

Université de Montréal

Mutagenèse rétrovirale, transfection avec β -galactosidase et étude
cinétique de la propagation des cellules de rhabdomyosarcome de rat
(Modèle SMF/RMS)

par

Azra J. Alvi

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en Biopathologie Cellulaire

Décembre 2000

©Azra J. Alvi, 2000



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Mutagenèse rétrovirale, transfection avec β -galactosidase et étude
cinétique de la propagation des cellules de rhabdomyosarcome de rat
(Modèle SMF/RMS)

présentée par:

Azra J. Alvi

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Louis Gaboury

Dr. Féridoun Babal

Dr. Luc Villeneuve

Dre. Allégria Kessous

Dr. Pierre Chartrand

Dre. Rosemonde Mandeville

Thèse acceptée le 17 janvier 2001

Sommaire

Les processus de cancérisation et de métastase sont liés à l'expression anormale de gènes qui, à l'état normal, président au contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la motilité cellulaire. Chaque étape de la cascade métastatique est susceptible de faire intervenir l'activation et/ou l'inactivation de plusieurs classes de gènes. La nature et la fonction de ces gènes n'ont pas encore été complètement élucidées.

Notre objectif principal était d'utiliser l'approche de mutagenèse rétrovirale pour obtenir des mutants cellulaires métastatiques puis d'identifier et de cloner de nouveaux gènes impliqués dans l'expression du phénotype invasif et métastatique des cellules cancéreuses. Nos travaux reposent sur l'utilisation d'un modèle de rhabdomyosarcome de rat composé de lignées cellulaires tumorales ayant des potentiels métastatiques variés mais définis, établi dans le laboratoire du Dr. Féridoun Babaï. Les cellules de la lignée SMF-Da ont été mutées avec le rétrovirus défectif N2, lequel s'intègre dans le génome des cellules infectées de façon aléatoire. Pour faciliter l'identification des mutants métastatiques nous avons utilisé un critère de sélection fondé sur la rétention différentielle de Rho 123 par les cellules métastatiques et non métastatiques. En effet, des travaux préliminaires indiquent que les cellules de la lignée métastatique SMF-Ai retiennent le fluorochrome alors que les cellules de la lignée non métastatique SMF-Da peuvent refouler le colorant hors de la cellule. En outre, les cellules SMF-Da qui perdent la capacité d'expulser le colorant induisent plus rapidement la formation de tumeurs. Ainsi, suite à l'infection par le virus N2, les cellules SMF-Da qui

retenaient la Rho 123 dans la région de rétention des cellules SMF-Ai furent triées par cytométrie en flux et injectées à des rats syngéniques afin de vérifier si l'infection rétrovirale avait activé ou inactivé certains gènes et ainsi modifié le comportement invasif ou métastatique des cellules du modèle SMF. L'analyse de l'ADN des cellules infectées a démontré la présence de multiples intégrations rétrovirales dans chacune des populations de cellules infectées et triées. Cependant, l'intégration virale ne s'est pas accompagnée d'un changement dans le phénotype métastatique. Nous avons ensuite marqué les lignées cellulaires du modèle SMF en y introduisant l'enzyme β -galactosidase puis nous les avons infecté avec le rétrovirus de leucémie murine de Moloney. Suite à l'infection nous avons observé une persistance plus longue des tumeurs chez quelques animaux injectés avec les clones de cellules SMF-Da β -galMoloney et la formation d'un plus grand nombre de tumeurs; cependant nous n'avons pas observé la formation de métastases. Nos résultats indiquent que le modèle de rhabdomyosarcome se prête à l'infection rétrovirale mais qu'il ne permet pas la reversion du phénotype métastatique.

Nous avons ensuite utilisé notre modèle pour l'étude de la cinétique de propagation *in vivo* des cellules marquées avec l'enzyme β -gal. Nous avons constaté que les cellules non métastatiques SMF-Da β -gal ne peuvent pas extravaser après injection intraveineuse. Nous avons aussi montré que la majorité des cellules tumorales des deux lignées injectées (SMF-Da β -gal et SMF-Ai β -gal) disparaissaient rapidement des poumons entre 1 heure et 6 heures post-injection. Nos travaux ont établi des différences importantes survenant à l'étape d'extravasation pulmonaire entre les

cellules non métastatiques et métastatiques. Ces résultats s'opposent à ceux rapportés par le groupe de Chambers utilisant la méthode de microscopie intravitale dans le foie, suggérant que l'extravasation des cellules tumorales dépend d'interactions tissulaires spécifiques entre l'endothélium de l'organe cible et les propriétés de la cellule tumorale.

Sommaire.....	iii
Liste des tableaux	xii
Liste des figures	xiii
Liste des abréviations	xv
CHAPITRE 1	
INTRODUCTION ET REVUE DE LA LITTÉRATURE	1
1.1 - Cancérisation	1
1.1.1 - Néoplasie et tumeurs.....	1
1.1.2 - Cancer	3
i - Nomenclature des gènes impliqués dans la néoplasie	4
ii - Découverte des oncogènes	4
iii - Gènes associés à la progression tumorale.....	7
1.1.3 - Mécanismes d'activation des oncogènes	8
i - Mutation ponctuelle	8
ii - Amplification génique	8
iii - Translocation	9
1.1.4 - Phénomènes épigénétiques	9
1.1.5 - Collaboration des gènes dans la cancérogenèse	10
1.1.6 - Définition de la métastase	10
1.1.7 - Patron de distribution des tumeurs métastatiques	11
1.1.8 - Voies de dissémination des tumeurs solides	12
1.1.9 - Cascade métastatique des tumeurs solides	13
i - Transformation maligne	15
ii - Angiogenèse I (néovascularisation)	16
iii - Invasion locale	17
A - Matrice extracellulaire	19
B - Molécules d'adhésion.....	19
C - Enzymes protéolytiques	23
D - Motilité cellulaire	26
iv - Rôle des néovaisseaux	28
v - Intravasation.....	29
A - Interactions cellulaires	30

B - Survie des cellules néoplasiques dans la circulation.....	31
C - Arrêt et adhérence à l'endothélium	31
vi - Extravasation.....	33
vii - Prolifération des cellules métastatiques	33
viii - Angiogenèse II	34
1.1.10 - Cinétique des cellules tumorales circulantes	34
1.1.11 - Gènes associés à la métastase	36
1.2 - Mutagenèse rétrovirale	40
1.2.1 - Rétrovirus.....	40
1.2.2 - Oncogènes viraux (v-onc) et cellulaires (c-onc).....	42
1.2.3 - Mutagenèse rétrovirale	43
i - Virus de la leucémie murine Moloney	44
A - Structure du virus de Moloney	45
B - Vecteurs rétroviraux dérivés du virus Moloney	46
ii - Lignée d'assemblage $\psi 2$	47
iii - Vecteur N2.....	48
iv - Mutagenèse insertionnelle et cancer	49
v - Mutagenèse insertionnelle et métastase	51

CHAPITRE 2

MODÈLE ET APPROCHE EXPÉRIMENTALE	54
2.1 - Modèle SMF/RMS	54
2.1.1 - Relation entre l'état de différenciation et le potentiel métastatique	56
2.1.2 - Étude des gènes exprimés dans le modèle par hybridation différentielle	57
2.2 - Approche expérimentale	58
2.2.1 - Mutagenèse rétrovirale de la lignée non métastatique SMF-Da avec le virus N2	58
2.2.2 - Mutagenèse rétrovirale de la lignée non métastatique SMF-Da β -gal avec le virus de la leucémie murine Moloney (M-MuLV)	59
2.2.3 - Les outils complémentaires de l'approche de la mutagenèse	60

i - La transfection des lignées SMF-Da et SMF-Ai avec le gène β -gal	60
ii - La rétention différentielle de la Rhodamine 123 chez les lignées cellulaires SMF-Da et SMF-Ai	61
2.2.4 - Étude de la cinétique d'invasion	62
i - Les lignées SMF-Ai β -gal et SMF-Da β -gal	63
ii - La lignée RMS-Be9 β -gal	63
CHAPITRE 3	
MATÉRIELS ET MÉTHODES	65
3.1 - Cellules et milieux	65
3.1.1 - Culture cellulaire	65
3.1.2 - Clonage de lignées cellulaires	66
3.2 - Production virale et infection	66
3.2.1 - Virus	66
i - Rétrovirus défectif N2	66
ii - Rétrovirus Moloney	67
3.2.2 - Production de virus	68
i - Titration du virus N2 par infection des cellules Rat-1	68
ii - Titration du virus infectieux Moloney par le test XC	69
iii - Test Rt pour détection de l'enzyme virale transcriptase inverse	70
3.2.3 - Infection virale des cultures cellulaires par N2 ou Moloney	71
3.3 - Transfection de lignées cellulaires	72
3.3.1 - Vecteurs et constructions	73
3.3.2 - Détection des clones β -gal par histochimie avec X-gal	74
3.4 - Rétention de la Rhodamine 123	74
3.4.1 - Coloration, test de rétention et analyse au FACS	74
3.4.2 - Cytométrie en flux pour triage de cellules	75
3.5 - Animaux et injections	76
3.5.1 - Expériences de métastase spontanée	76

