérum normal de veau (Sigma) et 0,3 % de Triton X-100 (Sigma) 30 min. 100 µL d'anticorps anti-digoxigénine [Fab] peroxydase (Boehringer Mannheim) dilué au 1/500 ième dans le tampon malate sont déposés sur les coupes. Après incubation en chambre humide 3 heures, les lames sont lavées au tampon malate 2x15 min. Après lavage 2x5 min dans du tampon 3 (Tris HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl 50 mM, pH = 9,5), 300 µL de solution de révélation sont déposés : 10 ml de tampon 1, 45 µL NBT, 35 µL BCIP et levamisole 2,4 mg (Sigma).

La coloration est arrêtée par 2 bains de tampon TE. Les coupes sont déshydratées dans des bains d'éthanol successif : 70°, 80°, 95°, 100°, puis les coupes montées dans le mélange permount-xylène (66/34, v/v).

3. Résultats

La recherche des ARNm dans les carcinomes canauxaires infiltrants chez la femme et dans les tumeurs mammaires de souris transgéniques *v-Ha-ras* ont donné des résultats paradoxaux. De petites inclusions intranucléaires ont été observées (Figure 20).

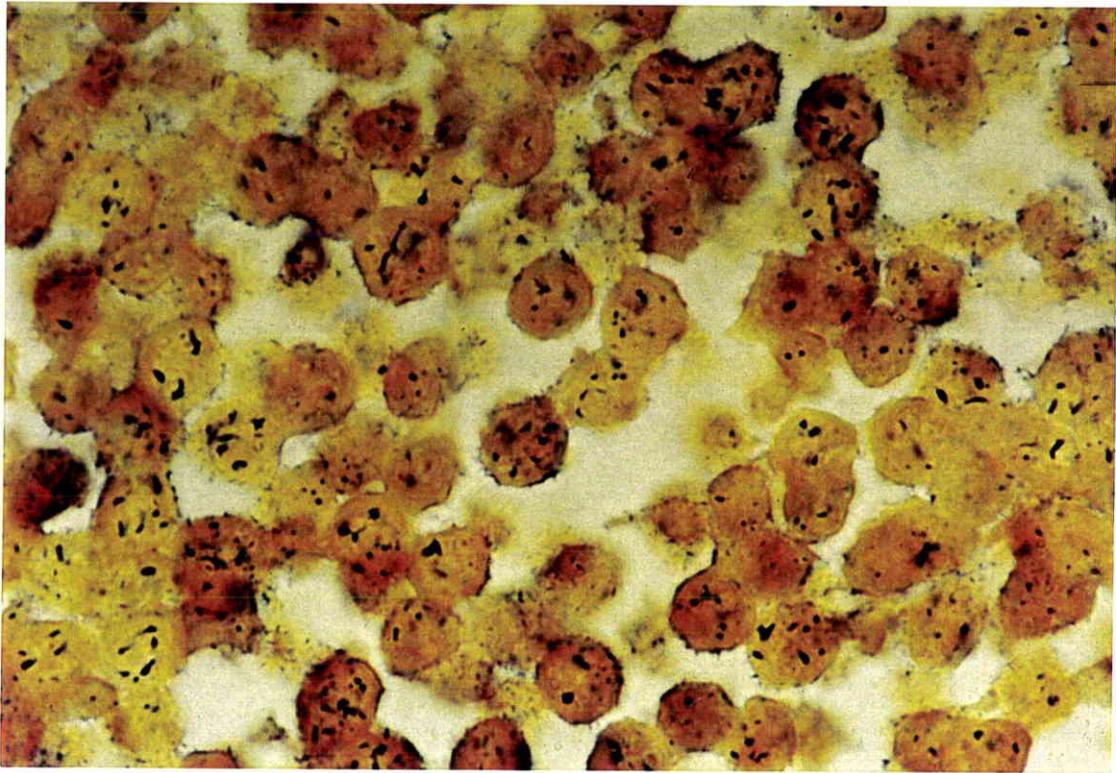


Figure 20 : Tumeur mammaire de souris transgéniques. RT-PCR *in situ*. Petites zones de marquage d'intensités variables (Gr. x 400).

Malgré l'absence de marquage des préparations témoins, il est difficile d'affirmer que des ARNm ont été détectés, d'autant plus que l'architecture cellulaire est difficilement visible.

4. Conclusion

Ces essais préliminaires montrent les difficultés techniques rencontrées dans la mise en oeuvre de la RT-PCR *in situ*. Les problèmes posés ont été les suivants : (i) appareil non approprié dans les premiers essais, (ii) étanchéité de la préparation, (iii) destruction de l'architecture cellulaire. Pour éliminer ces problèmes, il faudrait réduire le nombre de cycles d'amplification pour mieux respecter l'architecture des tissus, utiliser du matériel mieux adapté pour éviter tout assèchement de la préparation au cours des cycles d'amplification. La comparaison des résultats de l'immunohistochimie et de la

RT-PCR *in situ* permettrait de confirmer la spécificité des images observées. Un signal important en RT-PCR *in situ* devrait accompagner une expression augmentée de la protéine correspondante.

ANNEXE 2

1. Détection par immunohistochimie de l'oncoprotéine c-erbB-2 dans les carcinomes et les lésions bénignes du sein

2. Introduction

Dans cette étude, nos objectifs étaient d'établir des corrélations entre la présence de l'oncoprotéine c-erbB-2 et les types de lésions du tissu mammaire cancéreuses ou non : carcinomes infiltrants, néoplasies non invasives, "lésions frontières", lésions bénignes.

3. Prélèvements

173 lésions mammaires obtenues par biopsies ou mastectomies ont été étudiées au Service d'Anatomie Pathologique du Centre Alexis Vautrin. Elles se répartissent en 115 carcinomes infiltrants, 26 néoplasies non invasives dont huit cas de maladie de Paget du mamelon et 32 lésions bénignes (15 dystrophies mammaires avec ou sans hyperplasie épithéliale et 12 fibroadénomes).

Les carcinomes infiltrants d'un type histologique peu fréquent (mucineux, médullaire, apocrine,...) n'ont pas été retenus dans cette étude.

Les 26 néoplasies non invasives individualisées correspondent à des lésions isolées, sans composante infiltrante associée, connue ou identifiable. Il s'agit principalement de carcinomes intracanaux (comédocarcinome, cribriforme ou micropapillaire, massive et mixte). Les variétés cribriformes et micropapillaires, étant fréquemment associées, nous les avons artificiellement regroupées. Les formes mixtes associent différents types de lésions.

4. Méthodes

Tous les prélèvements étaient fixés dans le liquide de Bouin alcoolique (fixateur de Dubosq-Brazil) et inclus en paraffine.

La mise en évidence de l'oncoprotéine a été effectuée par immunohistochimie avec un anticorps polyclonal anti-oncoprotéine c-erbB-2 (Dako) dirigé contre une partie intracellulaire de la protéine, selon la méthode L-Streptavidine-Biotine (L-SAB, Dako). Un résultat positif correspond à un marquage épithélial membranaire.

5. Résultats

71 lésions ont donné un résultat positif. Les résultats, en fonction du diagnostic histologique, sont portés sur le Tableau 5.

Tableau 5 : Types histologiques des lésions étudiées.

	Nombre de cas	c-erbB-2 positif (%)
Carcinomes infiltrants	115	48 (42 %)
canalaire	89	27 (30 %)
lobulaire	24	2 (8 %)
mixte lobulaire et canalaire	2	1 (50 %)
Néoplasies non invasives	26	18 (69 %)
Carcinome intracanaulaire	12	5 (42 %)
Néoplasie intralobulaire	6	1 (17 %)
Maladie du Paget du mamelon	8	7 (88 %)
Lésions bénignes	32	5 (16 %)
dystrophie fibrokystique	15	2 (13 %)
fibroadénome	12	3 (25 %)
papillome	2	0
tissu mammaire subnormal	3	0

Dans 30 % des carcinomes canaux infiltrants, l'oncoprotéine c-erbB-2 est détectée (Figures 21 et 22). Ce qui correspond aux résultats rapportés antérieurement (Porter et coll., 1991; Winstanley et coll., 1991; Gasparini et coll., 1992).

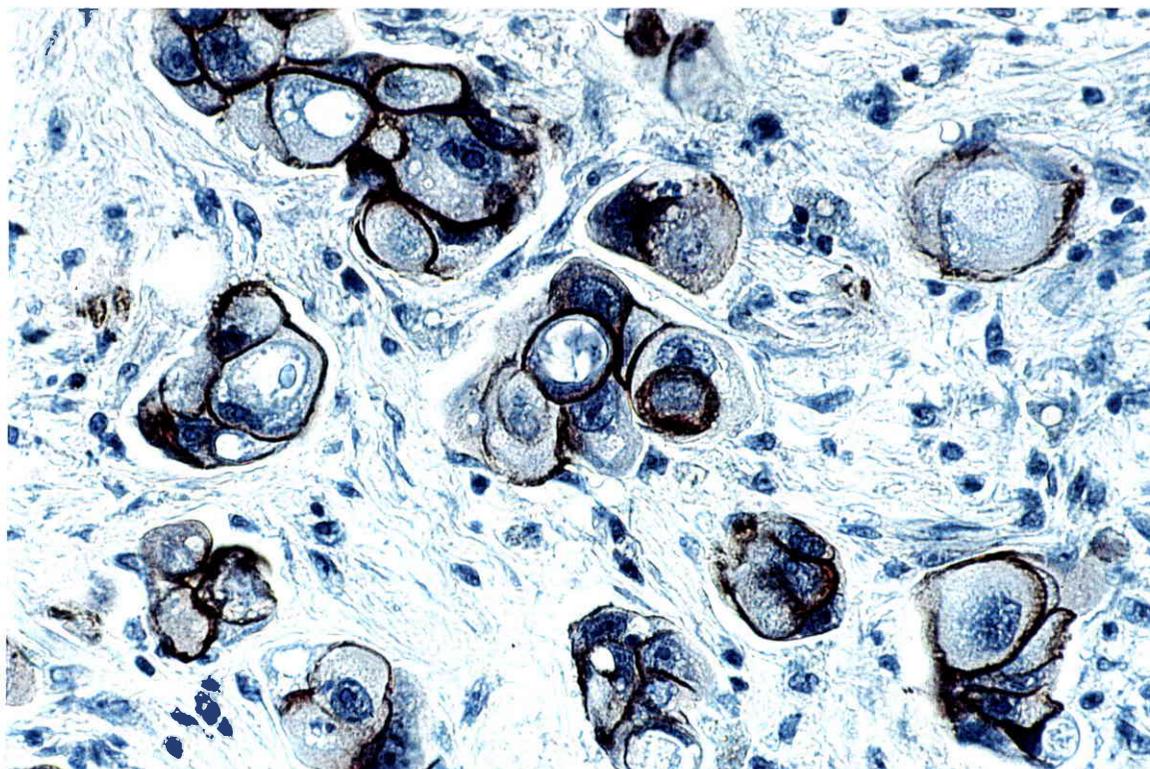


Figure 21 : Carcinome canalaire infiltrant. A noter d'importantes anomalies nucléaires (Gr. x 400).

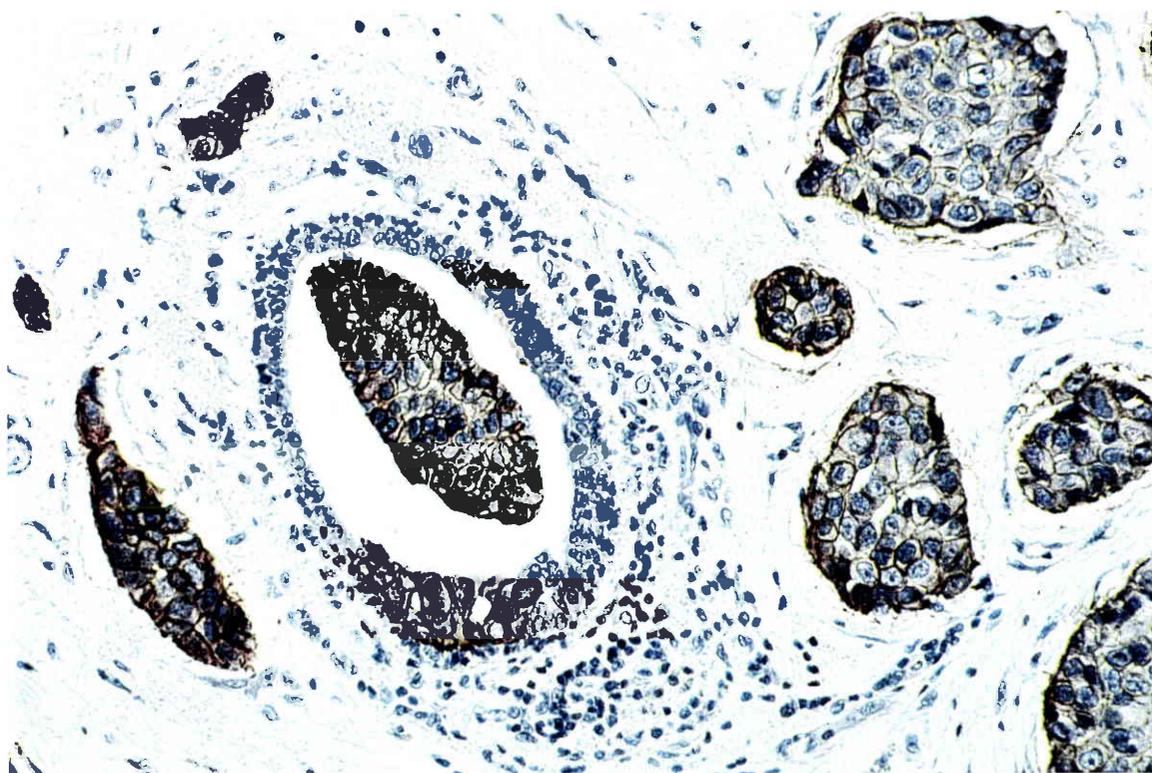


Figure 22 : Carcinome canalaire infiltrant. Absence de marquage de l'épithélium normal au niveau d'un canal (Gr. x 250).

Une comparaison avec le grade histopronostique établi selon le *grading* de Scarff-Bloom-Richardson a été effectuée sur 82 cas. Le pourcentage de tumeurs c-erbB-2 positives est d'autant plus importante que le grade est élevé : 33 % pour le grade III, 31 % pour le grade II et 20 % pour le grade I.

2 des 24 carcinomes lobulaires infiltrants ont présenté un marquage membranaire. Un carcinome infiltrant mixte lobulaire et canalaire a été considéré comme positif (Figure 23) mais le marquage n'était toutefois observé qu'au sein des structures de type canalaire alors que les structures de type lobulaire apparaissaient négatives.