3.5.2 - Expériences de métastase expérimentale	77
3.5.3 - Histologie des tissus animaux	77
3.5.4 - Immunohistochimie	78
3.5.5 - Calcul des décomptes cellulaires	79
3.6 - Analyse de l'ADN et de l'ARN	79
3.6.1 - Extraction d'ADN de culots de cellules	79
3.6.2 - Analyse de l'ADN par la technique de Southern.....	80
i - Technique de buvardage selon Southern.....	80
ii - Préparation des sondes	80
iii - Hybridation des membranes	81
3.6.3 - Transformation de bactéries compétentes	82
3.6.4 - Préparation d'ADN de plasmides par "mini- prep"	82
3.6.5 - Extraction d'ARN de culots de cellules	83
3.6.6 - Analyse de l'ARN par la technique de Northern	83
i - Technique de buvardage selon Northern	83
ii - Préparation des sondes	84
iii - Hybridation des membranes	84

CHAPITRE 4

RÉSULTATS	85
4.1 - Mutagenèse rétrovirale	85
4.1.1 - Mutagenèse rétrovirale avec le virus N2.....	85
i - Production du virus N2	85
ii - Taux des infections des cellules SMF-Da avec N2	86
iii - Expériences de métastase spontanée des SMF-DaN2 chez des rats syngéniques	92
A - Expérience d'injection A	92
B - Expérience d'injection B.....	95
C - Expérience d'injection C.....	98
4.1.2 - Mutagenèse rétrovirale avec le virus Moloney	102
i - Production du virus Moloney.....	102
ii - Taux des infections par test Rt pour la détection de l'enzyme transcriptase inverse	103

iii - Expériences de métastase spontanée des SMF-Da β -galMoloney chez des rats syngénétiques.....	107
D - Expérience d'injection D	107
E - Expérience d'injection E.....	110
F - Expérience de réinjection F	113
4.2 - Les outils de la mutagenèse pour la sélection de mutants	118
4.2.1 - La rétention du fluorochrome Rhodamine 123 par les lignées cellulaires.....	119
i - Rétention différentielle de la Rhodamine 123 chez les lignées cellulaires SMF-Da et SMF-Ai	119
ii - Stabilité du profil de rétention des SMF-Da et SMF-Ai à forte et à faible rétention de la Rhodamine 123	124
A - Populations et clones de cellules SMF-Da	124
B - Clones de cellules SMF-Ai	131
C - Expérience d'injection chez les animaux des populations de cellules SMF-Da triées à forte rétention de la Rhodamine 123	134
D - Relation entre l'expression du gène <i>mdr</i> par les cellules SMF-Ai, SMF-Da à forte et à faible rétention de la Rho 123 et la rétention du colorant	137
4.2.2 - Transfection des lignées SMF-Da et SMF-Ai avec β -gal.....	138
i - Résultats des transfections	138
ii - Caractérisation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des lignées transfectées	143
4.3 - Cinétique métastatique <i>in vivo</i> des clones cellulaires transfectées	145
i - Formation de tumeurs orthotopiques chez les rats injectées dans le muscle avec les lignées	

cellulaires transfectées SMF-Da β -gal et SMF-Ai β -gal	146
ii - Détection des cellules transfectées dans les tumeurs orthotopiques formées par les cellules SMF-Da β -gal et SMF-Ai β -gal	148
iii - Détection des cellules transfectées dans les poumons de rats injectés par la voie intramusculaire.....	152
iv - Cinétique des cellules transfectées suivant injection intraveineuse (veine jugulaire).....	157

CHAPITRE 5

DISCUSSION ET CONCLUSIONS	168
DISCUSSION	168
La mutagenèse rétrovirale	168
Rétention différentielle de la Rhodamine 123	168
Infection avec N2 et sélection des SMF-DaN2 à forte rétention de la Rho 123	170
Sous-clones et stabilité du phénotype de rétention	170
Mutagenèse des SMF-Da β gal avec le virus de Moloney	171
Transfection des lignées cellulaires avec β -galactosidase	172
Cinétique métastatique <i>in vivo</i> des clones cellulaires transfectés	183
Perspectives futures	193
CONCLUSIONS.....	195
BIBLIOGRAPHIE	201

Liste des tableaux

TABLEAU 1	Gènes associés à la métastase	39
TABLEAU 2	Gènes identifiés par la technique de mutagenèse rétrovirale.....	53
TABLEAU 3	Caractéristiques des lignées cellulaires du modèle SMF/RMS.....	56
TABLEAU 4	Titration des productions virales de N2 par infection des cellules Rat-1	86
TABLEAU 5	Colonies de SMF-DaN2 avec ou sans G418 pour les trois expériences (A, B et C) de mutagenèse avec N2.....	88
TABLEAU 6	Titration des productions virales de Moloney par le test XC	103
TABLEAU 7	Caractéristiques des lignées parentales et transfectées	145
TABLEAU 8	Activité β -gal par essai X-gal à différents temps post- injection.....	153
TABLEAU 9	Activité β -gal dans les poumons par essai X-gal à différents temps post-injection.....	158
TABLEAU 10	Décomptes cellulaires par unité d'aire de tissu pulmonaire perfusé au PBS d'animaux injectés par voie intraveineuse	159

Liste des figures

FIGURE 1	Structure du virus Moloney.....	46
FIGURE 2	Structure du vecteur N2.....	48
FIGURE 3	Schéma des vecteurs utilisés pour la transfection des cellules.....	73
FIGURE 4	Analyse par buvardage Southern des cellules DaN2	91
FIGURE 5	Tumorigenicité des cellules SMF-Da mutées avec le virus N2.....	94
FIGURE 6	Tumorigenicité des cellules SMF-Da mutées avec le virus N2 et sélectionnées à la Rhodamine 123	97
FIGURE 7	Tumorigenicité des cellules SMF-Da mutées avec le virus N2 et sélectionnées à la Rhodamine 123	101
FIGURE 8	Détection de la transcriptase inverse chez les cellules infectées par le virus Moloney	106
FIGURE 9	Tumorigenicité des cellules SMF-Da β -gal mutées avec le virus Moloney.....	109
FIGURE 10	Tumorigenicité des cellules SMF-Da β -gal mutées avec le virus Moloney	112
FIGURE 11	Tumorigenicité des cellules extraites de deux tumeurs formées par les cellules SMF-Da β -gal mutées avec le virus Moloney	115
FIGURE 12	Analyse par buvardage des cellules Da β -galMoloney	117
FIGURE 13	Profils de rétention de la Rhodamine 123 des lignées SMF-Da et SMF-Ai.....	121
FIGURE 14	Tri des cellules SMF-DaN2 à forte rétention de la Rhodamine 123.....	123
FIGURE 15	Profils de rétention de la Rhodamine par les cellules SMF- Da, SMF-Da triées à forte rétention et SMF-Ai	126
FIGURE 16A	Clone SMF-Da à faible rétention de Rho 123	128

FIGURE 16B	
Clone SMF-Da à forte rétention de Rho 123	130
FIGURE 17	
Profils des clones à (A) faible et (B) forte rétention de SMF-Ai	133
FIGURE 18	
Tumorigenicité des cellules SMF-Da sélectionnées à forte rétention de la Rhodamine 123.....	136
FIGURE 19	
Microphotographies des cellules SMF-Da et SMF-Ai parentales et transfectées	140
FIGURE 20	
Microphotographies de la lignée transfectée mère de RMS-Be-9 β -gal et deux clones stables	142
FIGURE 21	
Coupes en congélation de tumeurs excisées, congelées en azote et exposées au X-gal	151
FIGURE 22	
Coupes en congélation exposées au X-gal pendant 4 heures à 37°C de poumons excisés d'animaux injectés par la voie intramusculaire.....	156
FIGURE 23	
Coupes en congélation exposées au X-gal pendant 4 heures à 37°C de poumons excisés d'animaux injectés par la voie intraveineuse.....	164
FIGURE 24	
Microphotographies de coupes de paraffine de poumons, colorées à l'HP β S.	167

Liste des abréviations

ADN:	Acide déoxyribonucléique
AMP:	Ampicilline
ARN:	Acide ribonucléique
β-gal:	β-galactosidase (enzyme)
cm:	centimètre
cDNA:	complementary DNA (ADN complémentaire)
CMH:	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DAB:	Diaminobenzidine
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO:	Dimethyl sulphoxide
FITC:	Fluorescein isothiocyanate
g:	gramme
HPS:	Hématoxyline-Phloxine-Safran
i.m.:	intramusculaire
i.v.:	intraveineux
kb:	kilobases
LTR:	Long Terminal Repeat
MEM:	Modified Eagle's Medium
mm:	millimètre
mM:	millimolaire (unité de concentration)
μM:	micromolaire (unité de concentration)
MMTV:	Virus de tumeur mammaire murin
Mo-MLV:	Virus de leucémie murine Moloney
NEO:	Néomycine (antibiotique G418)
nm:	nanomètre
PBS:	Phosphate-Buffered Saline
p.i.:	post-injection
Rho 123:	Rhodamine 123
RMS:	Rhabdomyosarcome
SLN:	Signal de Localisation Nucléaire
SMEF:	Sarcome Myoblastique du rat Fischer
SVF:	Sérum de veau foetal
SVFi:	Sérum de veau foetal inactivé

T.P.: Température de la pièce
X-gal: 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

Remerciements

Je voudrais remercier le Dr. Luc Villeneuve qui a patiemment dirigé mes travaux de recherche, mon codirecteur, le Dr. Féridoun Babaï pour avoir partagé avec moi son expérience scientifique, et mon directeur de recherche, le Dr. Louis Gaboury pour m'avoir offert l'opportunité de travailler avec son équipe.

Je voudrais également remercier:

M. Denis Rodrigue, Mme Monique Vasseur, M.
Gaston Lambert, Mme Claudette Gemme du
Département de Pathologie,
Le Dr. Guy Lemay et M. Serge Sénéchal du
Département de Microbiologie et Immunologie.

et avec beaucoup d'affection:

Mme Antonia Balassy, Mme Valérie Tassé, Mme
Imola Matyas-Balassy, Mme Élise Donnedieu, Dre.
Louise Blanchard et Dr. Chengwen Ren.

Dédicace

Cette thèse est dédiée à la mémoire de ma mère bien-aimée
"Voor altijd in mijn hart zal je leven, om nooit te vergeten zijn"
et à mon père.

CHAPITRE 1: INTRODUCTION ET REVUE DE LA LITTÉRATURE

L'idée souvent exprimée que le cancer et sa manifestation létale, la métastase, représentent l'expression ultime d'un état d'anarchie cellulaire ne rend plus compte des découvertes des dernières décennies. Plusieurs travaux supportent maintenant la notion voulant que le processus de cancérisation comprenne une série d'étapes et que seules les cellules exprimant des capacités spécifiquement déterminées peuvent franchir chacune de ces étapes et former des métastases (revue par Poupon 1993, Kohn et Liotta 1995). Cliniquement, on peut détecter des métastases chez près de la moitié des patients lors du diagnostic; chez un autre vingt-cinq pour cent des patients, on estime que les métastases sont présentes mais non encore détectées au moment du diagnostic. Les sites les plus fréquents de métastases sont: le ganglion, le poumon, le foie, les os et le cerveau. C'est la dissémination métastatique des cellules tumorales, plutôt que la tumeur primaire, qui semble responsable de la majorité des décès dûs au cancer (Price et al. 1997). L'apparition de métastases est donc un obstacle important au traitement du cancers (Kohn et Liotta 1995).

1.1 - Cancérisation

1.1.1 - Néoplasie et tumeurs

Le terme néoplasie signifie littéralement "nouvelle croissance" et c'est cette nouvelle croissance qu'on désigne néoplasme (Robbins et Kumar 1987).

Presque tous les tissus du corps humain peuvent donner naissance à des néoplasmes (Janin 1994). La néoplasie se traduit par l'apparition de cellules anormales n'obéissant plus aux contrôles intra- et intercellulaires du cycle cellulaire, résultant en une prolifération cellulaire accrue et incontrôlée. Il y a deux composantes essentielles dans un néoplasme: un parenchyme composé de cellules néoplasiques en division et un stroma composé de tissu conjonctif et de vaisseaux sanguins de l'hôte (Robbins et Kumar 1987). Plusieurs caractéristiques permettent de distinguer les tumeurs bénignes des tumeurs malignes. Le degré de différenciation, la prolifération cellulaire anormale, l'invasion et la métastase (Robbins et Kumar 1987). L'anaplasie ou perte de différenciation est une caractéristique importante des néoplasmes malins. Le taux de croissance des cellules peut, en général, être corrélé avec le niveau de différenciation cellulaire; de façon générale, les tumeurs malignes croissent plus rapidement que les tumeurs bénignes (Robbins et Kumar 1987). Enfin, les tumeurs bénignes ont le plus souvent des limites ou bords bien nets, la masse pouvant même être entourée d'une capsule tandis que les tumeurs malignes possèdent des limites généralement irrégulières dues à l'invasion des tissus sains par les cellules malignes (Price et al. 1997).

Généralement, on retrouve dans le génome d'une cellule néoplasique une accumulation d'anomalies génétiques acquises. Une "dissection moléculaire" (Janin 1994) de ces anomalies a permis de conclure que le développement des néoplasmes implique des altérations de gènes-clés et notamment de ceux qui contrôlent la prolifération cellulaire. L'exemple le mieux caractérisé est le modèle de la néoplasie colorectale humaine (Fearon et Vogelstein 1990). Dans ce modèle, l'accumulation d'au moins 4

ou 5 altérations génétiques mène à la transformation cellulaire puis au développement d'une tumeur maligne (Fearon et Vogelstein 1990). Un des premiers changements observés dans les cellules d'adénomes colorectaux bénins est la perte du gène suppresseur de tumeur *FAP* (familial adenomatous polyposis). La perte de ce gène conduit à une hyperplasie cellulaire. Puis surviennent une mutation du gène *ras* et une perte subséquente d'un second gène suppresseur nommé *DCC* (deleted in colon carcinoma). La perte du gène *p53* accompagne vraisemblablement la transition de l'adénome au carcinome, puisque cette perte n'a pas été observée dans les adénomes. Une ou plusieurs autres altérations pourraient conduire à l'expression du phénotype métastatique. Il est à noter toutefois que l'ordre d'apparition des altérations génétiques dans ce modèle est variable et que les altérations constatées ne sont pas strictement limitées à une étape particulière de la progression tumorale du cancer colorectal (Fearon et Vogelstein 1990).

1.1.2 - Cancer

Le terme cancer désigne un groupe de lésions prolifératives malignes, comportant plus d'une centaine de variétés distinctes chez l'humain (revue par Janin 1994). Les facteurs biologiques les mieux étudiés à ce jour qui pourraient permettre aux cellules d'acquérir les propriétés d'invasion et de migration sont les protéases, les facteurs de croissance et les molécules d'adhérence intercellulaire (Thiery et Sastre-Garau 1995). Une meilleure compréhension de la physiologie de la cellule cancéreuse a permis aussi d'élucider certains aspects du contrôle de la division cellulaire. Non seulement faut-il prendre en compte la prolifération cellulaire, mais aussi

la mort cellulaire (apoptose) (revue par Hall et Lane 1994). Ainsi, l'apparition d'un cancer s'accompagne de perturbations des mécanismes régulateurs de la croissance et de la mort cellulaire programmée (Kahn 1995).

i - Nomenclature des gènes impliqués dans la néoplasie

Plusieurs types de gènes participent au développement des néoplasmes. Le groupe ayant reçu le plus d'attention est celui des oncogènes. Le préfixe "onco" provient de la racine grecque qui signifie "masse". Combiné au suffixe gène, le terme oncogène décrit une classe de gènes participant à la transformation cellulaire.

ii - Découverte des oncogènes

La découverte des oncogènes date du début du siècle et s'appuie sur les travaux de P. Rous sur l'étiologie virale du sarcome aviaire (revu par Jeanteur et al. 1990). Ce n'est qu'en 1976 que Stehelin et collaborateurs (Stehelin et al. 1976) ont montré que le virus qui induisait les sarcomes chez le poulet le faisait par intermédiaire d'un gène cellulaire normal appelé *src*. Cette découverte a permis de formuler deux concepts fondamentaux. Premièrement, qu'il existe dans le génome de toute cellule des précurseurs d'oncogènes appelés proto-oncogènes. Deuxièmement, que ces précurseurs peuvent, par un mécanisme d'activation, se transformer en oncogènes (Jeanteur et al. 1990). Par ailleurs, on sait aussi que les proto-oncogènes peuvent être activés par l'intégration d'un provirus à proximité de leur cadre de lecture (revu par Jeanteur et al. 1990,

Jonkers et Berns 1996). L'intégration du génome proviral entraîne l'activation transcriptionnelle d'un gène cellulaire normal situé à proximité du site d'intégration. Le processus d'activation d'un gène cellulaire par insertion d'un provirus se nomme activation insertionnelle et fut utilisé durant l'étape initiale de mes travaux de recherche.