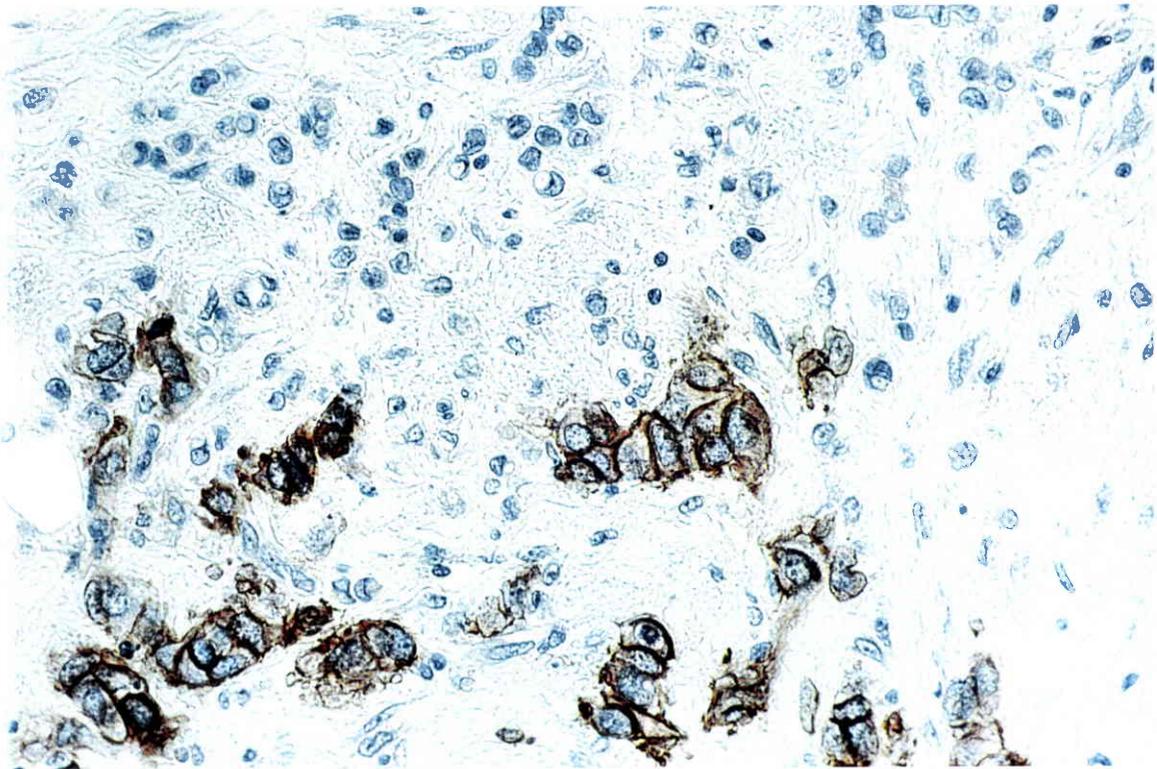


Figure 23 : Carcinome lobulaire et canalaire mixte (Gr. x 250).

L'expression de l'oncoprotéine c-erbB-2 est liée au type de la lésion observée. Elle est peu fréquente dans les lésions bénignes (Figure 24).



Figure 24 : Immunomarquage d'un fibroadénome (Gr. x 100).

Par contre, elle est observée dans 7 cas de maladie de Paget du mamelon sur 8 :
Figure 25 (Edorh et coll., 1995 b).

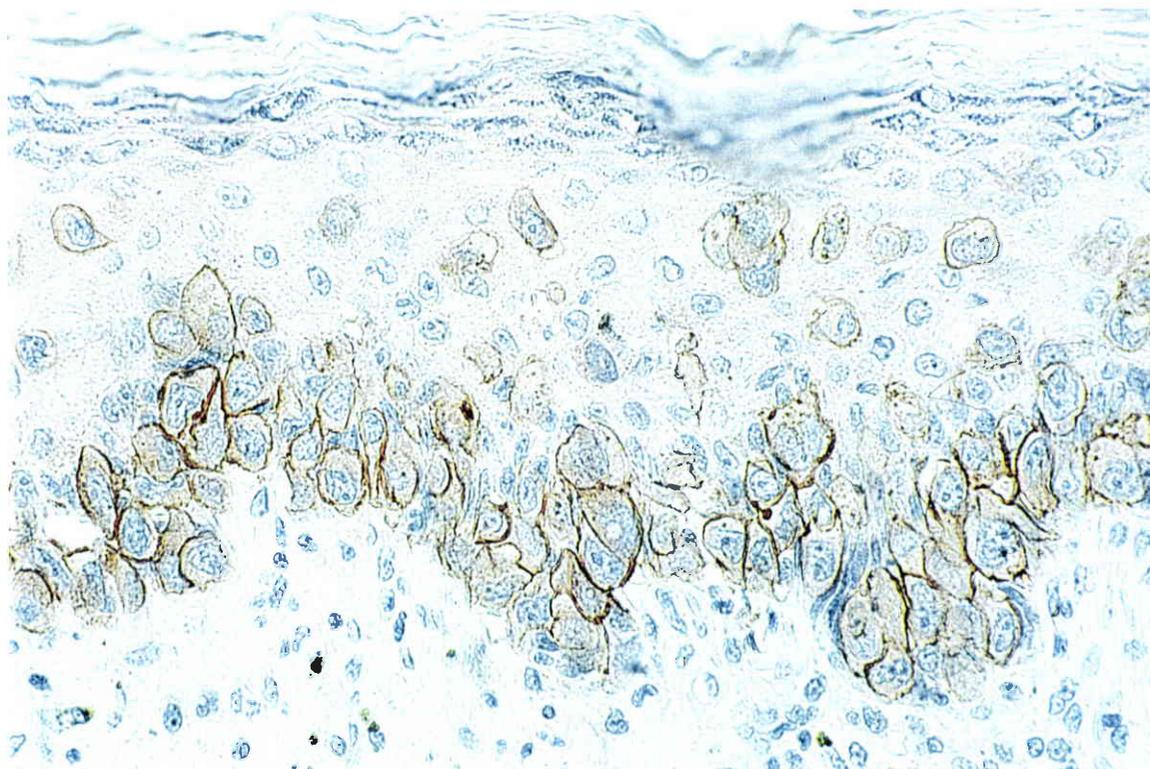


Figure 25 : Marquage des cellules cancéreuses de la maladie de Paget du mamelon (Gr. x 400).

Comme cela a déjà été décrit, le marquage du c-erbB-2 concerne essentiellement la composante canalaire que la lésion soit invasive ou non (Winstanley et coll., 1991; Gasparini et coll., 1992).

6. Conclusion

La protéine c-erbB-2 est exprimée surtout dans les lésions cancéreuses sans qu'il soit possible d'attribuer à cette présence un rôle pronostique. Des études complémentaires seraient nécessaires pour déterminer avec précision quel type cellulaire exprime cette protéine. En effet, il semble exister une corrélation entre la présence de l'oncoprotéine c-erbB-2 et des anomalies cellulaires importantes dont hypertrophie et de nombreuses mitoses. Le marquage concerne exclusivement la lésion étudiée et il est difficile de savoir si la lésion a pris son origine dans une lésion hyperplasique, atypique ou non, identique à celle qui cerne la tumeur.

Des études complémentaires associant l'analyse de la ploïdie des tumeurs et des mesures cytonucléaires par analyse d'images pourraient permettre de mieux caractériser les lésions exprimant l'oncoprotéine c-erbB-2. Enfin, il serait intéressant d'associer ces études morphologiques à la recherche d'autres oncogènes tels que les gènes *int-2*, *c-Ha-ras*, ou le gène suppresseur de tumeur *p53*, qui sont également impliqués dans la cancérogenèse mammaire.

ANNEXE 3

Ce troisième annexe concerne l'étude à court terme de l'inhalation de fibre de crocidolite sur des souris : Validation d'une chambre d'inhalation dont les résultats se retrouvent dans les pages suivantes.

Short-term crocidolite inhalation studies in mice: validation of an inhalation chamber

B. Rihn^{*a}, E. Kauffer^a, P. Martin^a, C. Coulais^a, M. Villa^a, M.C. Bottin^a, J.C. Vigneron^a,
A. Edorh^b, N. Martinet^b

^aInstitut National de Recherche et de Sécurité, Avenue de Bourgogne, 54501 Vandoeuvre, France

^bUnité 14 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Brabois, 54501 Vandoeuvre, France

Received 1 August 1995; accepted 23 January 1996

Abstract

A nose-only inhalation chamber is described: this chamber being computer automated has been particularly designed for mice on which it was validated using a crocidolite aerosol at a nominal concentration of 13.6 mg/m³, 6 h/day during 5 days. A month later the mice showed typical inflammatory bronchoalveolar liquids with many multinucleated or activated macrophages and asbestos bodies. The burden of crocidolite fibers ranged from 345 000 to 1 300 000 fibers per mg of dried lung. This study demonstrates that during the month that followed a short-term mice exposure to crocidolite fibers, the inflammatory response was still persistent. These toxicological endpoints validate the nose-only inhalation chamber to be useful for common or transgenic mice.

Keywords: Crocidolite; Inhalation; Mice; Nose-only; Validation

Introduction

Very few studies using nose-only inhalation procedures have been conducted especially for mice (Pauluhn, 1994), while numerous others have been conducted on rats or guinea pigs (Lunn et al., 1993). Commonly, nose-only inhala-

tion chambers are designed for rats but the emergence and the rapid spread of transgenic mice models require the development of nose-only inhalation chambers designed specifically for these animals. Moreover, the relevance of alternative intoxication routes i.e. intraperitoneal, intrapleural or intratracheal injection have been questioned by an expert advisory panel gathered under the auspices of the Regional Office for Europe of the World Health Organization (Anonymous, 1992). In this context, the carcinogenic potential of asbestos and to a larger extent natural and man-made fibers is still not well

Abbreviations: DNA, deoxyribonucleic acid; L, lymphocytes; D, length on diameter; NS, non-significant; PAM, pulmonary alveolar macrophages; PMC, polymorphonucleated cells; S.D., standard deviation; TNF- α , tumor necrosis factor α .

Corresponding author, Tel.: +33 83502062; Fax: +33 83502019; E-Mail: rihn@inrs.fr.

understood (Walker et al., 1992; Brody, 1993) while studies involving transgenic mice in toxicology are increasing.

Therefore, we undertook the construction of an inhalation chamber permitting inhalation studies on mice using a nose-only exposure. This chamber was validated with an adequate aerosol of crocidolite fibers to intoxicate mice during a short time. The uniformity of the aerosol was assessed by air sampling in the inhalation chamber. To validate further the fiber toxicity three toxicological endpoints were checked: cytological responses in bronchoalveolar lavages, lung histology and fiber burden in the lung.

We thereby demonstrate that short-term inhalation intoxications produce significant inflammatory responses in the lungs of exposed mice and question the necessity of longer term exposure (Reeves et al., 1974).

2. Materials and methods

2.1. Mice

Twenty seven week-old Balb/c male mice (Iffa Credo, Arbresle, F-69210) were randomized and numbered by tattoo. Animals were housed in polycarbonate cages (1/cage) covered with spun-bonded polyester cage filters. Room temperature was $21 \pm 1^\circ\text{C}$, the pressure was 5 mmH₂O above the atmospheric pressure; humidity ranged from 40–60% and fluorescent light was on for 12 h/day. Animals were fed with pellet food and water ad libitum. Fifteen animals were exposed to the crocidolite aerosol whereas 5 control animals were housed in nose-only exposure tubes without crocidolite during the time of the experiment i.e. 6 h/day during 5 days. Four weeks after the end of the intoxication the experiment was terminated.

2.2. Exposure techniques

2.2.1. Crocidolite fibers and generator

The crocidolite used in this study came from a batch replacing the original UICC (Union Internationale Contre le Cancer) sample when it ran out (gift of Dr. Rendall, National Center for

Occupational Health, Johannesburg, South Africa). The fiber aerosol generator was purchased from CR Equipments (Tannay, Switzerland). It was similar in its design to the generator described by Bernstein et al. (1995), namely the fibers were packed in a cylinder and a Teflon-coated piston pushed them on a steel brush. Clean air was provided by a six bar compressor delivering an air stream with a flow rate of 100 l/min by an "inverted cyclone" device (Schreck et al., 1980). The tangential position of the air inlet pipe gave the air flow a helicoidal movement from the top to the bottom of the cell in order to ensure the aerosol homogeneity. The aerosol concentration was monitored on line by photometry using a Sigrist KTN B2/F3™ model (Ennetbürgen, Switzerland).

2.2.2. Chamber operations

Fig. 1 is a sketch of the nose only chamber including the location inside the chamber of the various sensors: the humidity and temperature sensors were located on the upper part of the chamber and the pressure sensor was in the middle of the chamber.

Briefly, the process control system included measurements of (i) the air flow taken by differential pressure sensors (Scheavitz™, PM Instrumentation, Orgeval, France) set up on Venturi tubes, (ii) the depression using Scheavitz™ differential pressure sensors, (iii) the temperature and humidity using a CH12 sensor (Lee Integer Ptd™, Agemip, Le Perreux). All output signals were transferred into a microcomputer (Umac 5000/Umac 4030™, Analog Devices, Norwood, MA, USA) which processed sensor information, calculated regulation loops and dispatched analogical tensions to the regulation valves. A second computer RS232 connected to the first was used to monitor (i) the inhalation chamber conditions (air flow and relative humidity), (ii) the aerosol concentration and the adjustments of the aerosol generator parameters. The temperature of the chamber atmosphere was maintained between 20 and 22°C and the humidity between 45–55%, the volume exchange (100 l) was 60 times/h.

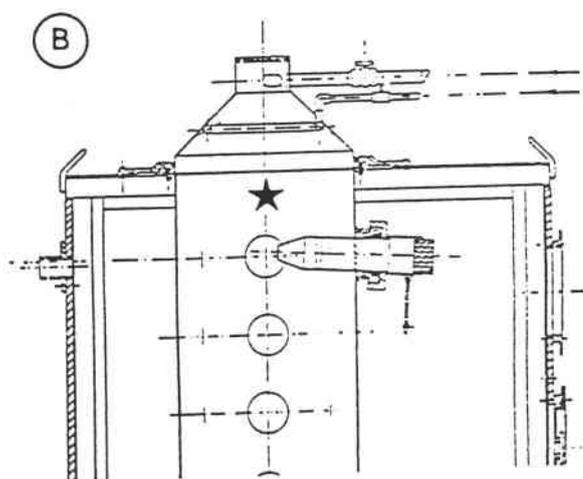
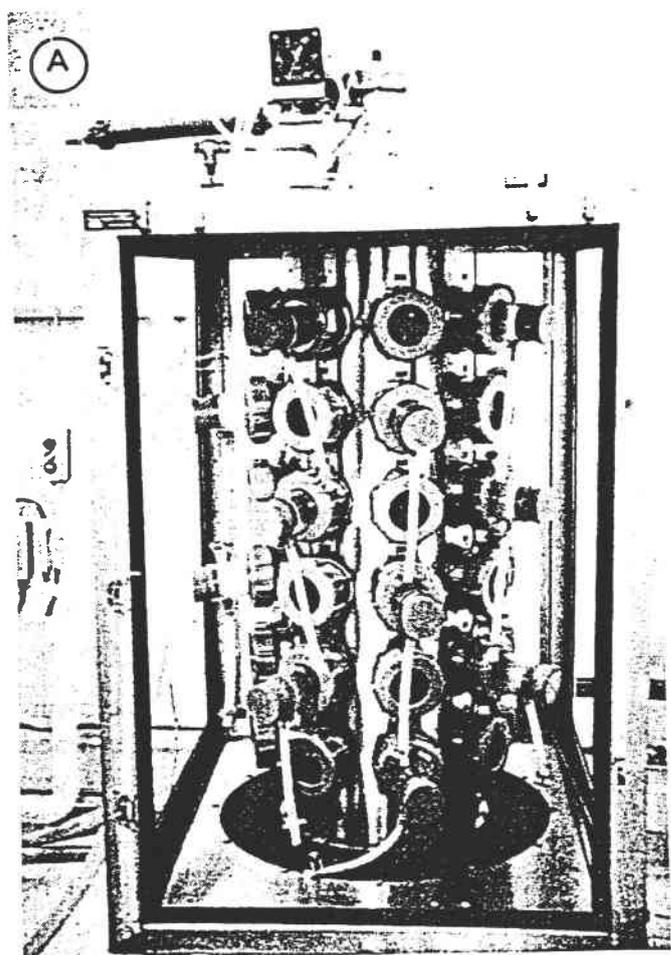


Fig. 1. Nose-only inhalation chamber. (A) General installation showing the pressure sensors and the regulation valves; (B) detail of the upper side of the inhalation chamber showing the installation used to house the mice (*, location of the sensors).