Les oncogènes résultent de l'activation de gènes cellulaires normaux appelés proto-oncogènes. Ceux-ci représentent les précurseurs d'oncogènes et homologues des gènes viraux transformants. Les proto-oncogènes codent pour une large gamme de protéines capables d'activer la prolifération cellulaire (Birnbaum et de Lapeyrière 1990). Les oncogènes agissent comme des gènes dominants, puisque la mutation d'un seul des deux allèles est généralement suffisante pour dérégler la croissance cellulaire et conférer du coup un avantage prolifératif à la cellule affectée. La présence d'un allèle normal ne semble pas freiner cet effet.

À l'état normal, les proto-oncogènes sont impliqués dans les processus de la différenciation et de la division cellulaire et encodent des molécules ayant diverses fonctions dans la cellule: facteurs de croissance, récepteurs de facteurs de croissance, transducteurs de signaux, seconds messagers ou facteurs transcriptionnels (revu par Bellahcene et al. 1994, Steel 1994). Il existe en outre une seconde catégorie de gènes qui agissent cette fois comme freins à la prolifération cellulaire. On désigne ces gènes par le vocable "anti-oncogènes". Les gènes impliqués dans la néoplasie appartiennent donc à l'une des deux grandes classes de gènes régulateurs du processus de la division cellulaire, soit ceux qui, directement ou

indirectement, stimulent la prolifération (oncogènes), et ceux qui la répriment (gènes suppresseurs de tumeurs ou anti-oncogènes) quoique la distinction entre ces deux catégories n'est pas toujours valide (Steel 1994). Ces deux classes de gènes participent grâce à des mécanismes épigénétiques ou génétiques (mutations) à la progression tumorale. Les gènes suppresseurs de tumeurs encore appelés anti-oncogènes ont été découverts grâce aux travaux portant sur les cancers héréditaires notamment le rétinoblastome (Knudson 1971, 1985). Ce sont des gènes récessifs puisque le plus souvent les deux allèles doivent être mutés ou inactivés dans une même cellule pour que s'observe la prolifération cellulaire anormale. Ces gènes agissent donc normalement comme freins à la prolifération cellulaire, intervenant à des stades définis du cycle cellulaire. Enfin, en raison de l'importance du processus de la mort cellulaire programmée, une troisième classe de gènes, soit celle associée à l'apoptose (le terme adopté par Kerr et al. (1972) pour désigner la "mort cellulaire programmée") a été incluse dans la catégorie des gènes impliqués dans le cancer (Kahn 1995, Hall et Lane 1994). Certains gènes suppresseurs des tumeurs tels *p53* et *bcl-2* peuvent aussi participer à la régulation de la mort cellulaire programmée (revu par May et May 1995). Chez l'humain, une mutation germinale du gène *p53* prédispose l'individu atteint au développement d'une variété de néoplasies (Hall 1994).

iii - Gènes associés à la progression tumorale

Bien qu'il soit largement accepté que la majorité des tumeurs malignes dérive d'un progéniteur commun (monoclonale), une instabilité génétique et phénotypique s'installe graduellement durant le développement des néoplasmes, résultant en une population hétérogène de cellules tumorales (Thiery et Sastre-Garau 1995). La plupart des cancers progressent ainsi vers une plus grande indifférenciation au fur et à mesure que s'exerce la sélection des sous-clones les plus agressifs (métastatiques) (Robbins et Kumar 1987, Kerbel et al. 1988). L'instabilité caryotypique observées chez les cellules cancéreuses confirme le un rôle important du génome dans la progression tumorale et l'invasivité tumorale (revue par Jouanneau et al. 1995). De fait, le nombre élevé de mutations apparaissant dans les cellules malignes ne peut s'expliquer par le taux de mutations spontanées normalement observé dans les cellules somatiques (Reynolds et al. 1996). Si des changements génotypiques multiples sont requis pour le développement du phénotype cancéreux, alors il faut invoquer un phénomène d'instabilité génétique pour expliquer la progression des néoplasmes (revu par Cheng et Loeb 1993).

D'ailleurs, les patients affectés par des maladies provoquant une instabilité structurale des chromosomes tel le syndrome de Bloom, maladie héréditaire où la synthèse de l'ADN est altérée à cause d'une production abaissée de l'enzyme DNA ligase I, ou encore dans d'autres maladies impliquant des défauts dans la réparation de l'ADN tel le Xeroderma pigmentosum où les patients atteints sont hypersensibles aux effets

néfastes des rayonnements UV, présentent un taux de cancer plus élevé que dans la population générale. Ce dernier exemple souligne l'importance de la fidélité du processus de duplication de l'ADN pour la prévention des mutations associées au cancer (Cheng et Loeb 1993).

1.1.3 - Mécanismes d'activation des oncogènes

i - Mutation ponctuelle

La substitution d'un seul nucléotide entraînant le changement d'un acide aminé est une lésion souvent observée dans le génome humain. Par exemple, une mutation du proto-oncogène ras s'observe très fréquemment dans les cancers humains; le changement d'un seul nucléotide peut entraîner des modifications importantes dans la structure de la protéine et entraîner un changement profond de son activité (revue par DeVries et al. 1996).

ii - Amplification génique

Un gène amplifié se traduit par deux types d'altérations caryotypiques: La première, nommée HSR pour "homogeneously-staining region" ou région de coloration homogène, est visible sur le chromosome lors de l'examen du caryotype. La deuxième existe sous forme de multiples copies de petits fragments acentriques de chromosomes nommés "double-minutes" (DM). Ces marqueurs caryotypiques reflètent une augmentation du nombre de copies d'un gène. L'amplification génique entraîne souvent une augmentation des niveaux d'expression du gène concerné. Un

exemple bien connu est celui du gène *myc*. Une surexpression de la protéine s'observe dans un grand nombre de cancers humains tels les carcinomes bronchiques, utérins et mammaires (Knudson 1995).

iii - Translocation

On entend par translocation l'échange, souvent réciproque, de matériel génétique entre deux chromosomes. Plusieurs tumeurs sont caractérisées par des translocations spécifiques de ce type, notamment le lymphome de Burkitt qui juxtapose les régions codantes du gène *c-myc* situé sur le chromosome 8 et le promoteur de l'un ou l'autre des gènes des chaînes d'immunoglobulines des chromosomes 2, 14 ou 22. Si un proto-oncogène cellulaire se retrouve dans un nouvel emplacement sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur puissant, la transcription de ce gène peut en être fortement augmentée. Une translocation permet aussi d'activer un oncogène selon un autre mécanisme comme c'est le cas pour le chromosome de Philadelphie (t:9-22), un marqueur moléculaire de la leucémie myéloïde chronique. La translocation résulte en la juxtaposition de deux gènes (*c-abl* et *bcr*), et conduit à la formation d'une protéine hybride à partir de ce gène de fusion. Cette protéine possède une activité tyrosine kinase augmentée conférant ainsi un avantage prolifératif aux cellules porteuses de la translocation (Janin 1994).

1.1.4 - Phénomènes épigénétiques

Les phénomènes épigénétiques n'induisent pas d'altérations directes du génome, mais résultent plutôt en des modifications post-transcriptionnelle

des protéines impliquées dans l'une ou l'autre des voies de régulation du cycle cellulaire. On sait par exemple que les protéines transformantes de certains virus transformants peuvent perturber la fonction des protéines encodées par les gènes suppresseurs des tumeurs. En effet, ces protéines virales forment des complexes avec des protéines cellulaires et perturbent la physiologie du contrôle de la division: l'oncoprotéine-T de SV40, E1B d'adénovirus et E6 du virus de papillome humain inactivent la protéine de l'anti-oncogène *TP53* (*p53*); de même, la protéine E1A d'adénovirus forme des complexes inactivant la protéine hypo-phosphorylée et fonctionnelle de l'anti-oncogène *RBI*.

1.1.5 - Collaboration des gènes dans la cancérogenèse

Des études portant sur la capacité des oncogènes *ras* et *myc* à coopérer pour transformer les cellules normales ont montré que chacun de ces gènes agissait d'une façon distincte et complémentaire pour l'expression du phénotype transformé (Weinberg 1989). Ces distinctions dans la fonction des différents oncogènes suggèrent un rôle limité de chaque oncogène au sein du réseau de contrôles prolifératifs de la cellule (Weinberg 1989). Ce phénomène refléterait le rôle circonscrit des proto-oncogènes dans la régulation de la croissance cellulaire.

1.1.6 - Définition de la métastase

Le terme métastase a été introduit pour la première fois par Recamier en 1829 (cité par Tuszynski et al. 1997). La métastase se définit comme la dissémination, à distance d'un foyer tumoral primitif, de cellules

néoplasiques dont l'implantation et la prolifération conduisent au développement de foyers tumoraux secondaires autonomes. La métastase est un processus complexe comprenant une série d'étapes rigoureusement ordonnées. L'établissement d'un foyer métastatique requiert le plus souvent l'invasion cellulaire, le développement de nouveaux vaisseaux (l'angiogenèse) et la prolifération cellulaire tumorale au site secondaire (revu par Price et al. 1997). Un événement-clef du processus métastatique consiste en l'invasion des néo-vaisseaux et l'intravasation des cellules cancéreuses dans la circulation systémique. Toutefois il s'agit d'une étape nécessaire mais non suffisante puisque très peu des cellules tumorales circulantes forment des métastases (revu par Kohn et Liotta 1995).