2.2.3. Animal housing in the chamber

Animals were housed in transparent exposure tubes in the inhalation chamber which consisted of a stainless concentric cylinder with 48 holes enclosed in a glove-box (Fig. 1A). Due to the design of the restraining Plexiglas™ tubes shown in Fig. 1B, the mice were continuously nose-only exposed to the crocidolite aerosol or to the ambient air in the case of control mice. Hyperthermal effects were prevented by the presence of holes in the restraining tubes. Using this flow-past design, each animal breathes fresh crocidolite aerosol of well-regulated concentration and particle size at all times and the re-inhalation of exhaled test atmosphere was minimized. The fraction of exhaled air in the chamber is less than 1/1000 considering a regular breathing of 48 mice.

To avoid contamination of ambient air by inhalation chamber pollutants, pressures inside the inhalation chamber and the glove box were maintained below the room pressure at, respectively, 5 and 2.5 mmH₂O.

2.3. Atmosphere control

The gravimetric concentration was determined using two methods. First, the concentration of airborne dust was determined by sampling on Whatman GF/C filters (Clifton, NJ, USA) for 5–6 h at a flow-rate of 2 l/min. The sampling head was an open face of a Millipore cassette. The weight of the filters before and after sampling was corrected according to the weight variations of three unexposed filters (Kauffer et al., 1989). The fibers were counted by phase contrast microscopy (Anonymous, 1991).

For the fiber concentration determination, a short sampling period (5 or 10 s) was chosen to avoid too high fiber concentrations and filter overloading. The fiber size distribution of either the aerosol or the bulk crocidolite sample was assessed by transmission electron microscopy (Jeol 100CX™, Tokyo, Japan). The fibers were sampled or deposited on a Nucleopore™ (Millipore, Molsheim, France) filter previously covered with a thin layer of carbon as described below. In order to check the absence of contaminating metals produced by the generator,

dust was also sampled on a Whatman QM-A filter and analyzed by emission spectroscopy (ICAP61E™, Thermo Jarrell Ash, Franklin, MA, USA).

2.4. Cytological, histological and ultrastructural examinations

At the end of the experiment, mice were euthanized and bronchoalveolar liquids were performed with a phosphate buffered saline solution (pH 7.4). Two washes of 500 μ l were carried out. The total number of cells was evaluated after Trypan Blue (0.04% w/v) staining and the nucleated cells were recorded in triplicate using a Thoma cell. The pulmonary alveolar macrophages (PAM), the polymorphonucleated cells (PMC) and the lymphocytes (L) were counted on a 100 μ l aliquot of the bronchoalveolar liquid which was previously spun in a centrifuge (Cytospin 2™, Shandon, Pittsburgh, PA, USA) for 5 min at 1000 \times *g* before staining according to the May Grunwald Giemsa technique (Henderson, 1984; Henderson et al., 1992). The results are the mean of three independent measures.

For histologic observations, lung specimens of control and treated animals were fixed in Bouin's solution or in 4% (v/v) aqueous formalin solution, embedded in paraffin, sectioned, stained with hematoxylin/eosin and evaluated by adapting the Wagner scale (McConnell et al., 1984; Fisher et al., 1987) with an Ortoplan™ microscope (Leitz, Wetzlar, Germany).

For scanning electron microscopy, the bronchoalveolar liquids were spun as above and the cells were fixed in an aqueous solution of 2.5% glutaraldehyde (v/v) for 1 h, rinsed in 200 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.4), then in a 2% (v/v) osmium tetroxide aqueous solution for 1 h. They were further dehydrated in graded ethanol solutions before a 10 min incubation in 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazan. They were finally coated with a thin gold layer and examined using a Jeol JSM-840A scanning microscope.

To evaluate the fiber burden in the lungs, the frozen left lobe of three control and treated animals was cleaned in acetone to take the fat off, dried to constant weight and reduced to ashes in a low temperature oven in 2 h. The ashes were

homogenized in ultrapure water and filtered over a carbon-covered Nucleopore™ membrane (25 mm diameter, 0.4 μ m pore size). The retained particles were recovered with a second layer of carbon. Under the prepared carbon coated filter, 5 electron microscopy grids were deposited, all rested onto a filtering apparatus. Ten ml of chloroform were filtered through the grids in order to dissolve the Nucleopore™ filters while the eventual fibers were retained on the grids and were observed with the transmission electron microscope (Jeol 100CX) under a magnification of 33000. This technique allowed the fiber numeration, the volume determination and with the knowledge of the density ($d = 3.35$ g/cm³) finally the mass was calculated.

2.5. Tumor necrosis factor determination

The TNF- α biological activities and the bronchoalveolar liquid protein contents, determined according to the Bradford Colorimetry Assay, were measured as previously reported (Martinet et al., 1992). The results are the means of triplicate experiments and the values are related to protein concentrations in bronchoalveolar liquid.

3. Results

The whole fiber size distribution of the bulk crocidolite sample is shown in Fig. 2. The dust mean concentration varied between 10.8 and 16.0 mg/m³ (mean: 13.6 ± 2.1 mg/m³ ($n = 8$)). The mean fiber number concentration considering the fibers with a length greater than 5 μ m and a diameter less than 3 μ m was 3594 ± 1142 fibers/ml ($n = 8$). The geometric mean lengths of the aerosol and bulk crocidolite samples were 1.73 (S.D. = 2.12) and 2.22 μ m (S.D. = 2.33) respectively. The geometric mean diameters were 0.14 (S.D. = 1.66) and 0.14 (S.D. = 1.70) for the aerosol and the bulk crocidolite sample respectively, showing that the generation process does not introduce changes in fiber distribution ($\chi^2 = 7.8$, NS). The fiber sampling was always taken at the same chamber port since during preliminary experiments changing port did not change the value obtained.

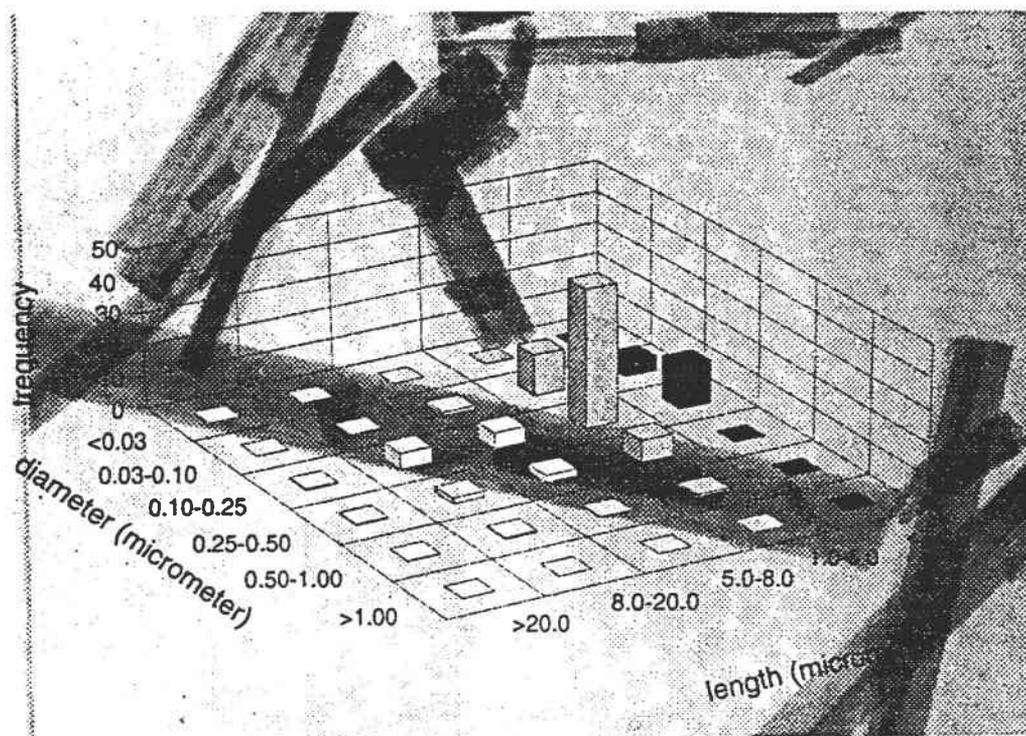


Fig. 2. Fiber size distribution of the crocidolite fiber preparation. Diameter and length are expressed in μm , frequency in percent. In the background a typical view of crocidolite fibers by transmission electron microscopy is shown. The crocidolite sample elementary analysis was carried out by atomic absorption spectroscopy: Mg (1.49), Si (22.83), Fe (30.03), Mn (0.097), Al (0.05), Cr (<0.003), Ni (<0.017), values are in % per element.

Ashing of the lung lobes demonstrated that even 1 month after the intoxication, the fiber burden varied from 361 to 1583 ng/mg corresponding to 345 000 to 1 300 000 fibers per mg of dried lung. This corresponded to a nominal total load of 15 600 000 fibers in the left lobe of the crocidolite intoxicated mouse #3 (Table 1). The calcination method used here does not introduce any modification in the fiber size distribution. This was verified by comparing the fiber size distribution of a small amount of the bulk crocidolite sample artificially introduced in the lung of a mouse with the native crocidolite (data not shown). The L/D remained constant in the intoxicated group whereas in the control group no fibers were found in the mice lobes.

At the end of the experiment we observed an increase in the total number of the viable cells recovered in the bronchoalveolar liquids: $18\,000 \pm 24\,000$ cells/ml for the treated mice vs. $3\,000 \pm 28\,000$ for the control mice (Table 2). A

Table 1
Fiber burden in crocidolite-intoxicated and control mice

		Weight	Fiber		
			Number	Mass	L/D
Treated	Animal #1	11.0	344.6	360.7	26
	Animal #2	10.3	580.2	432.2	19
	Animal #3	12.0	1296.6	1583.0	20
	Mean	11.1	740.5	792.0	22
	Stds	0.9	495.8	686.0	4
Control	Animal #4	16.7	0.0	0.0	ND
	Animal #5	9.5	0.0	0.0	ND
	Animal #6	8.4	0.0	1.0	ND
	Mean	11.5	0.0	0.3	ND
	Stds	4.5	0.0	0.6	ND

The weight of the lung is expressed in mg. The number corresponded to the number $\times 10^{-3}$ of observed fibers/mg of dried lung and the mass was given in ng/mg of dried lung. Differences in all parameters except the lung weight were statistically significant at $P < 0.01$. L/D was the ratio of fiber length/diameter.

Table 2
Cellular and TNF- α response to crocidolite fiber inhalation in bronchoalveolar liquids

	Number	Viable cells*	Pulmonary alveolar macrophages #			Polymorphonuclear cells*	Lymphocytes #	TNF- α *
			N = 1	N = 2	N > 2			
Control	N = 3	93 \pm 28	85.6 \pm 6.6	0.6 \pm 0.2	0	6.5 \pm 6.5	5.6 \pm 0.3	43.2 \pm 52.0
Treated	N = 9	118 \pm 24	103.8 \pm 13.0	4.8 \pm 1.1	0.8 \pm 0.4	7.1 \pm 14.1	20.1 \pm 8.3	36.5 \pm 23.9

At least three determinations were carried out for each bronchoalveolar liquid. PAM N = 1, PAM N = 2, PAM N > 2 were mononucleated, binucleated and polynucleated macrophages, respectively. Total viable cells, PAM, polymorphonucleated cells, lymphocytes were expressed as $\times 10^{-3}$ /ml. TNF- α in unit/mg of protein. Statistical tests: differences between means (small samples), # $P < 0.01$; * $P > 0.05$.

similar increase was also noticed for mononucleated pulmonary alveolar macrophages (PAM): 103 000 \pm 13 000 cells/ml in the intoxicated mice vs. 85 500 \pm 6600 in the controls. As for binucleated PAM (4800 \pm 1100/ml in exposed vs. 600 \pm 200 in control mice), the changes were significant in contrast with the ones observed for polymorphonucleated cells. Giant PAM (800 \pm 400/ml) corresponding to multinucleated PAM as exemplified in Fig. 3B, were detected only in the crocidolite exposed group. This latter endpoint was introduced considering that these giant cells were specific of the fiber burden in the mouse lungs. It is noteworthy that even 5 weeks after a 5-day intoxication challenge, an inflammatory response was still obvious showing macrophage distribution changes. The total lymphocyte count was higher in the treated animals than in the control: 20 100 \pm 8300 vs. 5600 \pm 300. But surprisingly we did not observe any increase in the TNF- α levels in any group of mice: 36.5 \pm 23.9 in treated bronchoalveolar fluids vs. 43.2 \pm 52.0 U/mg in control ones. As TNF- α is a multifunctional cytokine elaborated primarily by monocytes and activated macrophages (Rosenblum and Donato, 1989; Martinet et al., 1992; Warheit, 1994), one could expect a modified expression level. This in fact was not seen in our study.

Histologic examination of the lungs demonstrated the presence of macrophages in the lumen of the terminal bronchioles and alveoli. Perivascular and peribronchiolar inflammatory cells were observed in intoxicated mice. The inflam-

matory response corresponds to a Wagner scale value of 2 as it was defined for studies involving rats (namely, presence of macrophages in the lumen of terminal bronchioles and alveoli, McConnell et al., 1984). By comparison control mice had no such changes. Asbestos bodies were seen in terminal bronchioles (Fig. 3A).

Very large macrophages as shown in Fig. 3B were seen on the May Grünwald Giemsa stained samples. Five weeks after the intoxication, the long fibers seem to attract many macrophages with giant cellular polynucleated bodies limited by one membrane or limited each by their own membrane (Fig. 3B).

Ultrastructural studies have shown numerous macrophages internalizing long fibers measuring more than 20 μ m as shown in Fig. 3C.

4. Discussion

Rats are generally considered as a paradigm close to human diseases caused by fiber inhalations, since they develop lung tumors (adenocarcinomas or mesotheliomas) and pulmonary asbestosis like humans (Davis and Donalson, 1993). Using the rat paradigm, it was well-established that short fibers do not produce pulmonary disease, medium length fibers are etiologic factors for mesotheliomas while the longer fibers lead to fibrosis and lung adenocarcinomas (Stanton et al. 1981; Barrett et al., 1989).