1.1.7 - Patron de distribution des tumeurs métastatiques

Il y a plus d'une centaine d'années le chirurgien anglais Stephen Paget observa et publia que la formation de métastases ne se distribuait pas au hasard. La formation de métastases semblait plutôt la résultante des interactions spécifiques entre la cellule tumorale et le milieu propice à sa propagation; c'est la théorie du "seed and soil" proposée par Paget (1889). Au contraire, Ewing (1928) prétendait que la distribution des tumeurs métastatiques reflétait l'état de la circulation sanguine. Cette théorie mécanique de la métastase estimait que la cellule cancéreuse ne contribuait pas à sa propre dissémination mais qu'elle suivait plutôt passivement le flux sanguin vers les autres tissus. On croit maintenant que la capacité d'une cellule métastatique à coloniser un organe-cible plutôt qu'un autre résulte à la fois de signaux biochimiques et de facteurs mécaniques (Price et al. 1997). Ainsi, chaque tumeur serait hétérogène

quant à sa capacité à métastasier et à former des métastases (Fidler 1991). Par exemple, les cellules tumorales ayant gagné la circulation se laisseront entraîner passivement par le flux sanguin, un facteur important contribué par l'hôte. En effet, la plupart des métastases se développent dans le premier lit capillaire rencontré (Woodhouse et al. 1997). Mais il n'en demeure pas moins que l'environnement du premier organe cible rencontré par la cellule tumorale doit être favorable pour qu'il y ait apparition de métastases (Hart et al. 1981). Ces observations permettent de formuler trois mécanismes pour expliquer la distribution des métastases: le premier propose que les cellules tumorales peuvent extravaser de façon ubiquitaire mais qu'elles ne peuvent croître que dans le parenchyme d'un organe possédant par ailleurs des facteurs de croissance spécifiques; le deuxième propose l'adhésion sélective des cellules tumorales à l'endothélium de l'organe-cible et, enfin, le troisième mécanisme implique un chimiotactisme sélectif entre les cellules tumorales et l'organe sécrétant des facteurs chimiotactiques solubles (Woodhouse et al. 1997).

1.1.8 - Voies de dissémination des tumeurs solides

Il existe diversés voies de propagation des cellules cancéreuses. Quoique certains types tumoraux semblent emprunter de façon préférentielle la voie lymphatique plutôt que la voie hématogène, en réalité l'existence de nombreuses communications et anastomoses veinolympatiques permettent le passage direct des cellules néoplasiques de l'un à l'autre des réseaux (Fisher et Fisher 1966). Les carcinomes se disséminent au début surtout par voie lymphatique (Robbins et Kumar 1987) tandis que les

sarcomes ont tendance à le faire par voie hématogène (Underwood 1992). Malgré tout, les ganglions régionaux d'une tumeur primaire doivent généralement faire l'objet d'un examen détaillé lors de la résection chirurgicale. On estime, en effet, que les ganglions peuvent servir non seulement de barrières aux cellules tumorales mais aussi de réservoirs et donc représentent une cible thérapeutique potentiellement importante (Fidler 1991). Le concept de réservoir est controversé puisque pour certains types tumoraux notamment le cancer du sein, on ne démontre pas d'augmentation de survie des patients suite à la résection des ganglions axillaires qui présumément auraient hébergé des cellules métastatiques (Fidler 1991). Une troisième voie de dissémination fréquemment observée est la voie coelomique, propagation par laquelle les cellules de la tumeur primaire s'étendent à la surface des organes avoisinants (extension directe): ce mode de dissémination s'observe fréquemment dans les cavités pleurales, péritonéales et péricardiques (Robbins et Kumar 1987, Underwood 1992). Un exemple de ce type est celui du carcinome ovarien, où toute la surface du péritoine est recouverte de cellules tumorales sans que celles-ci n'envahissent profondément.

1.1.9 - Cascade métastatique des tumeurs solides

Cette section décrit les étapes de la métastase hématogène: celle-ci ressemble beaucoup au mode de dissémination lymphatique. Chaque étape de la cascade est assujettie à une multitude d'influences qui affectent la survie des cellules circulantes, et contribuent à l'inefficacité (toute relative) du processus métastatique (Robbins et Kumar 1987). Des études animales ont montré que malgré l'effraction quotidienne dans la

circulation de millions de cellules tumorales en provenance de la tumeur primaire, seulement quelques métastases pourront se développer, indiquant que seule une minorité de cellules tumorales peuvent compléter avec succès toutes les étapes du processus et échapper aux défenses immunitaires naturelles de l'hôte comme par exemple celles médiées par les cellules NK (natural killer) (Robbins et Kumar 1987).

Plusieurs types d'interactions interviennent entre les cellules tumorales et les cellules de l'hôte lors de l'invasion et de la métastase (Desplaces et Poupon 1994). Ces interactions se succèdent en "cascade", et les mécanismes impliqués pour chacune des étapes du processus commencent peu à peu à être élucidés (revu par Poupon 1995). Plusieurs des composantes de la cascade agissent à plus d'une étape du processus, comme par exemple les molécules d'adhésion et les enzymes protéolytiques (revu par Price et al. 1997, Tuszynski et al. 1997). Par analogie avec le processus de transformation néoplasique, une cellule cancéreuse semble bien devoir franchir toutes les étapes de la cascade pour donner naissance à des métastases (Effert et Strohmeyer 1995, Poupon 1995). De plus, tout comme pour les cellules infectées par les virus, la cellule tumorale exprime à sa surface des antigènes normalement absents chez la cellule saine (Ostankovitch et al. 1995). La cellule tumorale devra donc échapper aux mécanismes de défense naturelles immunologiques de l'hôte pour former une métastase.

i - Transformation maligne

L'événement initial du processus conduisant à la formation d'une tumeur métastatique est la transformation d'une cellule capable de se multiplier. Lors de la transformation cellulaire il y a acquisition par la cellule d'un ensemble de propriétés structurales et fonctionnelles caractéristiques des néoplasmes (revu par Monier 1995, Piedbois et Clauser 1995). Les altérations génétiques retrouvées dans une cellule transformée sont nombreuses. Les cellules transformées se distinguent des cellules non transformées à plusieurs égards notamment par leur indépendance envers les facteurs de croissance et la nature des interactions qu'elles établissent avec les autres cellules (Monier 1995). Une des étapes essentielles à la transformation cellulaire est l'immortalisation (Piedbois et Clauser 1995). Celle-ci se définit comme la capacité que possède une cellule à se multiplier de façon ininterrompue dans un environnement tissulaire permissif. Elle semble impliquer l'activité de la télomérase (revu par Monier 1995). L'expression de cette enzyme, normalement inhibée (sauf pour les cellules souches hématopoïétiques) après la naissance, est réactivée lors de l'immortalisation (revu par Piedbois et Clauser 1995) et éventuellement lors de la progression maligne. L'immortalisation s'accompagne aussi d'anomalies de la régulation de la croissance des cellules transformées. Celles-ci s'accompagnent de multiples modifications du génome, le plus souvent de nature mutationnelles survenant lors de la division cellulaire. La subversion de la fonction des oncogènes semble déterminante pour le processus de transformation.

ii - Angiogenèse I (néovascularisation)

La croissance tumorale ne peut se poursuivre que grâce au développement de nouveaux vaisseaux sanguins (revu par Hanahan et Folkman 1996, Zetter 1998). Une tumeur doit impérativement recevoir une alimentation vasculaire suffisante pour atteindre une masse tumorale de plus de quelques millimètres de diamètre (Gimbrone et al. 1972). Les tumeurs dont le diamètre est inférieur à 2 mm reçoivent les nutriments nécessaires à leur croissance par simple diffusion et peuvent même demeurer viables quoique quiescentes pendant plusieurs années (Holmgren 1996). En absence de nouveaux vaisseaux, certaines des cellules d'une tumeur peuvent se nécroser tandis que d'autres continuent à proliférer, le volume tumoral demeurant par ailleurs inchangé (Holmgren et al. 1995, Fox et al. 1997). L'activation des cellules quiescentes au sein d'une microtumeur semble directement reliée au déclenchement de l'angiogenèse ("angiogenic switch") (Holmgren 1996). En effet, les cellules normales semblent inhiber l'angiogenèse via, entre autres, l'action de la thrombospondine, protéine régulée par le gène *p53*. Il semble donc que l'angiogenèse régie par la thrombospondine pourrait jouer un rôle important durant la progression tumorale (Murray 1995).

L'activité angiogénique d'une tumeur est d'ailleurs présentement reconnue comme un marqueur pronostic très important dans plusieurs types de néoplasmes notamment le cancer mammaire (Weidner et al. 1992). Cette observation s'explique d'une part par le fait qu'un réseau vasculaire tumoral plus développé augmente les risques d'effraction des

cellules tumorales dans la circulation (Woodhouse et al. 1997) et de l'autre du fait que le risque de métastase est directement proportionnel au nombre de cellules présentes dans la circulation (Fidler et Ellis 1994). D'ailleurs, les cellules métastatiques ne peuvent être libérées de la tumeur primaire que si celle-ci est vascularisée (Folkman 1995). Des études récentes suggèrent que le modèle actuel du processus d'angiogenèse devait être révisée (Holash et al. 1999). En effet, des expériences utilisant plusieurs modèles tumoraux ont montré que des tumeurs dont la taille est inférieure à 1 mm de diamètre étaient bien vascularisées, indiquant que l'angiogenèse débute plus tôt qu'on l'estimait. De façon surprenante, les vaisseaux de ces tumeurs régressent pour donner des tumeurs non vascularisées, entraînant une perte significative du nombre de cellules tumorales jusqu'à ce que l'angiogenèse débute à nouveau aux bords de la tumeur (Holash et al. 1999).

iii - Invasion locale

Une étape importante du processus métastatique consiste en l'envahissement par les cellules cancéreuses des tissus avoisinants. L'invasion est une caractéristique essentielle des néoplasmes (Underwood 1992) et un prérequis indispensable à la formation des métastases. Les cellules tumorales doivent en effet franchir les espaces intercellulaires, traverser la barrière des cellules normales, et se frayer un chemin à travers les divers constituants de la membrane basale: laminine, collagène, glycoprotéines et protéoglycans (revu par Tuszynski et al. 1997). Lors de ce processus, il y a: 1. dissociation des cellules tumorales de la tumeur primaire par réduction des niveaux d'expression des molécules

d'adhésion; 2) augmentation de la synthèse et de la sécrétion d'enzymes lytiques; 3) migration subséquente des cellules tumorales dans l'espace extracellulaire (revu par Liotta et Stetler-Stevenson 1991).

Les étapes impliquées dans l'invasion du foie et des muscles striés par des tumeurs transplantables ont été soigneusement examinées à l'échelon ultrastructural; ces observations ont permis de clarifier le mode d'invasion tumoral *in vivo* (Babal et Tremblay 1972, Babal 1976). Ces études confirment notamment le rôle essentiel de l'extension des pseudopodes tumoraux dans l'invasion tumorale. Le processus débute par une infiltration active entre les cellules (invasion intercellulaire) puis à travers les cellules (invasion transcellulaire) par des pseudopodes tumoraux puis par les cellules tumorales entières. En plus de l'invasion intercellulaire et transcellulaire, une infiltration de la lame basale (invasion translaminaire) s'observe lorsque les cellules tumorales entrent en contact avec la lame basale entourant les myofibres ou les vaisseaux sanguins. La dissolution localisée de la lame basale suggère la libération d'enzymes lytiques au contact des cellules tumorales et la destruction éventuelle des fibres musculaires par les cellules tumorales (Babal 1976). Ainsi, trois étapes structurales de l'invasion des membranes basales ont pu être identifiées: 1) la phase du contact entre la surface des cellules tumorales et la lame basale; 2) la dissolution localisée de la lame basale au contact des cellules tumorales; et 3) l'infiltration par des pseudopodes tumoraux puis par des cellules entières de la lame basale (Babal 1976, Herrera-Gayol et al. 1995).

A - Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire, qui se compose des membranes basales et du stroma interstitiel, établit les limites entre les compartiments tissulaires et le parenchyme des organes (revu par Price et al. 1997). Les composantes structurales de la membrane basale sont les glycoprotéines (laminine, collagène, entactine, fibronectine et des protéoglycans); celles du stroma interstitiel sont les glycosaminoglycans, les glycoprotéines, les collagènes types I, II, III, V et XI ainsi que l'élastine (Price et al. 1997). Les molécules de la matrice extracellulaire forment une couche continue et imperméable, sauf lors de processus physiologiques strictement contrôlés tels la guérison de plaies et le remodelage tissulaire. Lors de la transition d'un carcinome *in situ* à un carcinome invasif les cellules tumorales pénètrent la membrane basale (Liotta et Stetler-Stevenson 1991). Contrairement aux carcinomes *in situ*, les carcinomes invasifs sont entourés d'une membrane basale incomplète adjacente aux cellules tumorales envahissantes (Liotta 1986). Les cellules tumorales semblent capables de modifier la structure de leur matrice extracellulaire de façon sélective et ainsi se disséminer (Price et al. 1997).

B - Molécules d'adhésion

L'adhésion est la première des trois étapes de la dynamique de l'invasion qui comprend le contact cellulaire, la dissolution de la matrice et la migration des cellules tumorales (Price et al. 1997). Cette étape critique dépend de la capacité de la cellule tumorale à interagir avec son

environnement. L'adhésion se produit via l'interaction des cellules tumorales entre elles, les cellules stromales et/ou les cellules endothéliales ainsi qu'avec le stroma interstitiel et la membrane basale (Price et al. 1997). Les interactions entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales influencent sur la distribution des métastases dans les organes cibles (Tang et Honn 1994-95). Les cellules tumorales, tout comme les cellules normales, expriment des molécules d'adhésion (CAM - "cell adhesion molecule" ou "calcium-dependent adhesion molecule") à leur surface. On a montré que les interactions entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales peuvent être bloquées avec des anticorps dirigés contre les CAM (Aoudjit et al. 1998). Les CAM sont impliquées tout au long du processus de la métastase (Tuszynski et al. 1997); elles comprennent au moins quatre familles: les intégrines, les cadhérines, les immunoglobulines (le gène DCC) et les sélectines (Tang et Honn 1994-95). Ces molécules permettent normalement l'adhésion intercellulaire mais suite à une perturbation des niveaux habituels d'expression de ces molécules à la surface des cellules tumorales, elles cessent d'exercer leur rôle physiologique. La cellule métastatique, une fois détachée de la tumeur d'origine, doit ensuite pouvoir s'attacher à la matrice extracellulaire, processus qui requiert cette fois-ci une élévation des niveaux de CAM (Robbins et Kumar 1987).

À cet égard, plusieurs molécules jouent un rôle primordial dans l'adhésion des cellules tumorales. Les intégrines, famille de récepteurs cellulaires exprimés sous forme d'hétérodimers $\alpha\beta$, sont les principales molécules impliquées dans les interactions entre les cellules tumorales et les composantes de la matrice extracellulaire (Price et al. 1997); leur

expression varie lors de la transformation de la cellule (Danen et al. 1993). De fait, durant le processus de formation de la métastase, plusieurs sous-types d'intégrines sont impliqués dans la régulation de l'adhésion des cellules tumorales (revu par Price et al. 1997). Les interactions de type intégrine-matrice extracellulaire font appel à la liaison de l'intégrine à une variété de ligands: collagène type IV, type I, laminine, tenascine, fibronectine, vitronectine, molécules d'adhésion, cadhérines et thrombospondine (Price et al. 1997). La liaison de l'intégrine à la matrice extracellulaire s'exerce par l'intermédiaire de la séquence peptidique "RGD" (pour les acides aminés Arg-Gly-Asp); des expériences d'inhibition compétitive avec des molécules synthétiques de RGD ont montré une diminution de la formation de métastases par les cellules du mélanome (Humphries et al. 1986). Le récepteur de la vitronectine (l'intégrine $\alpha_v\beta_3$) est aussi présent à la surface de cellules mobiles telles les cellules du mélanome malin et de quelques autres types cellulaires normaux (Tuszynski et al. 1997). Les intégrines peuvent également lier les protéines du cytosquelette et donc servir de pont entre la matrice et les éléments structuraux de la cellule (Schwartz 1993).

Chez les tumeurs agressives, on a observé une réduction importante des niveaux de la cadhérine-E, variété la mieux étudiée parmi les membres de la famille des glycoprotéines transmembranaires CAM (revue par Price et al. 1997). Chaque membre de cette famille participe à un type spécifique d'interaction. Ainsi, la cadhérine-E fonctionne comme molécule inhibitrice de la métastase dans plusieurs lignées cellulaires épithéliales (Price et al. 1997). La transfection du gène codant pour la cadhérine-E dans certaines cellules métastatiques s'accompagne d'une ré-expression de cette molécule

à la surface des cellules et de l'abrogation concomitante du phénotype métastatique; toutefois, cette observation n'est pas universelle (revue par Price et al. 1997). Il existe aussi d'autres types de CAM: N-CAM (tissus nerveux), P-CAM (tissus placentaires), V-CAM (cellules vasculaires) et I-CAM (cellules du système immunitaire). On estime que les molécules d'adhésion participent aussi à l'extravasation des cellules tumorales en favorisant leur attachement aux cellules endothéliales des vaisseaux et à la membrane basale (Hill 1992).