It is difficult to extrapolate results obtained with rodents to humans. Indeed rodents have a

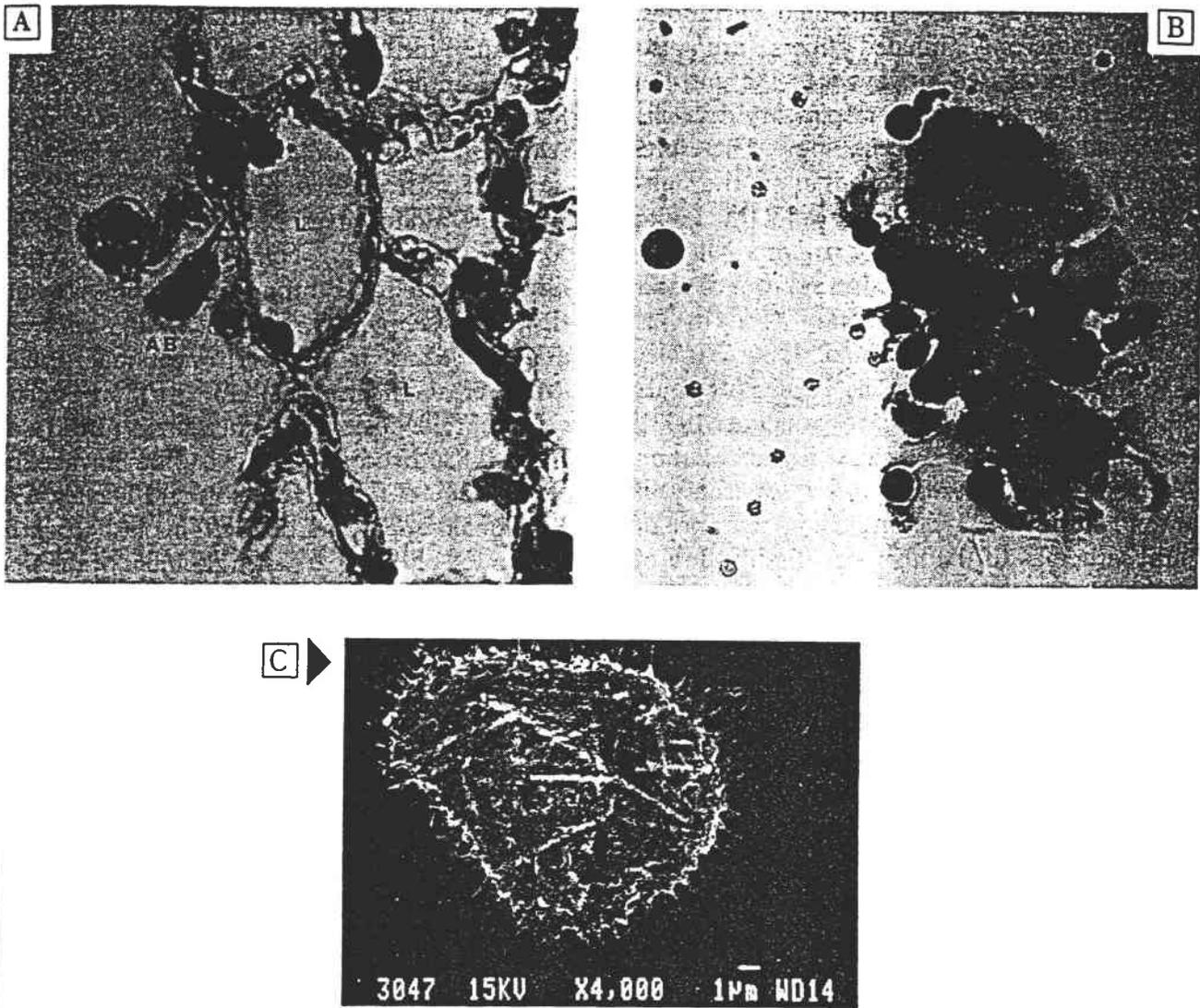


Fig. 3. Histologic and cytologic data. (A) Section of a typical intoxicated animal lung (L, alveolar lumen; AB, asbestos body; optical magnification $\times 400$). (B) Typical polynucleated macrophage (N, nucleus; F, fiber; optical magnification $\times 1000$). (C) View of an activated macrophage using scanning electron microscopy (F, fiber; bar, $1 \mu\text{m}$; electron microscope magnification $\times 6000$).

se breathing pattern which is different from that of human nose and mouth breathing. In addition, the human lung is arranged with a bipolar branching of the airways (dichotomous branching) while the rodent airways are branching asymmetrically (monopodial branching). The lung burdens in fibers found 1 month after a 5-day challenge were in the same order of magnitude ($\sim 1 \times 10^6$ fibers/mg of dried lung) as values found in 1-year intoxication studies using exposure concentrations of 500–3000 fibers/ml (Davis and Donalson, 1993). This is not

surprising if one considers the biopersistence of crocidolite fibers.

The major studies using rats were conducted in a "walk-in" chamber (McConnell et al., 1984; Le Bouffant et al., 1987; Bunn et al., 1993) in which dust with an appropriate size distribution was generated. Intratracheal instillation is also a classical route of administration but, as shown by Morgan et al. (1993) using a radioactive tracer technique, only between 36 to 85% of the initial aerosoled radioactivity is found in the lungs: the missing radioactivity was retrieved in the feces

with, however very large individual variations. Although nose-only inhaled fibers are also cleared by the ciliated airways into the gut, the fiber distribution into the respiratory tract is more equal using such technology. Therefore, intratracheal instillation does not allow the standardization of the lung burdens and this route cannot yet be recommended for risk prediction to humans (Anonymous, 1992). Intraperitoneal and intrapleural routes are frequently used in rat intoxication studies (Stanton et al., 1981; Winkler and Rüttner, 1982; Brody et al., 1989; Pott et al., 1989; Szymaniec et al., 1989; Morgan et al., 1993). These studies were useful for the characterization of the "solid-state" carcinogenesis, especially in Stanton's work (1981) relating the appearance of pleural sarcomas to the fiber size distribution of the inhaled particles.

Szymaniec et al. (1989) evinced the importance of the immunologic and the inflammatory responses in crocidolite toxicity. In this latter study, the bronchoalveolar macrophages decreased while the polymorphonucleated cells increased. Indeed 4 days after an injection of 2.5 mg of crocidolite, the macrophage percentage decreased from 93.6% (control rats) to 64.3% and the polymorphonucleated cells increased from 0.5% (control) to 33.3%. This may correspond to a primary unspecific inflammatory response contrasting with our study which demonstrates persistent inflammatory response with an increased presence of giant macrophages and lymphocytes. In this context, the TNF- α values observed are more in accordance with a chronic than with an acute inflammation.

Although many strains of mice develop pulmonary tumors spontaneously or after asbestos inhalation (Reeves et al., 1974; Davis and Donaldson, 1993) few studies have been performed with mice. In such studies assessing the fiber carcinogenic potential, results obtained were inconclusive due to genetic susceptibilities of the various mice strains. This, however, should not be the case for short-term studies with genetically modified mice like Big BlueTM (StratageneTM) or MutaTM Mouse (HazletonTM), transgenic, respectively for *Lacl* and *LacZ* genes. They should allow

the evaluations of the mutation rate of a reporter gene after, for example, fiber inhalation.

In addition the biopersistence of the crocidolite fibers is easily studied with a mouse model. Although few crocidolite intoxications have been designed with mice, it has already been shown that this model gives pertinent results in fiber toxicity evaluation. Namely, anterior studies have allowed by scanning or transmission electron microscopy, the study of (i) the internalization of fibers in the peritoneal macrophages (Winkler and Rüttner, 1982), (ii) the pattern of crocidolite deposition in mice lungs (Brody and Roe, 1983; Brody, 1993), (iii) the intracellular distribution of fibers (Johnson and Davies, 1981; McDonald and Kane, 1986). This last work had shown the cellular partial engulfment of the fibers even by the nucleus. We did not observe this phenomenon but as shown in Fig. 3B and C, we observed long fiber internalization in giant polynucleated macrophages. The different behaviors may be explained by the different origins of macrophages (pulmonary and peritoneal) and therefore may limit the relevance of the peritoneal model.

Moalli et al. (1987) have developed an intraperitoneal assay in order to study the acute injury and regeneration of diaphragmatic mesothelium in mice. This mechanistic study has shown the changes of mesothelial cells induced by long crocidolite fibers: cell deaths, loss of microvilli and appearance of bloated membranes. The regeneration of the epithelium was measured by [³H]thymidine in vivo incorporation into DNA and was seen 1–3 days after the injury to increase by up to 4-fold above the control radioactivity following a crocidolite (Moalli et al., 1987) or a chrysotile intoxication (Brody et al., 1989). In conclusion, intraperitoneal routes in mice are tests that could be used for mechanistic studies but not as models of human carcinogenicity (Anonymous, 1992).

In order to extrapolate from animal studies to human studies, it is essential to use properly conducted particulate inhalations in rodents. In the past they were done in "walk-in" chambers (Lynch et al., 1957; Reeves et al., 1974; Brody and

Roe, 1983) using relatively high dust concentrations: 20.2 ± 3.6 mg/m³ of crocidolite fibers (Reeves et al., 1974) or ~ 1070 glass fibers/cm³ (Morriset et al., 1979). However, using this administration route, there is a huge fiber accumulation onto the fur of the animals which is licked by the animals. This generates fiber contamination of the gut and also fiber release in the intoxication chambers: these phenomena are minimized using the nose-only administration route described here. At least, nose-only exposure allows precise control of the exposure level and cost entry (Bunn et al., 1993; Bernstein et al., 1995). The generation system and the flow past nose-only exposure described here is very similar in its design to the one described by Bernstein et al. (1995) so that mice breathe only fresh fiber aerosol while exhaled air is exhausted. Such chambers are now commercially available.

In this work, we have validated a nose-only inhalation chamber, studying the biological effects of a crocidolite aerosol on mice: to our knowledge, if mice were used in commercially available nose-only inhalation chambers, such studies were rarely reported in the scientific literature and could be extended to transgenic mice carrying a reporter gene in order to evaluate if natural or man-made fibers induce mutations on lung DNA. Moreover this work has shown that relatively mild 5 days intoxication gives a chronic inflammatory response and a high fiber burden in the mouse lungs 1 month later.

Acknowledgements

The authors are indebted to D. Zissu and L. Pelsaut for histological processing and analysis, to A. Peltier for the atomic spectroscopy data and to Professor A. Le Faou for valuable discussion and critical review of the manuscript.

References

- Anonymous. (1991) Association Francaise de Normalisation: AFNOR. Détermination de la concentration en nombre de fibres par microscopie optique en contraste de phase. Méthode du filtre à membrane X43–269.
- Anonymous. (1992) Executive summary of a World Health Organization Consultation. Validity of methods for assessing the carcinogenicity of man-made fibers. May 1992, Copenhagen, pp. 19–20.
- Barrett, J.C., Lamb, P.W. and Wiseman, R.W. (1989) Multiple mechanisms for the carcinogenic effects of asbestos and other mineral fibers. *Environ. Health Perspect.* 81, 81–89.
- Bernstein, D.M., Thevenaz, P., Fleissner, H., Anderson, R., Hersterberg, T.W. and Mast, R. (1995) Evaluation of the oncogenic potential of man-made vitreous fibres: the inhalation model. *Ann. Occup. Hyg.* 39, 661–672.
- Brody, A.R. (1993) Asbestos-induced lung disease. *Environ. Health Perspect.* 100, 21–30.
- Brody, A.R., McGavran, P.D. and Overby L.H. (1989) Brief inhalation of chrysotile asbestos induces rapid proliferation of bronchiolar-alveolar epithelial and interstitial cells. In: J. Bignon, J. Peto and R. Saracci (Eds), *Non-occupational Exposure to Mineral Fibers*. IARC Scientific Publications, 90, Lyon, pp. 93–99.
- Brody, A.R. and Roe, M.W. (1983) Deposition pattern of inorganic particles at the alveolar level in the lungs of rat and mice. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128, 724–729.
- Bunn, W.B., Bender, J.R., Hesterberg, T.W., Chase, G.R. and Konzen, J.L. (1993) Recent studies of man-made vitreous fibers. *J. Occup. Med.* 35, 101–113.
- Davis, J.M.G. and Donalson, K. (1993) Respirable industrial fibers: pathology in animal models. *Ann. Occup. Hyg.* 37, 227–236.
- Fisher, G.L. and Placke, M.E. (1987) In vitro models of lung toxicity. *Toxicology* 47, 71–93.
- Johnson, N.F. and Davies, R. (1981) An ultrastructural study of the effects of asbestos fibers on cultured peritoneal macrophages. *Br. J. Exp. Pathol.* 62, 559–570.
- Henderson, R.F. (1984) Use of bronchoalveolar lavage to detect lung damage. *Environ. Health Perspect.* 56, 115–129.
- Henderson, R.F., Barr, E.B., Cheng, Y.S., Griffith, W.C. and Hahn, F.F. (1992) The effect of exposure pattern on the accumulation of particles and the response of the lung to inhaled particles. *Fundam. Appl. Toxicol.* 19, 367–374.
- Kauffer, E., Vigneron, J.C., Fabries, J.F. (1989) Mesure de la concentration pondérale de polluants particulaires atmosphériques en hygiène professionnelle: Etude de quelques média filtrants. *Analysis* 17, 389–393.
- Le Bouffant, L., Daniel, H., Henin, J.P., Martin, J.C., Normand, C., Tichoux, G. and Trolard, F. (1987) Experimental study on long-term effects of inhaled MMMF on the lungs of rats. *Ann. Occup. Hyg.* 31, 765–790.
- Lynch, K.M., McIver, F.A. and Cain, J.R. (1957) Pulmonary tumors in mice exposed to asbestos dust. *Am. Med. Assoc. Arch. Ind. Health* 15, 207–214.
- McConnell, E.E., Wagner, J.C., Skidmore, J.W. and Moore, J.A. (1984) A comparative study of the fibrogenic and carcinogenic effect of UICC Canadian chrysotile B asbestos and glass microfiber (JM 100) in biological effects of man-made mineral fiber. In: *Proceedings of the WHO/IARC conference Volume II*. WHO, Copenhagen, pp. 209–233.