Enfin, on a rapporté l'existence de récepteurs ou molécules cellulaires impliqués dans la dissémination des cellules tumorales. L'expression de l'ostéopontine, une phosphoprotéine liant le calcium, participe à la progression tumorale et à la métastase tant dans des modèles animaux que dans le cas des tumeurs humaines (revu par Oates et al 1997). La hausse des niveaux d'expression du récepteur de la thrombospondine-1 s'accompagne d'une augmentation du potentiel métastatique des cellules tumorales (Tuszynski et al. 1997). Les sélectines, membres de la famille des immunoglobulines, prennent part aux interactions entre les leucocytes et les parois vasculaires (le phénomène du "homing" des leucocytes) et se retrouvent aussi à la surface cellulaire où elles favorisent l'agrégation des cellules tumorales entre elles et avec les plaquettes (Price et al. 1997). La molécule CD44 qui compte plusieurs isoformes, exerce un effet similaire grâce à son affinité pour l'ostéopontine (Gao et al. 1997), l'acide hyaluronique, la fibronectine, le collagène et la laminine de la membrane basale (Tuszynski et al. 1997). L'expression de la CD44v (v = variant) dans certains tissus semble reliée à la progression tumorale et au potentiel métastatique (Thomas 1993, Price et al. 1997), tandis que la CD44s (s =

standard) intervient dans le phénotype métastatique (Kogerman et al. 1997). Récemment on a suggéré que la CD44 agissait comme gène suppresseur de la métastase dans le cancer de la prostate (Gao et al. 1997).

C - Enzymes protéolytiques

Les processus d'invasion et de la métastase tumorales entraînent un remodelage de la matrice extracellulaire (Jones et Walker 1997). Puisque la lyse cellulaire est au coeur du processus, les cellules tumorales doivent synthétiser toute une gamme d'enzymes lytiques particulièrement adaptées à la digestion de ces barrières (revu par Jones et Walker 1997, Price et al. 1997 et Remy 1997). Un grand nombre d'études indiquent que les sérines protéases et les métalloprotéinases matricielles sont les enzymes les plus souvent impliquées dans ce phénomène (revu par Alessandro et Kohn 1995). Dans la classe des sérine protéases, les activateurs du plasminogène se retrouvent à des niveaux plus élevés chez les patients avec cancers gynécologiques; leur expression est aussi augmentée dans les cancers primaires du poumon et du sein (Kohn 1993).

Des études *in vitro* impliquant plusieurs types de cancers ont confirmé le rôle essentiel des métalloprotéinases matricielles (MMPs) dans le cancer (Jones et Walker 1997). Les MMPs constituent une famille d'enzymes impliquées dans le processus de métastase; on observe une sur-expression de ces enzymes dans plusieurs types de cancers. Généralement ces molécules, dont on compte présentement 17 membres, sont sécrétées sous forme d'un précurseur inactif lequel est activé par l'acidité du milieu ambiant et l'action d'autres protéases (Jones et Walker 1997, Hill 1992).

Suite à l'adhésion des cellules tumorales aux constituants de la membrane basale (fibronectine, vitronectine ou collagène type IV), la production d'enzymes lytiques par les cellules tumorales ou par les cellules avoisinantes stimule la dégradation de la membrane basale et l'invasion subséquente par les cellules tumorales. Certaines études suggèrent que, dans la majorité des cas, ces enzymes sont synthétisées par les cellules du stroma périvasculaire, impliquant une coopération entre les cellules tumorales et le micro-environnement stromal (Jones et Walker 1997). Une des enzymes les mieux caractérisées est la collagénase de type IV (qui digère le collagène de type IV, un composant majeur des membranes basales). Cette enzyme appartient à la famille des MMP matricielles (revue par Chambers et Matrisian 1997). Il existe trois sous-groupes majeurs des MMPs: 1) les collagénases qui dégradent le collagène fibrillaire; 2) les stromelysines; 3) les gélatinases. L'activité des MMPs est étroitement contrôlée et ce, à plusieurs niveaux. Tout d'abord, l'ARN messager de la plupart des membres de la famille des MMPs subit un contrôle transcriptionnel par plusieurs agents biologiques (facteurs de croissance, hormones, oncogènes). De plus, ce contrôle s'étend à la stabilité de l'ARN messager, à sa traduction et à son stockage dans les granules sécrétoires (Chambers et Matrisian 1997). Signalons enfin que l'enzyme qui permet aux cellules tumorales de dégrader les membranes basales synthétiques (Matrigel) est le MMP (MMP-2) comme des expériences de transfection ont pu le démontrer (Deryugina et al. 1997).

On a identifié beaucoup d'autres enzymes impliquées dans les processus d'invasion et de métastase (revu par Poupon 1995): notamment les inhibiteurs naturels des enzymes lytiques encore appelés TIMPs "tissue

inhibitors of metalloproteinases" ou inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases. Les niveaux de ces molécules s'ajustent suite au déversement d'enzymes lytiques dans le microenvironnement tumoral (Effert et Strohmeyer 1995). L'activité nette protéolytique semble bien être la résultante entre la production et l'activation de protéases, et la disponibilité des inhibiteurs endogènes (Price et al. 1997). De fait, la lyse de la matrice extracellulaire se produit dans une région très localisée contiguë à la surface cellulaire des cellules tumorales (Brown et al. 1990), là où les niveaux d'enzymes lytiques excèdent ceux des inhibiteurs. Les TIMPs appartiennent à quatre sous-groupes, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4 (revu par Remy 1997, Woodhouse et al. 1997). Il a été démontré que la molécule TIMP-1 forme des complexes ayant le pouvoir d'inactiver le fonctionnement de la collagénase interstitielle, tandis que TIMP-2 est capable d'inhiber la collagénase type IV nécessaire à l'invasion et même à l'angiogenèse, ce qui pourrait en faire un outil anti-métastatique puissant (Kohn 1993). Contrairement aux TIMP-1 et TIMP-2 qui sont sécrétés, TIMP-3 est associé à la matrice extracellulaire (Remy 1997, Woodhouse et al. 1997). TIMP-4 est le membre le plus récemment cloné chez l'humain; il est localisé sur le chromosome 3 à proximité du locus pour la cardiomyopathie dilatée (Olson et al. 1998). Bien que TIMP-4 est hautement exprimé dans le coeur humain, jusqu'à présent des mutations dans la région codante du gène TIMP-4 n'ont pas été observées chez les patients souffrant de cette maladie du coeur. TIMP-4 a pour particularité d'inhiber l'activité protéolytique des gélatinases A et B; pour sa part, son expression est diminuée dans les cancers du sein (Remy 1997). En général, l'expression réduite des TIMPs stimule l'invasion et la métastase pour de nombreux types de néoplasmes (Remy 1997).

D - Motilité cellulaire

La motilité cellulaire ou locomotion permet la migration des cellules tumorales, la troisième étape de l'invasion. Selon certaines études, plusieurs types de cellules transformées cessent de se mouvoir au contact des cellules avoisinantes. De plus, on a démontré qu'en général, les cellules fortement métastatiques migrent plus rapidement que les cellules faiblement métastatiques (revu par Turley 1992). Des expériences de transfection suggèrent que la métastase peut être supprimée dans certaines conditions par inhibition de la motilité cellulaire (You et al. 1995), démontrant par là le rôle essentiel de la locomotion dans la métastase. Une des manifestations précoces du phénomène de locomotion est l'extension, par les cellules tumorales, de pseudopodes. Dans une étude expérimentale et ultrastructurale (Babal et Tremblay 1972), pour la première fois, le rôle initial de l'extension des pseudopodes des cellules tumorales dans la mobilité invasive par les cellules cancéreuses a été démontré. Ce processus fait intervenir la mobilisation coordonnée d'éléments du cytosquelette et du versant interne de la membrane cellulaire (Liotta et Stetler-Stevenson 1991, Turley 1992). Par ailleurs, la motilité semble liée étroitement aux annexines, classe de protéines également associée au cytosquelette et dont la sur-expression facilite la métastase (Yeatman et al. 1993).

À ce jour on a identifié trois types de molécules impliquées dans la motilité: le premier groupe comprend des facteurs stimulant la motilité et l'invasion des cellules cancéreuses comme le facteur de motilité autocrine;

le deuxième groupe comprend des facteurs qui stimulent à la fois la prolifération et la motilité cellulaire comme le facteur de croissance hépatique (HGF, revu par Matsumoto et al. 1995), le facteur de croissance épithéliale (EGF), les interleukines-1, 3 et 6; enfin, le dernier groupe comprend des facteurs stimulant la motilité mais inhibant la croissance tels que les interférons et le facteur de croissance transformant (TGF) (revu par Jiang et al. 1994). Des facteurs de l'hôte interviennent également dans le phénomène de motilité accrue des cellules tumorales. Les interactions entre les cellules tumorales et les intégrines de la matrice extracellulaires participent aux étapes de la motilité cellulaire (revu par Matsumoto et al. 1995). La laminine, la fibronectine et la thrombospondine peuvent stimuler la migration de cellules de mélanome (revu par Hart et al. 1989). En participant à la régulation de l'interaction entre la vitronectine et le récepteur de l'urokinase (uPAR, une protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire), la plasmine et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène contribuent eux aussi à la motilité cellulaire (revu par Waltz et al. 1997).