- McDonald, J.L. and Kane, A.B. (1986) Identification of asbestos fibers within single cells. *Lab Invest.* 55, 177-185.
- Martinet, N., Charles, T., Vaillant, P., Vignaud, J.M., Lambert, J. and Martinet, Y. (1992) Characterization of a tumor necrosis factor- α inhibitor activity in cancer patients. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6, 510-515.
- Moalli, P.A., MacDonald, J.L., Goodglick, L.A. and Kane, A.B. (1987) Acute injury and regeneration of the mesothelium in response to asbestos fibers. *Am. J. Pathol.* 128, 426-445.
- Morgan, A., Collier, C.G., Morris, K.J. and Launder, K.A. (1993) A radioactive tracer technique to determine in vivo the number of fibers in the lungs of rats following their administration by intratracheal instillation. *Environ. Res.* 63, 182-190.
- Morriset, Y., Pan, A. and Jegier, Z. (1979) Effect of styrene and fiber glass on small airways of mice. *J. Toxicol. Environ. Health* 5, 943-956.
- Pauluhn, J. (1994) Validation of an improved nose-only exposure system for rodents. *J. Appl. Toxicol.* 14, 55-62.
- Pott, F., Roller, M., Zieh, U., Reiffer, F.J., Bellmann, B., Rosenbruch, M. and Huth, F. (1989) Carcinogenicity studies on natural and man-made fibres with the intraperitoneal test in rats. In: J. Bignon, J. Peto and R. Saracci (Eds), *Non-occupational Exposure to Mineral Fibres*. IARC Scientific Publications, 90, Lyon, pp. 173-179.
- Reeves, A.L., Puro, H.E. and Smith, R.G. (1974) Inhalation carcinogenesis from various forms of asbestos. *Environ. Res.* 8, 178-202.
- Rosenblum, M.G. and Donato, N.J. (1989) Tumor necrosis factor α : a multifaceted peptide hormone. *Crit. Rev. Immunol.* 9, 21-44.
- Schreck, R.M., Chan, T.L. and Soderholm, S.C. (1980) Design operation and characterization of large volume exposure chambers. In: B.K.J. Leong (Ed), *Inhalation Toxicology and Technology*, Ann Harbor Science, Kalamazoo, pp. 29-51.
- Stanton, M.F., Layard, M., Tegeris, A., Miller, E., May, M., Morgan, E. and Smith, A. (1981) Relation of particle dimension to carcinogenicity in amphibole asbestoses and other fibrous minerals. *J. Natl. Cancer Inst.* 67, 965-975.
- Szymaniec, S., Brown, D.M., Chladzyska, M., Jankowska, E., Polikowska, H. and Donaldson, K. (1989) Antibody producing cells in the spleens of mice treated with pathogenic mineral dust. *Br. J. Ind. Med.* 46, 724-728.
- Walker, C., Everitt, J. and Barrett, J.C. (1992) Possible cellular and molecular mechanisms for asbestos carcinogenicity. *Am. J. Ind. Med.* 21, 253-273.
- Warheit, D.B. (1994) A review of some biophysical factors and their potential roles in the development of fiber toxicity. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 20, S113-S120.
- Winkler, G.C. and Rüttner, J.R. (1982) Penetration of asbestos fibers in the visceral peritoneum of mice. A scanning electron microscopic study. *Exp. Cell Biol.* 50, 187-194.

BIBLIOGRAPHIE

A

ADAMI H. O., ADAMS G., BOYLE P., EWERTZ M., LEE N. C., LUND E., MILLER A. B., OLSSON H., STEEL M., TRICHOPOULOS D., TULINIUS H. Breast cancer etiology. *Int. J. Cancer* 1990 , sup 5, 22-39.

ADAMS J. M., CORY S. Transgenic models of tumor development. *Science* 1991, 254: 1161-1166.

AGOFF S. N., HOU J., LINZER D. I. H., WU B. Regulation of the human hsp 70 promoter by p53. *Science* 1993, 259: 84-87.

ALEXANDER W. S., BERNARD O., CORY S., ADAMS J. M. Lymphomagenesis in E μ -*myc* transgenic mice can involve *ras* mutations. *Oncogene* 1989, 4: 575-581.

ANDERSON D. E., BADZIOCH M. D. Risk of familial breast cancer. *Cancer* 1985, 56: 383-387.

ANDRES A. C., VAN DER VALKM.A., SCHONENBERGER C. A., FLUCKIGER F., LEMEUR M., GERLINGER P., GRONER B. Ha-*ras* and *c-myc* oncogene expression interferes with morphological and functional differentiation of mammary epithelial cells in single and double transgenic mice. *Genes Develop.* 1988, 2: 1486-1495.

ARANY I., RADY P., TYRING S. K. Differential expression *mdm2/p53* genes is related to HPV types *in vivo*. In *International Papillomavirus Conference 12, 1993*. Baltimore, *Livre des communications* p.324.

AZZOPARDI J. Types histologiques des tumeurs du sein. Genève, OMS, 1981.

B

BAAS I. O., MULDER J-W. R., OFFERHAUS J. A., VOGELSTEIN B., HAMILTON S. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant *p53* gene product in archival colorectal neoplasms. *J. Pathol.* 1994, 172: 5-12.

BAILLEUL B., SURANI M. A., WHITE S., BARTON S. C., BROWN K., BLESSING M., JORCANO J., BALMAIN A. Skin hyperkeratosis and papilloma formation in transgenic mice expressing a *ras* oncogene from a suprabasal keratin promoter. *Cell* 1990, 62: 697-708.

BARBACID M. *Ras* Oncogenes. *Ann. Rev. Biochem.* 1987, 56 : 779-827.

BATTIFORA H. p53 immunohistochemistry : a word of caution. *Human Pathol* 1994, 25: 435-437.

BERGER M. S., LOCHER G. W., SAURER S., GULLICK W. J., WATERFIELD M. D., GRONER B., HYNES N. E. Correlation of *c-erbB-2* gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res.* 1988, 48: 1238-1243.

BESSE G., KWIATKOWSKI F., GAILLARD G., DAVER A., DALIFARD I., BASUYAU J. P., BRUNELLE P., WAFFLART J., ANGIBEAU R. M., AUVRAY E., GOUSSARD J. Rôle pronostique de la protéine p53 dans 1065 cas de cancer du sein. Etude multicentrique. *Bull. Cancer* 1994, 81: 289-296.

BHATHIA K. G., GUTIÉRREZ M. I., HUPPI K., SIWARSKI D., MAGRATH I. T. The pattern of p53 mutations in burkitt's lymphoma differs from that of solid tumors. *Cancer Res.* 1992, 52: 4273-4276.

BLONDAL J. A., BENCHIMOL S. The role of p53 in tumor progression. *Semin. Cancer Biol.* 1994, 5: 177-186.

BLOOM H. J. G., RICHARDSON W. W. Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed 15 years. *Br. J. Cancer* 1957, 11: 359-377.

BLOT W. J., DEVESA S. S et FRAUMENI J. F. Declining breast cancer mortality among young american women. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1987, 78: 451-454.

BOLLAG G., McCORMICK. Regulators and effectors of *ras* proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1991, 7: 601-632.

BORG A., TANDON A. K., SIGURDSSON H., CLARK G. M., FERNÖ M., FUQUA A. W., KILLANDER D., McGUIRE W. L. *HER-2/neu* amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res.* 1990, 50: 4332-4337.

BORRESEN A. L., OTTESTAD L., GAUSTAD A., ANDERSEN T. I. HEIKKILÄ, JAHNSEN T., TVEIT K. M., NESLAND J. M., Amplification and protein over-expression of the *neu/HER/c-erbB-2* protooncogene in human breast carcinomas : relationship to loss of gene sequences on chromosome 17, family history and prognosis. *Br. J. Cancer* 1990; 62: 585-590.

BOUCHARD L., LAMARRE L., TREMBLAY P. J., JOLICOEUR P. Stochastic appearance of mammary tumours in transgenic mice carrying the MMTV/*c-neu* oncogene. *Cell* 1989, 57: 931-936.

BRUNET A., PAGÈS G., POUYSSÉGUR J. Un nouvel oncogène de la voie *ras*, la MAP kinase kinase. *Bull. Cancer* 1995, 82: 421-422.

BURGERING B. M. T., BOS J. L. Regulation of Ras-mediated signalling : more than one way to skin a cat. *Trends Biol. Sc.* 1995, 20: 18-22.

C

CAMPER S. A. Research applications of transgenic mice. *Biotechniques* 1987, 5: 638-649.

CARDIFF R. D., SINN E., MULLER W., LEDER P. Transgenic oncogene mice. Tumor phenotype predicts genotype. *Am. J. Pathol.* 1991, 139: 495-501.

CARON DE FROMENTEL C., SOUSSI T. TP53 suppressor gene : a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chrom. Cancer* 1992, 4: 1-15.

CARSON D. A., LOIS A., Cancer progression and p53. *Lancet* 1995, 346 : 1009-1011.

CAVAILLES V., GARCIA M., ROCHEFORT H. Regulation of cathepsin-D and pS2 gene expression by growth factors in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 1989, 3: 552-558.

CHANG K., DING I., KERN F. G., WILLINGHAM M. C. Immunohistochemical analysis of p53 and HER-2/neu proteins in human tumors. *J. Histochem. Cytochem.* 1991, 39 : 1281-1287.

CHARDIN P. Small GTP-binding proteins of the *ras* family : a conserved functional mechanism? *Cancer Cells* 1991, 3: 117-126.

CHARDIN P. Protéines Ras et transmission des signaux mitogènes. *Medecine/Sciences* 1994, 10: 657-664.

CHO H. S., KATZENELLEN B. S. Differential regulation of gene expression by estrogen in estrogen growth-independent and -dependent MCF-7 human breast cancer cells sublines. *Mol. Endocrinol.* 1991, 5: 1323-1320.

CHRISTOPOULOS T. K. DIAMANDIS E. P. et WILSON G. Quantification of nucleic acid on nitrocellulose membranes with time-resolved fluorometry. *Nucleic Acids Res.* 1991, 19: 6015-6019.

COLBURN N. H. Genes and signal transduction in multistage carcinogenesis. M. DEKKER INC., NEW YORK, 1989, iii.

COMPERE S. J., BALDACCI P. JAENISH R. Oncogenes in transgenic mice. *Bioch. Biophys. Acta* 1989, 948: 129-149.

CONTESSO G., MATHIEU M. C., GUINEBRETIERE J. M., ZENOURA L., BERTIN F., PETIT J. Y., LÊ M. Problèmes anatomopathologiques des mastopathies à risques. *Arch. Anat. Cytol. Path.* 1994, 42 : 211-216.

CORBETT I. P., HENRY J. A., ANGUS B., WATCHORN C. J., WILKINSON L., HENNESSY C., GULLICK W. J., TUZI N. L., MAY F. E. B., WESTLEY B. R., HORNE C. H. W. NCL-CB11, a new monoclonal antibody recognizing the internal domain of the *c-erbB-2* oncogene protein effective for use on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J. Pathol.* 1990, 161: 15-25.

COUSSENS L., YANG-FENG T. L., LIAO Y-C. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with *neu* oncogene. *Science* 1985, 230: 1132.

D

DATI C., MURACA R., TAZARTES O., ANTONIOTTI S., PERROTEAU I., GIAI M., CORTESE P., SISMONDI P., SAGLIO G., DE BORTOLI M. *c-erbB-2* and *ras* expression levels in breast cancer are correlated and show a co-operative association with unfavorable clinical outcome. *Int. J. Cancer* 1991, 47: 833-838.

DAWKINS, H.J.S., ROBBINS, P.D., SARNA, M., CARRELO, S., HARVEY, J. M. and STERRETT, G.F., (a), c-erbB-2 amplification and overexpression in breast cancer : Evaluation and comparison of Southern blot, slot dot, ELISA and immunohistochemistry. *Pathology* 1993, 25: 124-132.

DILLER L., KASSEL J., NELSON C. E., GRYKA M. A., LITWAK G., GEBHARDT M., BRESSAC B., OZTURK M., BAKER S. J., VOGELSTEIN B. p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol. Cell. Biol.* 1990, 10: 5772-5781.

DONEHOWER L. A., HARVEY M., SLAGLE B. L., McARTHUR M. J., MONTGOMERY C. A., BUTEL J. S., BRADLEY A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible for spontaneous tumors. *Nature* 1992, 356: 215-221.

E

EDORH A. Action de la N-nitroso-N-méthylurée sur des souris transgéniques exprimant le gène v-Ha-ras. Mémoire de diplôme d'études approfondies de Toxicologie de l'Environnement (Metz), 1991a.

EDORH A., PARACHE R. M., N'SOSSANI B., BOTTIN M. C., MERLIN J. L., COLOSETTI P., GUILLEMIN F., LE FAOU A., RIHN B. Determination of amplification level of the c-erbB-2 proto-oncogene in human breast carcinomas : A comparative study between non-radioactive and radioactive labelling. *Cell. Mol. Biol.* 1995b, 41 (7): 967-973.

EDORH A., PARACHE R. M., MIGEON C., N'SOSSANI B., RIHN B. Expression de l'oncoprotéine c-erbB-2 dans la maladie de Paget mammaire : Etude immunohistochimique à l'aide de trois anticorps. *Pathol. Biol.* 1995c, 43 (7): 584-589.

EL-DEIRY W.S., KERN S.E., PIETENPOL J.A., KINZLER W.E., VOGELSTEIN B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genet.* 1992, 1: 45-49.

EL-DEIRY W. S., TOKINO T., VELCULESCU V. E., LEVY D. B., PARSONS R., TRENT J. M., LIN D., MERCER W. E., KINZLER K. W., VOGELSTEIN B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993, 75: 817-825.

ELLIS C., MORAN M., McCORMICK F., PAWSON T. Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature* 1990, 343: 377-381.

ELLMAN R. in Epidemiology of breast cancer, growth factors and oncogenes in breast cancer : Editor : Shyser M. (WCH, England, 1987), 152-175.

F

FOEKENS J. A., van PUTTEN W. L. J., PORTENGEN H., DE KONING H. Y., THIRION B., ALEXIEVA-FIGUSEH J., KLIJN J. G. Pronostic value of pS2 and cathepsin D in 710 human primary breast tumors : multivariate analysis. *J. Clin. Oncol.* 1993, 11: 899-908.

FOEKENS J. A., RIO M. C., SEGUIN P., VAN PUTTEN W. L. J., FAUQUE J., NAP M., KLIJN J. G. M., CHAMBON P. Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status. *Cancer Res.* 1990, 50: 3832-3837.

FORT P., VINCENT S. Transduction du signal mitogène, cytosquelette et petites protéines G : vers un réseau de protéines GAP? *Médecine/Sciences* 1993, 9: 59-65.

FREBOURG T., BARBIER N., YAN Y. X. Germ-lines p53 mutations in 15 familles with Li-Fraumeni syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 1995; 56: 608-615.

G

GASPARINI G., GULLICK W. J., BEVILACQUA P., SAINSBURY J. R. C., MELI S., BORACCHI P., TESTOLIN A., LA MALFA G., POZZA F. - Human breast cancer : Prognostic significance of the *c-erbB-2* oncoprotein compared with epidermal growth factor receptor, DNA ploidy and conventional pathologic features. *J. Clin. Oncol.* 1992, 10, 686-695.

GION M., MIONE R., PAPPAGALO G. L., GATTI C., NASCIMBEN O., BARI M., LEON A. E., VINANTE O., BRUSCAGNI G. pS2 in breast cancer- alternative or complementary tool to steroid receptor status? Evaluation of 446 cases. *Br. J. Cancer* 1993, 68: 374-379.

GOLDSWORTHY T. L., RECIO L., BROWN K., DONEHOWER L. A., MIRSAJIS J. C., TENNANT R. W., I. F. PURCHASE. Transgenic Animals in Toxicology (Symposium overview). *Fund. Appl. Toxicol.* 1994, 22: 8-19.

GOSEN J., VIJG J. Transgenic mice as a model system for studying gene mutations *in vivo*. *Trends Genet.* 1993, 9: 27-31.

GOSEN J. A., DELEEUW W. F. J., TAN C. H. T., ZWARTHOFF E. C., BERENDS F., LOHMAN P. H. M., KNOOK D. C., VIJG J. Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice : A model for studying mutations *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1989, 86: 7971-7975.

GOUD B. Le transport vésiculaire des cellules eucaryotes est contrôlé par des GTPases. *Medecine/Sciences* 1992, 8: 326-334.

GREEN S., WALTER P., KUMAR V., KRUST A., BORNERT J. M., ARGOS P., CHAMBON P. Human estrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to *v-erbA*. *Nature* 1986, 320: 134-139.

GULBIS B., GALAND P. Immunodetection of the p21-ras products in human normal and preneoplastic tissues and solid tumors. *Hum. Pathol.* 1993, 24: 1271-1285.

GULLICK W. J., LOVE S. B., WRIGHT C., BARNES D. M., GUSTERSON B., HARRIS A. L., ALTMAN D. G. *c-erbB-2* protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *Br. J. Cancer* 1990, 63: 434-438.

GUTMAN A., WAZYLYK B. Nuclear targets for transcription regulation by oncogenes. *Trends Genet.* 1991, 7: 49-54.

GUTMAN M., RAVIA Y., ASSAF D., YAMAMOTO T., ROZIN R., SHILOH, Y. Amplification of *c-myc* and *c-erbB-2* protooncogenes in human solid tumors : Frequency and clinical significance. *Int. J. Cancer* 1989; 44: 802-805.

H

HALL P. The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* 1990, 249: 635-640.

HALL J. M., LEE M.K., NEWMAN B., MORROW J. E., ANDERSON L. A., HUEY B., KING M-C. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990, 250: 1684-1689.

HALL P. A. et LANE D. P. p53 in tumor pathology : can we trust immunochemistry? - Revisited. *J. Pathol.* 1994, 172: 1-4.

HAREL J., LEIBOVITCH S.A. Oncogènes et facteurs de transcription. Quelques avancées récentes. *Bull. Cancer* 1993, 80: 11-16.

HARPER J.W., ADAMI G.R., WEI N., KEYOMARSI, K., ELLEDGE S.J. The p21 CDK-interacting protein cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependant kinases. *Cell* 1993, 75: 805-816.

HARVEY M., McARTHUR M. J., MONTGOMERY C. A., BRADLEY A., DONEHOWER L. A. Genetic background alters the spectrum of tumors that develop in p53-deficient mice. *FASEB J.* 1993, 7: 938-943.

HENRY, J.A., PIGGOT, N.H., MALLICK, U.K., NICHOLSON, S., FARNDON, J. R., WESTLEY, B.R., MAY F. E. B. pNR-2/pS2 immunohistochemical staining in breast cancer : correlation with prognostic factors and endocrine response. *Br. J. Cancer* 1991, 63: 615-622.

HERRLICH, P., PONTA, H. Nuclear oncogenes convert extracellular stimuli into changes in the genetic program. *Trends Genet.* 1989, 5: 112-116.

HINDS W. P., FINLAY C. A., LEVINE A. J. Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the *ras* oncogene and transformation. *Virology* 1989, 63: 739-746.

HINDS W. P., FINLAY C. A., LEVINE A. J. Immunological evidence for the association of p53 with a heat shock protein, hsc 70, in p53-plus-*ras* transformed cell lines. *Mol. Cell. Biol.* 1987, 7: 2863-2869.

HOGAN B., CONSTANTINI F., LACY E. Manipulating the mouse embryo; laboratory manual. Cold Sping Harbor Laboratory, 1986.

HOLLSTEIN M., SIDRANSKY D., VOGELSTEIN B., HARRIS C. C. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991, 253: 49-53.

HOORN A. J. W., CUSTER L. L., MYHR B. C., BRUSICK D., GOSSEN J., VIJG J. Detection of chemical mutagens using MutaTM mouse : a transgenic mouse model. *Mutagenesis* 1993, 8 : 7-10.

HSUANG J. J., TOTTY N., WATERFIELD M. D. Identification of a novel autophosphorylation site (P4) on the epidermal growth factor receptor. *Biochem. J.* 1989, 262: 649-653.

HUNTER T. Cooperation between oncogenes. *Cell* 1991, 64: 249-270.

HUPP T. R., MEEK D. W., MIDGLEY C. A., LANE D. P. Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* 1992, 71: 875-886.

HURSTING S. D., PERKINS S. N., HAINES D. C., WARD J. M., PHANG J. M. Chemoprevention of spontaneous tumorigenesis in p53-knockout mice. *Cancer Res.* 1995, 55: 3949-3953.

J

JACKS T., REMINGTON L., BO W., WILLIAMS B. O., SCHMITT E. M., HALACHMI S., BRONSON R. T., WEINBERG R. A. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Current Biology* 1994, 4: 1-7.

JAENISCH R. Transgenic animals. *Science* 1988, 240: 1468-1474.

JELTSCH J.M., ROBERTS M., SCHATZ C., GARNIER J. M., BROWN A. M., CHAMBON P. Structure of the human estrogen-responsive gene pS2. *Nucl. Acids Res.* 1987, 15: 1401-1414.

JENKINS N. A., COPELAND N. G. Transgenic mice in cancer research, *In: Important Advances in Oncology.* DEVITA V. T. J. R., HELLMAN S., ROSENBERG S. A. EDS., J. B. Lippincott company, Philadelphia, 1989, p. 61-77.

K

KALLIONIEMI O-P, KALLIONIEMI A., KURISU W., THOR A., CHEN L-C, SMITH H. S., WALDMAN F. M., PINKEL D., GRAY J. W. erbB-2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence *in situ* hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1992, 89: 5321-5325.

KAPLAN D. R., MORRISON D. K., WONG G., McCORMICK F., WILLIAMS L. T. PDGF b-receptor stimulate tyrosine phosphorylation of GAP and association of GAP with a signaling complex. *Cell* 1990, 61: 125-133.

KASTAN M. B., QZHAN W. S., EL-DERRY F., CARRIER F., JACKS T., WALSH W. V., PLUNKETT B. S., VOGELSTEIN B., FORNACE A. J. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 1992, 13: 587-597.

KHAN A. La protéine p53, une sonde pour explorer la nature des facteurs oncogéniques dans l'environnement. *Medecine/Science* 1992, 8: 289-290.

KHAN A., BRIAND P. L'apoptose : une mort programmée ou une prolifération avortée. *Medecine/Science* 1993, 9: 663-665.

KEITH G., COULAIS C., EDORH A., BOTTIN M. C., RIHN B. Ethylene glycol monobutyl ether has neither epigenetic nor genotoxic effects in acute treated rats and in subchronic treated v-Ha-ras transgenic mice. *Occup. Hyg.* 1996, 2: 237-249.

KIDA N., YOSHIMURA T., MORI K., HAYASHI K. Hormonal regulation of synthesis and secretion of pS2 protein relevant to growth of human breast cancer cells (MCF-7). *Cancer Res.* 1989, 49: 3494-3498.

KINOSHITA T., IMAMURA J., NAGAI H. and SHIMOTOHNO K. Quantification of gene expression over a wide range by the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 1992, 206: 231-235.

KNUDSON A. G. Mutation and cancer : Statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1971, 68: 820-823.

KOERNER F. C., GOLDBERG D. E., EDGERTON S. M., SCHWARTZ H. pS2 protein and steroid hormone receptors in invasive breast carcinomas. *Int. J. Cancer* 1992, 52: 183-188.

KOHLER S. W., PROVOST G. S., FIECK A., KRETZ P. L., BULLOCK W. O., PUTMAN D. L., SORGE J. A., SHORT J. M. Analysis of spontaneous and induced mutations in transgenic mice using a lambda ZAP/lacl shuttle vector. *Environ. Mol. Mutagen.* 1991, 18: 316-321.

KUMAR V., GREEN S., BERRY M., CHAMBON P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 1987, 24: 941-951.

KUSKA B. *BRCA-1* discovery aftermath: No rush for genetic testing. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995, 87: 1578-1579.

KYPRIANOU N., ENGLISH H. F., DAVIDSON N.E., ISAACS J. T. Programmed cell death during regression of the MCF-7 human breast cancer following estrogen ablation. *Cancer Res.* 1991, 51: 162-166.

L

LAND H., PARADA L. F., WEINBERG R. A. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 1983, 304: 596-602.

LANE D.P. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992, 358: 15-16.

LANE D.P. p53 and human cancers. *Br. Med. Bull.* 1994, 50: 582-589;

LAYDE P. M., WEBSTER L. A., BAUGHAM A. L., WINGO P. A., RUBIN G. L., ORY H. W. The independent associations of parity, age at first full-term pregnancy, and duration of breast-feeding with the risk of breast cancer. *J. Clin. Epidemiol.* 1989, 42: 963-973

LEE W., MITCHELL P. TJIAN R. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 1987, 49: 741-752.

LEVINE A. J., MOMAND J., FINLAY C. A. The *TP53* tumor-suppressor gene. *Nature* 1991, 351: 453-456.

LEVINE A.J. The *p53* tumor-suppressor gene. *N. Engl. J. Med.* 1992, 326: 1350-1351.

LEVINE A. J. The tumor suppressor genes. *Annu. Rev. Biochem.* 1993, 62: 623-651.

LI R., NAGA S., HANNON G. J., BEACH D., STILLMAN B. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependant DNA replication and repair. *Nature* 1994, 371: 534-537.

LIPPMAN M. E., DICKSON R. B. Mechanisms of growth control in normal and malignant breast epithelium. *Recent Prog. Horm. Res.* 1989, 45: 383-440.

LIU E. THOR A., HE M., BARCOS M., LJUNG B-M, BENZ C. The *HER2 (c-erbB-2)* oncogene is frequently amplified in *in situ* carcinomas of the breast. *Oncogene* 1992, 7: 1027.

LOHMAN D., RUHRI C., SCHMITT M., GRAEFF H., HÖFLER H. Accumulation of p53 protein as an indicator for p53 gene mutation in breast cancer. Occurrence of false-positives and false-negatives. *Diag. Mol. Pathol.* 1993, 2: 36-41.

LOWY D. R., WILLUMSEN B. M. Function and regulation of ras. *Ann. Rev. Biochem.* 1993, 62: 851-891.

LUNDY J., GRIMSON R., MISHRIKI Y., CHAO S., ORAVEZ S., FROMOWITZ F., VIOLA M. V., Elevated *ras* oncogene expression correlates with lymph node metastases in breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 1986, 4: 1321-1325.

M

MACMAHON B., TRICHOPOULOS D., BROWN J., ANDERSEN A.P., AOKI K., COLE P., DE WAARD F., KAURANIEMI T., MORGAN R.W., PURDUE M., RAVNIHAR B., STROMBY N., WESTLUND K., CHOO N.G. Age at menarche, probability of ovulation and breast cancer risk. *Int. J. Cancer* 1982, 29: 13-16.

MACMAHON B., COLE P. The ovarian etiology of human breast cancer. Recent results. *Cancer Res.* 1972, 39: 185-192.

MACTIERNAN A., THOMAS D. B. Evidence for a protective effect of lactation on risk of breast cancer in young woman: results from a case-control study. *Amer. J. Epidemiol.* 1986, 124: 353-358.

MALKIN D., LI F. P., STRONG L. C., FRAUMENI J. F., NELSON C. E., KIM D. H., KASSEL J., GRYKA M. A., BISCHOFF F. Z., TAINSKY M. A., FRIEND S. H. Germ-line mutations in familial syndrome of breast cancers, sarcomas and others neoplasms. *Science* 1990, 250: 1233-1238.

MARSHAL G. J. Tumor suppressor genes. *Cell* 1991, 64: 313-326.

MARTIN A. Le gène supprimeur de tumeur *p53*. *Ann. Pathol.*, 1995, 15 (3): 184-191.

McGUIRE W. L. Human breast cancer : correlation of relapse and survival with amplification of of the *HER-2/neu* oncogene. *Science* 1987, 235: 177.

MILNER J. A conformation hypothesis for the suppressor and promoter functions of p53 in cell growth control and in cancer. *Proc. Royal Soc. Lond. B.* 1991, 245: 139-145.

MILNER J. O. Flexibility : The key to *p53* function. 1995, *Trends Biol. Sciences* 20: 49-51.

MIRSALIS J. C., PROVOST G. S., MATTEWS C. D., HAMNER R. T., SCHINDLER J. E., O'LOUGHLIN K. G., MACGREGOR J. T., SHORT J. M. Induction of hepatic mutations in *lac I* transgenic mice. *Mutagenesis* 1993 (a), 8: 265-271.

MIRSALIS J. C., HAMER J. D., O'LOUGHLIN K. G., WINEGAR R. A., SHORT J. M. Effects of non genotoxic carcinogens on hepatic mutations in *lac I* transgenic mice. *Environ. Mol. Mutagen.* 1993 (b), 21: 48.

MIYASHITA T., KRAJEWSKI S., KRAJEWSKA M., WANG H. G., LINK H. K., LIEBERMAN D. A., HOFFMAN B., REED J. C. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* 1994a, 9: 1799-1805.

MIYASHITA T., HARIGAIM., HANADA M., REED C. Identification of a p53-dependant négative response element in the *bcl-2* gene. *Cancer Res.* 1994b, 54: 3131-3135.

MODAN B., ALFANDARY E., CHERTRIT A., KATZ L. Increased risk of breast cancer after low-dose irradiation. *Lancet* 1989, 1: 629-631.

MOLINA Th., ALLEMAND I., BIGORGNE C., AUDOUIN J., BRIAND P., DIEBOLD J. Souris transgéniques, modèles animaux de pathologie humaine. *Ann. Pathol.* 1995; 15: 163-177.

MOLL U. M., RIOU G., LEVINE A. J. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer : mutation and nuclear exclusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1992, 89: 7262-7266.

MOMAND J., ZAMBETTI G. P., OLSON D.C., GEORGE D., LEVINE A. J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992, 69: 1237-1245.

MONK M. Mammalian development : a practical approach. Oxford : IRL Press, 1987.

MOOLGAVKAR S.H., DAY N.E., STEVENS R.G. Two-stage model for carcinogenesis: epidemiology of breast cancer in females. *J. Natl. Cancer Inst.* 1980, 65: 559-569.

MOORES J. C., PROVOST G. S., RANSOM S. L., HAMNER R. T., SHORT J. M. An analysis of spontaneous mutant frequencies from lambda/*lacI* transgenic mouse lineages varying in copy number and chromosomal position. *Environ. Mol. Mutagen.* 1992, 19-S20, i-iii.

MORI K., FUJII R., KIDA N., OHTA M., HAYASHI K. Identification of A polypeptide secreted by human breast cancer cells (MCF-7) as the human estrogen-responsive gene (pS2) product. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, 1: 366-372.

MORIMOTO R. I. Heat shock : The role of transient inducible responses in cell damage, transformation and differentiation. *Cancer cells* 1991, 3: 295-301.

MÜLLER R., SLAMON D. J., TREMBLAY J. M., CLINE M. J., VERMA I. M. Differential expression of cellular oncogenes during pré- and postnatal development of the mouse. *Nature* 1988, 299: 640-644.

MULLIS K. B., FALOONA F. A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987, 155: 335-350.

MYHR B.C. Validation studies with MutaTM mouse : a transgenic mouse model for detecting mutations *in vivo*. *Environ. Mol. Mutagen.* 1991, 18: 308-315.

N

NAKAMURA H., SAID J. W., MILLER C.W. and KOEFFLER H. P. Mutation and protein expression of p53 in acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma. *Blood* 1993, 920-926.

NAKAYAMA H., YOKOI H., FUJITA J. Quantification of mRNA by non-radioactive RT-PCR and CCD imaging. *Nucl. Acids Res.* 1992, 20: 4939.

NEUBAUER A., NEUBAEUR B., HE M., EFFERT P., IGLEHART D., FRYE R. A., LIU E. Analysis of gene amplification in archival tissue by differential polymerase chain reaction. *Oncogene* 1992, 7: 1019-1025.

NIELSEN L. L., GURNANI M., TYLER R. D. Evaluation of the wap-ras transgenic mouse as a model system for testing anticancer drugs. *Cancer Res.* 1992, 52: 3733-3738.

NIGRO J. M., SIKORSKI R., REED S. I., VOGELSTEIN B. Human p53 and CDC2Hs genes combine to inhibit the proliferation of *saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 1992, 12: 1357-1367.

NOWAK R. Breast cancer gene offers surprises. *Science* 1994, 265: 1796-1799.

NUOVO G. J. PCR *in situ* hybridization. Protocols and Applications. Raven Press, 1992.

NUOVO G. J. *In situ* detection of PCR-amplified DNA and cDNA. *A Forum for PCR users* 1992a, Amplification (Perkin Elmer Publication), Issue 8: 1-2.

NUOVO G. J. Applications of PCR *in situ* hybridization. Human papillomas virus. *In* : PCR *in situ* hybridization. Protocols and Applications. Raven Press 1992b, 185-220.

NUOVO G. J. Applications of PCR *in situ* hybridization. Human Immunodeficiency Virus-1. *In* : PCR *in situ* hybridization. Protocols and Applications. Raven Press 1992c, 221-238.

O

O'BRIEN C. On the trail of a second susceptibility gene. *Science* 1994, 265: p1798.

OLINER J. D., PIETENPOL J. A., THIAGALINGAM, GYRIS J., KINZLER K. W., VOGELSTEIN B. Oncoprotein mdm2 conceals the activation domain of tumor suppressor p53. *Nature* 1993, 362: 857-860.

OLSON H., BORG A., FERNÖ M., RANSTAM J., SIGURDSSON H., *Her2/neu* and *int-2* proto-oncogene amplification in malignant breast tumors in relation to reproductive factors and exposure to exogenous hormones. *J. Natl. Cancer Inst.* 1991, 83: 1484-1487.

OZTURK M. p53 mutations in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet* 1991, 388: 1356-1359.

P

PALMITER R. D., BRINSTER R. L. Germ-line formation of mice. *Ann. Rev. Genet.* 1986, 20: 465-499.

PARKIN DM, LAARA E, MUIR CS. Estimates of the world-wide frequency of twelve common cancers in 1980. *Int. J. Cancer* 1988, 41: 184-197.

PATERSON M. C., DIETRICH K. D., DANYLUK J., PATERSON A. H. G., LEES A. W., JAMIL N., HANSON J., JENKINS H., KRAUSE B. E., McBLAIN W. A., SLAMON D. J., FOURNEY R. M. Correlation between c-erbB-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. *Cancer Res.* 1991, 51: 556-567.

PATTENGALE P. K., STEWART T. A., LEDER A., SINN E., MULLER W., TEPLER I., SCHMIDT E., LEDER P. Pathology and molecular biology of spontaneous neoplasms occurring in transgenic mice carrying and expressing activated cellular oncogenes. *Am. J. Pathol.* 1989, 135: 39-61.

PINHASI-KIMHI O., MICHALOVITZ D., BEN-ZEEV A., OREN M. Specific interaction between the p53 cellular tumor antigen and major heat shock proteins. *Nature* 1986, 320: 182-184.

PINCUS M. R., CHUNG D., DYKES D. C., BRANDT-RAUF P., WEINSTEIN I. B., YAMAIZUMI Z., NISHIMURA S. Pathways for activation of the *ras*-oncogene-encoded p21 protein. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1992, 22: 323-342.

PORTER PL, GARCIA R, MOE R, CORWIN DJ, GOWN AM. -*c-erbB-2* oncogene protein in *in situ* and invasive lobular breast neoplasia. *Cancer* 1991, 68, 331-334.

Q

QUAIFE C. J., PINKERT C. A., ORNITZ D. M., PALMITER R. D., BRINSTER R. L. Pancreatic neoplasia induced by *ras* expression in acinar cells of transgenic mice. *Cell* 1987, 48: 1023-1034.

R

RECIO L., OSTERMAN-GOLKAR S., CSANADY G. A., MYHR B., MOSS O., BOND J. A. An assessment of the mutagenicity of 1,3-butadiene in a transgenic mouse. *Environ. Mol. Mutagen.* 1992, 19-S20, i-iii.

RIDLEY A. J., HALL A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992, 70: 389-399.

RIDLEY A. J., PATERSON H. F., JOHNSTON C. L., DIECKMANN D., HALL A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992, 70: 401-410.

RIHN B., COULAIS C., BOTTIN M. C., MARTINET N. Evaluation of non-radioactive labelling of deoxyribonucleic acids. Part one : chemiluminescent methods. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 1995a , 30: 91-102.

RIHN B., BOTTIN M. C., COULAIS C., MARTINET N. Evaluation of non-radioactive labelling and detection of deoxyribonucleic acids. Part two : colorigenic methods and comparison with chemiluminescent methods. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 1995b, 30: 103-112.

RIHN B., COULAIS C., BOTTIN M. C., ZISSU D., EDORH A. Use of non-radioactive methods for the determination of transgene expression, sequence, and copy-number. *Cell. Mol. Biol.* 1995c, 41: 907-915.

RIO M. C., BELLOCQ J. P., GAIRARD B., KOEHL C., RENAUD R., CHAMBON P. Expression spécifique du gène humain *pS2* dans les cancers du sein. *Biochimie* 1988, 70: 961-968.

RO J., EL-NAGGAR A., RO J. Y., BLICK M., FRYE D., FRASCHINI G., FRITSCH H., HORTOBAGYI G. *c-erbB-2* amplification in node-negative human breast cancer. *Canc. Res.* 1989, 49: 6941-6944.

ROBERTS M., WALLACE J., JELTSCH J. M., BERRY M. The 5' flanking region of the human *pS2* gene mediates its transcriptional activation by estrogen in MCF-7 cells. *Biochem. and Biophys. Res. Com.* 1988, 151: 306-313.

S

SANDGREN E. P., QUAIFE C. J., PINKERT C. A., PALMITER R. D., BRINSTER R. L. Oncogene-induced liver neoplasia in transgenic mice. *Oncogene* 1989, 4: 715- 724.

SCHECHTER A. L., STERN D. F., VAIDYANATHAN L., DECKER S. J., DREBIN J. A., GREENE M. I., WEINBERG R. A., The *neu* oncogene : an *erb-B-2* related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 1984, 312: 513-516.

SCHIMMELPENNING H., ERIKSON E. T., ZETTERBERG A., AUER G. U. Association of immunohistochemical *p53* tumor suppressor gene protein overexpression with prognosis in highly proliferative human mammary adenocarcinomas. *World J. Surg.* 1994, 18: 827-833.

SCHNEIDER N. R., WILLIAMS W. R. et CHANGANTI S. K. Genetic epidemiology of familial aggregation of cancer. *Adv. Cancer Res.* 1986, 47: 1-36.

SCHWARTZ L. H., KOERNER F. C., EDGERTON S. M., SAWICKA J. M., RIO M. C., BELLOCQ J. P., CHAMBON P., THOR A. D. *pS2* expression and response to hormonal therapy in patients with advanced breast cancer. *Cancer Res.* 1991, 51: 624-628.

SESTINI R., ORLANDO C., ZENTILIN L., GELMINI S., PINZANI P., BIANCHI S., SELLI C., GIACCA M., PAZZAGLI M. Measuring *c-erbB-2* oncogene amplification in fresh and paraffin-embedded tumors by competitive polymerase chain reaction. *Clin. Chem.* 1994, 40: 630-636.

SETO E., USHEVA A., ZAMBETTI G. P., MOMAND J., HORIKOSHI N., WEINMANN R., LEVINE A. J., SHENK T. Wild type p53 binds to the TATA binding protein and represses transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1992, 89: 12028-12032.

SHAW P., BOVEY R., TARDY S., SAHLI R., SORDAT B., COSTA J. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1992, 89: 4495-4499.

SHOU C., FARNSSWORTH C. L., NEEL B. G., FEIG L. A. Molecular cloning of cDNAs encoding a guanine-nucleotide-releasing factor for Ras p21. *Nature* 1992, 358: 351-354.

SIMON M. A., BOWTELL D. D. L., DODSON G. S., LAVERTY T. R., RUBIN G. M. Ras 1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signalling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* 1991, 67: 701-716.

SINGER R. H., LAWRENCE J. B., VILLNAVE C. Optimisation of in situ hybridization using isotopic and non-isotopic detection methods. *Biotechniques* 1986, 4: 230.

SLAMON D. J., CLARK G. M., WONG S. G., LEVIN W. J., ULLRICH A., McGUIRE W. L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987, 235: 177-182.

SLICHENMYER W. J., NELSON W. G., SLEBOS R.J., KASTAN M.B. Loss a p53-associated G1 checkpoint does not decrease cell survival following DNA damage. *Cancer Res.* 1993, 53: 4164-4167.

SMITH M. L., TSUEN-CHEN I., ZHAN Q., BAE I., CHEN C. H., GILMER T. M., KASTAN M. B., O'CONNOR P. M., FORNACE A. J. Interaction of the p53-regulated protein Gadd 45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 1994, 266: 1376-1380.

SOUTHERN E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 1975, 98: 503.

SPANDIDOS D. A., KARAIOSIFIDI H., MALLIRI A., LINARDOPOULOS S., VASSILAROS S., TSIKKINIS A., FIELD J. K. Expression of ras, RB1 and p53 proteins in human breast cancer. *Anticancer Res.* 1992, 12: 81-90.

STENGER J.E., MAYR G. A., MANN K., TEGTMEYER P. Formation of stable p53 homotetramers and multiple tetramers. *Mol. Carcinog.* 1992, 5: 102-106.

T

TARAKHOVSKY A., ZAICHUK T., PRASSOLOV V., BUTENKO Z. A. The 25 kDa polypeptide is the ligand for p185 neu and is secreted by activated macrophages. *Oncogene* 1991, 6: 2187.

TEMPLETON D.J. Nuclear binding of purified retinoblastoma gene product is determined by cell cycle-regulated phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 1992, 12: 435-443.

THOMPSON E. D., GORELICK N. J., DINDER R. L., MYHR B. C., PUTMAN D. L. Interlaboratory comparisons of dimethylbenzanthracene-induced mutations in skin of MUTATM mouse and the Big BlueTM mouse. *Environ. Mol. Mutagen.* 1992, 19-S20, i-iii.

TOBIN C. Les traitements de demain. *T Vivre* 1995, 288: 32-33.

TOKUNAGA M., LAND C., YAMAMOTO T., ASANO M., TOKUOKA S., EZAKI H., NISHIMORI I. Breast cancer in japanese bomb-A survivors (letter). *Lancet* 1982, 924.

TRICHOPOULOS D., MACMAHON B., COLE P. Menopause and breast cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* 1972, 48: 604-613.

TSUDA H., HIROHASHI S., SHIMOSATO Y., HIROTA T., TSUGANE S., YAMAMOTO H., MIYAJIMA N., TOYOSHIMA K., YAMAMOTO T., YOKOTA J., YOSHIDA T., SAKAMOTO H., TERADA M., SUGIMURA T. Correlation between long-term survival in breast cancer patients and amplification of two putative oncogene-coamplification units: hst-1/int-2 and c-erbB-2/ear-1. *Cancer Res.* 1989, 49: 3104-3108.

TSVIELI R., MITRANI-ROSENBAUM S. Status of the p53 gene at the various stages of cervical malignant progression. In: International Papillomavirus Conference, 12, 1993. Baltimore, *Livre des communications*: p.116.

U

ULLRICH S. J., MERCER W. E., APPELLA E. Human wild-type p53 adopts a unique conformational and phosphorylation state *in vivo* during growth arrest of glioblastoma cells. *Oncogene* 1992, 7: 1635-1643.

V

VALENCIA A., CHARDIN P., WITTINGHOFER A., SANDER C. The *ras* family : evolutionary tree and role of conserved aminoacids. *Biochemistry* 1991, 3: 4637-4638.

VAN DEN BERG F. M., BAAS I. O., POLAK M. M., OFFERHAUS G. J. A. Detection of p53 overexpression in routinely paraffin-embedded tissue of human carcinomas using a novel target unmasking fluid. *Am. J. Pathol.* 1993, 142: 381-385.

VENTER D. J., KUMAR S., TUZI N. L., GULLICK W. J. Overexpression of the *c-erbB-2* oncoprotein in human breast carcinomas : immunohistochemical assessment correlates with gene amplification. *Lancet* 1987, 2: 69-71.

VOGELSTEIN B., KINZLER W. p53 function and disfunction. *Cell* 1992,70: 523-526.

VOGELSTEIN B. Many gene changes found in cancer. *Science* 1989, 246: 1386-1388.

W

WEINBERG R.A. The action of oncogenes in the cytoplasm and the nucleus. *Science* 1985, 230: 770-776.

WELLINGS S. R., JENSEN H. M., MARCUM R. G. An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *J. Nat. Cancer Inst.* 1975, 55: 231-273.

WESTRA W. H., OFFERHAUS G. J., GOODMAN S. N., SLEBOS R. J., POLAK M., BAAS I. O., RODENHUIS S., HRUBAN R. H. Overexpression of the *p53* tumor suppressor gene product in primary lung adenocarcinomas is associated with cigarette smoking. *Am. J. Surg. Pathol.* 1993, 17: 213-220.

WILLIAMS G. T., SMITH C. A. Molecular regulation of apoptosis : genetic control of cell death. *Cell* 1993, 74: 777-779.

WINSTANLEY J., COOKE T., MURRAY G. D., PLATT-HIGGINS A., GEORGE W. D., HOLT S., MYSKOV M., SPEDDING A., BARRACLOUGH B. R., RUDLAND P. S. - The long term prognostic significance of *c-erbB-2* in primary breast cancer. *Br. J. Cancer* 1991, 63, 447-450).

WITTY J. P., LEMPKA T., COFFEY R. J., MATRISIAN L. M. Decreased tumor formation in 7, 12 dimethylbenzanthracene-treated stromelysin-1 transgenic mice is associated with alterations in mammary epithelial cell. *Cancer Res.* 1995, 55: 1401-1406.

WOOSTER R., STRATTON M. R. Breast cancer susceptibility : a complex disease unravels. Comment. *Trends Genet.* 1995, 11: 3-5.

Y

YAMAMOTO T., IKAWA S., AKIYAMA T., SEMBA K., NOMURA N., MIYAJIMA N., SAITO T., TOYOSHIMA K. Similarity of protein encoded by the human *c-erbB-2* gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 1986, 319: 230-234.

YANCOPOULOS G. D., NISEN P. D., TEFAYE A., KOHL N. E., GOLDFARB M. P., ALT F. W. N-myc can cooperate with *ras* to transform normal cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1985, 82: 5455-5459.

YANDELL D. W., THOR A.D. *p53* analysis in diagnostic pathology. Biologic implications and possible clinical applications. *Diag. Mol. Pathol.* 1993, 2: 1-3.

YARDEN Y., PELES E. Biochemical analysis of the ligand for the neu oncogeneic receptor. *Biochemistry* 1991, 30: 3543.

YARDEN Y., WEINBERG R. A. Experimental approaches to hypothetical hormones : detection of a candidate ligand of the *neu* protooncogene. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 1989, 86: 3179-3183.

YONISH-ROUACH E., RESNITZKY D., LOTEM J., SACHS L., KIMCHI A., OREN M. Wild-type *p53* induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991, 352: 345-347.

YOUNG R. R., PROVOST G. S., SHORT J. M., PUTMAN D. L. Characterization of an *in vivo* mutagenesis system : interlaboratory comparison using benzo(a)pyrene. *Environ. Mol. Mutagen.* 1992, 19-S20, i-iii.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Microanatomie de la glande mammaire.	10
Figure 2 : Unité terminale ducto-lobulaire.	11
Figure 3 : Glande mammaire normale.	12
Figure 4 : Carcinome lobulaire infiltrant de grade I. Infiltration de petites cellules carcinomateuses peu atypiques isolées ou en file indienne autour d'un canal non tumoral (Gr. x 250).	17
Figure 5 : Carcinome canalaire infiltrant de grade I. Prolifération irrégulière de structure tubuleuse avec quelques microcalcifications (Gr. x 100).	18
Figure 6 : Maladie de Paget du mamelon. Propagation intraépidermique des cellules carcinomateuses qui apparaissent plus volumineuses, à cytoplasme clair et à noyau atypique (Gr. x 250).	19
Figure 7 : Les principales oncoprotéines et antioncoprotéines qui interviennent dans les différentes étapes de la transmission des signaux de croissance cellulaire.	28
Figure 8 : Structure de l'oncoprotéine c-erbB-2 et du récepteur de l'EGF.	30
Figure 9 : Structure générale des récepteurs des facteurs de croissance.	31
Figure 10 : Modèle des fonctions effectrices présumées des protéines activant la GTPase.	35
Figure 11 : Carcinome canalaire infiltrant. Fixation au formol tamponné puis coloration Hématoxyline-Eosine-Safran (Gr. x 250).	56
Figure 12 : c-erbB-2 : Marquage membranaire des cellules néoplasiques des composantes invasive et intracanaire d'un carcinome canalaire infiltrant de grade III (Gr. x 250).	81
Figure 13 : p53 : Carcinome canalaire infiltrant de grade III (Gr. x 63).	82
Figure 14 : p53 : Carcinome canalaire infiltrant de grade III. A noter, l'absence de marquage des cellules d'un canal résiduel normal (Gr. x 250).	83

Figure 15 : pS2 : Cellules tumorales d'un carcinome canalaire infiltrant de grade III. A noter, l'absence de marquage des cellules d'un canal résiduel normal (Gr. x 250).	84
Figure 16 : pS2 : Immunomarquage cytoplasmique au niveau d'environ 60 % des cellules néoplasiques d'un carcinome canalaire infiltrant de grade II (Gr. x 400).	84
Figure 17 : c-Ha-ras : Carcinome canalaire infiltrant de grade III (Gr. x 250).	85
Figure 18 : c-Ha-ras : Carcinome canalaire infiltrant de grade III (Gr. x 400).	86
Figure 19 : Organisation de la structure du transgène "promoteur du MMTV/v-Ha-ras".	98
Figure 20 : Tumeur mammaire de souris transgéniques. RT-PCR <i>in situ</i> . Petites zones de marquage d'intensités variables (Gr. x 400).	139
Figure 21 : Carcinome canalaire infiltrant. A noter d'importantes anomalies nucléaires (Gr. x 400).	143
Figure 22 : Carcinome canalaire infiltrant. Absence de marquage de l'épithélium normal au niveau d'un canal (Gr. x 250).	143
Figure 23 : Carcinome lobulaire et canalaire mixte (Gr. x 250).	144
Figure 24 : Immunomarquage d'un fibroadénome (Gr. x 100).	145
Figure 25 : Marquage des cellules cancéreuses de la maladie du Paget du mamelon (Gr. x 400).	145

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Tumeurs mammaires malignes épithéliales (OMS, 1981).	15
Tableau 2 : Fréquence comparée des mutations des gènes <i>p53</i> et <i>ras</i>	50
Tableau 3 : Mélange réactionnel pour la réaction de polymérisation en chaîne.	62
Tableau 4 : PCR quantitative (incorporation directe de la Dig-11-dUTP) et immunohistochimie sur les carcinomes canauxaires infiltrants de grade I, II et III (<i>c-erbB-2</i>) et immunohistochimie sur carcinomes canauxaires infiltrants de grade I, II et III (<i>p53</i> , <i>pS2</i> , <i>c-Ha-ras</i>).	87
Tableau 5 : Types histologiques des lésions étudiées.	142

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	5
PREMIERE PARTIE : LE CANCER DU SEIN	6
CHAPITRE I : Généralités sur le cancer du sein	7
1. Position du problème	7
1.1. Glande mammaire	8
1.1.1. Développement	8
1.1.2. Microanatomie - Histologie	9
1.1.3. Histophysiologie	11
1.1.4. Glande mammaire normale	13
1.1.5. Mastopathies bénignes	13
1.2. Le cancer du sein	14
1.2.1. Classification histologique	14
1.2.2. Histologie des carcinomes mammaires	15
1.2.2.1. Les formes non infiltrantes	15
1.2.2.2. Les formes infiltrantes	16
1.2.2.3. Maladie de Paget	19
2. Facteurs de risques	19
2.1. Facteurs familiaux	19
2.2. Facteurs hormonaux	21
2.3. Facteurs environnementaux	23
2.4. Facteurs alimentaires	23
3. Les oncogènes	24
3.1. Introduction	24
3.2. Classification des oncogènes	26
3.3. Oncogène <i>c-erbB-2</i>	28
3.3.1. Structure du proto-oncogène <i>c-erbB-2</i>	28
3.3.2. Expression de <i>c-erbB-2</i> dans les cancers du sein	31
3.4. Les oncogènes de la superfamille <i>ras</i>	32
3.4.1. Structure primaire des protéines <i>ras</i>	33
3.4.2. Localisation des protéines <i>ras</i> et modifications post-traductionnelles	33
3.4.3. Protéines <i>ras</i> et signalisation	34
3.4.4. Régulation de l'expression du gène <i>ras</i>	35
3.4.5. Rôle pathologique des protéines <i>ras</i>	38
3.4.6. <i>Ras</i> et tumeurs mammaires	38
3.5. Le gène <i>pS2</i>	39
3.5.1. Structure et régulation du gène <i>pS2</i>	39
3.5.2. <i>pS2</i> et cancer du sein	40

4 . Les anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs	40
4.1. Généralités	40
4.2. L'anti-oncogène <i>p53</i>	43
4.2.1. Structure de la protéine <i>p53</i>	43
4.2.2. <i>p53</i> et cycle cellulaire	44
4.2.3. Autres fonctions de <i>p53</i>	45
4.2.4. <i>p53</i> et mutations	47
5. Coopération entre les oncogènes	50
6. Rappel sommaire des techniques de mise en évidence des oncogènes, anti-oncogènes et de leurs produits	52
6.1. Etudes d'amplification de gènes	52
6.1.1. Southern blotting	52
6.1.2. Slot blotting	52
6.1.3. Réaction de polymérisation en chaîne différentielle	53
6.1.4. Hybridation <i>in situ</i>	53
6.1.5. PCR <i>in situ</i>	53
6.2. Détection des ARN messagers	53
6.3. Détection de l'expression des oncoprotéines	53
6.3.1. Immunohistochimie	54
6.3.2. Immunoblotting	54
6.3.3. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	54
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES	55
1. Les prélèvements	55
2. Méthodes	56
2.1. Immunohistochimie	56
2.1.1. Technique immunohistochimique pour la mise en évidence de l'oncoprotéine c-erbB-2	56
2.1.2. Technique immunohistochimique pour la mise en évidence de <i>p53</i>	58
2.1.3. Technique immunohistochimique pour la mise en évidence de l'oncoprotéine de <i>pS2</i>	59
2.1.4. Technique immunohistochimique pour la mise en évidence de l'oncoprotéine c-Ha-ras	59
2.2. Réaction de polymérisation en chaîne <i>in vitro</i>	60
2.2.1. Extraction de l'ADN à partir des tissus paraffinés	60
2.2.2. PCR quantitative	61
2.2.3. Marquage non radioactif	61
2.2.4. Marquage radioactif	63
2.2.5. Electrophorèse en gel d'agarose pour les marquages non radioactifs	63
2.2.6. Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 16 % pour les produits d'amplification radioactifs	63
2.2.7. Transfert sur membrane	64
2.2.8. Lavages et révélation	64
2.2.9. Transparisation de la membrane de nitrocellulose	64
CHAPITRE III : RESULTATS	66

1. Expression de l'oncoprotéine <i>c-erbB-2</i> dans la maladie de Paget mammaire. Etude immunohistochimique à l'aide de 3 anticorps.	66
2. Détermination du niveau d'amplification du proto-oncogène <i>c-erbB-2</i> dans les carcinomes mammaires : Etude comparative entre un marquage non radioactif et radioactif.	73
3. Expression de <i>c-erbB-2</i> , <i>p53</i> , <i>c-Ha-ras</i> , <i>pS2</i> dans les carcinomes canauxaires infiltrants (CCI)	81
3.1. Expression du gène <i>c-erbB-2</i> .	81
3.2. Expression du gène <i>p53</i> .	82
3.3. Expression du gène <i>pS2</i> .	83
3.4. Expression du gène <i>c-Ha-ras</i> .	85
3.5. Comparaison de l'expression de ces quatre gènes.	86
3.6. Expression et niveau d'amplification de <i>c-erbB-2</i> dans les carcinomes canauxaires infiltrants.	86
CHAPITRE IV : CONCLUSION	90
DEUXIEME PARTIE : UTILISATION DES SOURIS TRANSGENIQUES <i>v-Ha-ras</i> EN TOXICOLOGIE	92
1. Historique et utilité des souris transgéniques	93
2. Techniques de transgénèse	94
2.1. Transgénèse "classique"	94
2.2. Recombinaison homologue	95
3. Transgénèse et pathogénèse des cancers	96
3.1. Les animaux transgéniques : utilité pour l'étude de la pathogénèse des cancers	96
3.2. Souris transgéniques portant <i>v-Ha-ras</i>	97
3.3. Souris nullizygotés pour <i>p53</i>	99
3.4. Souris transgéniques pour <i>neu</i>	101
4. Transgénèse et mutagenèse <i>in vivo</i>	103
5. Autres applications de la transgénèse en toxicologie	105
6. Utilisation des animaux transgéniques pour évaluer le potentiel cancérigène des toxiques	107
7. Mesure de l'expression de <i>v-Ha-ras</i> et séquençage du gène par une méthode non radioactive	108
8. Effets des éthers de glycol sur des souris transgéniques	118
9. Conclusion	132
CONCLUSION GENERALE	133
ANNEXES	135
ANNEXE 1	136

1. Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne <i>in situ</i>	136
2. Matériel et méthodes	136
2.1. Prélèvements	136
2.2. Méthodes	136
2.2.1. Préparation de l'échantillon	136
2.2.2. Transcription inverse <i>in situ</i>	137
2.2.3. Réaction de polymérisation en chaîne <i>in situ</i>	137
2.2.4. Lavages	137
2.2.5. Détection des produits amplifiés	138
3. Résultats	138
4. Conclusion	139
ANNEXE 2	141
1. Détection par immunohistochimie de l'oncoprotéine c-erbB-2 dans les carcinomes et les lésions bénignes du sein	141
2. Introduction	141
3. Prélèvements	141
4. Méthodes	141
5. Résultats	142
6. Conclusion	146
ANNEXE 3	147
Etude à court terme de l'inhalation de fibre de crocidolite sur des souris : Validation d'une chambre d'inhalation	
BIBLIOGRAPHIE	158
Liste des Figures	175
Liste des Tableaux	177
Sommaire	178

Expression d'oncogènes et tumeurs mammaires : Etude clinique et développement d'un modèle de souris transgéniques pour v-Ha-ras en toxicologie.

Résumé

L'expression de trois oncogènes (*c-erbB-2*, *ras*, *p52*) et d'un gène suppresseur de tumeur a donné lieu à une étude de cas clinique et une étude expérimentale ayant utilisé les souris transgéniques v-Ha-ras. Une quantification du nombre de copies de l'oncogène *c-erbB-2* a été obtenue par amplification génique associée à un marquage froid des amplimères à partir de 29 carcinomes infiltrants. Il semble exister une relation entre le nombre de copies du *c-erbB-2* et le grade de la tumeur. Dans les mêmes lésions, l'immunohistochimie a montré que *c-Ha-ras* et *p53* sont exprimés surtout dans les lésions de haut grade. En revanche, *p52* est exprimé surtout dans les lésions de faible grade, confirmant ainsi le pronostic favorable qui lui est associé. L'étude des oncogènes et des protéines correspondantes peut apporter des éléments pronostiques dans les cancers mammaires de la femme.

Des souris transgéniques v-Ha-ras ont été utilisées pour mettre en évidence le potentiel cancérigène de produits chimiques. Des méthodes de marquage de sondes et de révélation radioactifs (colorimétrie et chimioluminescence) ont permis d'établir que ces souris portant le transgène *ras* et l'expriment dans les organes hématopoiétiques (rate et thymus) ainsi que dans le rein et le foie. Le transgène est présent à raison de 2 ou 3 copies par équivalent-génome. Nous avons montré ensuite que le 2-butoxyéthanol administré par mini-pompe osmotique pendant 10 jours (dose totale 10 mmol/kg), était dénué d'effets génotoxique et épigénétique mesurés par la méthylation de l'ADN total, (ii) la méthylation du transgène v-Ha-ras et (iii) l'absence de formation d'adduits hydrophobes et hydrophiles sur l'ADN. De plus, le 2-butoxyéthanol n'a pas induit la formation de tumeurs chez ces souris. Ce modèle d'animaux transgéniques pourrait être utilisé comme test de criblage de substances potentiellement cancérigènes.

Mots clés : Oncogènes, tumeur mammaire, souris transgéniques v-Ha-ras, 2-butoxyéthanol, méthylation, adduit de l'ADN, effet épigénétique, génotoxicité.

Title : Oncogene expression and breast carcinomas : Clinical study and development of a v-Ha-ras transgenic mouse model in toxicology.

Summary :

We have investigated the expression of three oncogenes (*c-erbB-2*, *ras*, *p52*) and one suppressor tumor gene (*p53*) in first, a clinical study, second, in an experimental one using the v-Ha-ras transgenic mice.

Quantification of copy number of *c-erbB-2* oncogene has been obtained by gene amplification using non-radioactive amplifier labelling on 29 mammary ductal infiltrating carcinomas. There was an apparent correlation between gene copy number and tumor grade. Immunohistochemistry on the same lesions have shown *c-Ha-ras* and *p53* expression in high grade lesions. *p52* expression was associated to low grade lesions, which confirms the good prognosis associated to this protein. Detection of oncogenes and encoded proteins may be of value for establishing a prognosis in mammary carcinomas.

The v-Ha-ras transgenic mice have been used to evidence the carcinogenic potential of chemicals. Using non-radioactive labelling and detection methods (colorigenic and chemiluminescent), we have verified that these mice carried the *ras* transgene and expressed it in the hematopoietic organs (spleen and thymus) as well as in the kidney and the liver. We have found 2 or 3 copies of the transgene per genome-equivalent. 10 mmol/kg of 2-butoxyethanol administered over 2 weeks using osmotic minipumps have shown that this compound is devoided of epigenetic and genotoxic effects as measured by (i) methylation of total and v-Ha-ras gene DNA, (ii) absence of hydrophobic and hydrophilic DNA adducts. 2-butoxyethanol did not induce tumor formation in transgenic mice. This animal model could be used as a screening test for possible carcinogenic chemicals.

Key words : Oncogenes, mammary tumor, v-Ha-ras transgenic mice, 2-butoxyethanol, methylation, DNA adduct, epigenetic effect, genotoxicity.