Le facteur de motilité autocrine (AMF pour "autocrine motility factor"); isolé d'une lignée cellulaire de mélanome humain (Liotta et al. 1986b), est un des plus puissants facteurs identifiés capable de stimuler la motilité des cellules transformées (revu par Hart et al. 1989, Jiang et al. 1994) et leur capacité de colonisation pulmonaire (Nabi et al. 1992). La liaison de l'AMF à son récepteur (AMF-R, isolé par Nabi et al. 1990) induit l'internalisation du récepteur, stimulant ainsi la protrusion de pseudopodes et la motilité cellulaire (Nabi et al. 1992). L'expression du récepteur de l'AMF est considérée comme un marqueur pronostic dans les cancers de la vessie et du côlon chez l'homme (Simard et Nabi, 1996). Un

autre facteur de motilité autocrine isolé d'une lignée cellulaire de mélanome humain, l'autotaxine, est produit par une variété de cellules cancéreuses et provoque une réponse locomotrice chez des cellules tumorales humaines (Lee et al. 1996). L'autotaxine possède des activités enzymatiques modifiées par un traitement avec la toxine de pertussis. Ceci indique qu'une protéine G participe à la transduction du signal de la molécule (Lee et al. 1996). Le facteur de croissance hépatique (HGF), également connu sous le nom de "scatter factor", est un puissant stimulateur de la synthèse de l'ADN dans les hépatocytes (revu par Jiang et al. 1994). Mais il stimule aussi la motilité de types cellulaires munis d'un récepteur pour cette molécule.

iv - Rôle des néovaisseaux

Le système circulatoire se compose d'un réseau vasculaire sanguin et lymphatique (Wheater et al. 1979). Il est tapissé d'un revêtement interne fait d'une couche simple de cellules pavimenteuses minces appelée endothélium, le tout supporté par une membrane basale et par du tissu conjonctif (Wheater et al. 1979). L'échange des gaz, liquides, nutriments et déchets métaboliques se déroule essentiellement au travers des capillaires du réseau circulatoire. La structure des capillaires varie selon le site fonctionnel du tissu impliqué. Lorsque les cellules endothéliales forment une couche ininterrompue, les capillaires sont qualifiés de continus; ceci représente le type rencontré dans la majorité des tissus incluant les poumons (Wheater et al. 1979). En revanche, si le capillaire est muni d'espaces, ou pores, entre les cellules endothéliales, le capillaire appartient au type fenestré, comme on en retrouve par exemple dans le rein et

l'intestin. Ces deux derniers types de capillaires sont supportés par une membrane basale continue tout au long des fenestrations. Quand aux capillaires de type discontinu retrouvés dans les sinusoides du foie, notons que les cellules endothéliales ne forment pas d'interface continue entre la lumière et les tissus entourant les capillaires et qu'il n'y a pas, par conséquent, de membrane basale continue (Wheater et al. 1979). Il est maintenant établi que les capillaires nouvellement-formés dans les tumeurs malignes sont particulièrement accessibles aux cellules tumorales en raison de leur membrane basale discontinue et des fenestrations élargies qu'on y retrouve (Weidner et al. 1992). Il n'y a donc rien d'étonnant au fait que la présence à l'intérieur d'une tumeur primaire de nombreux néovaisseaux soit considérée un facteur pronostique pour le développement de métastases chez les patients (revu par Hollingworth et al. 1995).

v - Intravasation

L'intravasation peut se définir comme le processus par lequel les cellules tumorales quittent leur tissu d'origine pour pénétrer la circulation. Après leur détachement de la tumeur, les cellules doivent franchir les barrières anatomiques de l'hôte, notamment la membrane basale des vaisseaux, et pouvoir survivre dans la circulation. Pour ce faire, les cellules tumorales doivent synthétiser des enzymes lytiques (décrites plus haut) ou en induire la synthèse par d'autres types cellulaires de l'hôte afin de pouvoir dégrader le collagène de la matrice extracellulaire et de la membrane basale (revu par Chambers et Matrisian 1997). On sait aussi que l'intravasation des cellules tumorales peut être facilitée par des défauts

structuraux de la paroi des vaisseaux sanguins nouvellement formés et retrouvés à l'intérieur de tumeurs primaires (Effert et Strohmeyer 1995).

A - Interactions cellulaires

L'agrégation des cellules tumorales entre elles (interactions homotypiques), ou avec d'autres types cellulaires tels les plaquettes de l'hôte, les cellules endothéliales, les cellules du stroma et de la matrice extracellulaire (interactions hétérotypiques) survient lors de la métastase; on sait aussi que les cellules cancéreuses peuvent induire les plaquettes à sécréter des enzymes lytiques (Effert et Strohmeyer 1995). Une interaction intercellulaire très importante lors du processus métastatique est celle existant entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales (Hanahan et Folkman 1996). Les cellules endothéliales une fois stimulées, élaborent le facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF) lequel contribue à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins tumoraux (néovascularisation tumorale - revu par Hanahan et Folkman 1996). Un autre facteur impliqué dans les processus d'angiogenèse et de croissance tumorale est le facteur de perméabilité vasculaire (vascular permeability factor, VPF) aussi connu sous le nom de facteur de croissance des cellules endothéliales (vascular endothelial growth factor, VEGF). Ce facteur est un mitogène dont l'action s'exerce spécifiquement sur la perméabilité des microvaisseaux (revu par Fox et al. 1997). Le VEGF serait à l'origine de la perméabilité accrue des vaisseaux tumoraux et du passage des cellules tumorales dans la circulation (Dvorak et al. 1991). Enfin, il existe des évidences démontrant que les plaquettes peuvent transporter le VEGF, ce

qui suggère un rôle auxiliaire des plaquettes dans l'angiogenèse tumorale (Verheul et al. 1997).

B - Survie des cellules néoplasiques dans la circulation

Durant la période de la dissémination tumorale par voies hématogène et lymphatique, les cellules tumorales doivent pouvoir survivre dans un environnement hostile pour pouvoir éventuellement former des métastases. La capacité qu'ont les cellules tumorales à subir des déformations dans les capillaires, à former des agrégats (appelé embolies) avec les plaquettes, et à contrer les défenses de l'hôte (lymphocytes CD8+, macrophages et cellules NK) favorise la survie des cellules tumorales dans la circulation et augmente le risque de développement des métastases (Fidler 1991). Un plus grand nombre de cellules tumorales relâchées par la tumeur primaire favorise d'autant plus la formation de métastases puisque durant ce processus de sélection, la vaste majorité de cellules mourront dans le sang (Gutman et Fidler 1995).

C - Arrêt et adhérence à l'endothélium

Les cellules tumorales qui ont survécu dans la circulation doivent s'arrêter dans les microvaisseaux, une étape capitale de la métastase hématogène. Deux mécanismes (revu par Weiss 1994-95) ont été proposés pour expliquer l'arrêt des cellules: l'un implique les molécules d'adhésion, l'autre une interaction plutôt mécanique entre les cellules et les surfaces vasculaires. Des études d'autopsies humaines suggèrent que l'étape d'arrêt cellulaire n'est pas un facteur déterminant pour expliquer la

préférence des cellules tumorales quant à l'organe cible; donc, selon Weiss, les molécules d'adhésion interviennent à une étape ultérieure du processus métastatique, soit celle de l'adhérence (Weiss 1994-95). L'adhérence des cellules tumorales à l'endothélium vasculaire est une des étapes principales de la colonisation de l'organe cible lors de la dissémination hématogène (revu par El-Sabban et Pauli 1994-95). Avant de pouvoir sortir de la circulation, la cellule cancéreuse doit donc interagir spécifiquement avec l'endothélium vasculaire.

Les hypothèses actuelles concernant les systèmes fonctionnels impliqués dans l'arrêt et l'adhérence des cellules cancéreuses reposent sur les connaissances du processus d'extravasation des leucocytes (revu par Thiery et Sastre-Garau 1995). Ce processus fait intervenir l'expression à la surface cellulaire des leucocytes de la L-sélectine, qui permet la liaison des leucocytes aux cellules endothéliales. Ce contact quoique transitoire est suivi d'un deuxième contact médié cette fois par une intégrine et son ligand (différentes intégrines selon le type de leucocyte). Cette dernière interaction adhésive provoque l'arrêt de la cellule, puis son passage entre deux cellules endothéliales puis son contact avec la matrice extracellulaire vasculaire (Thiery et Sastre-Garau 1995). Quand aux cellules cancéreuses, elles emploient diverses molécules d'adhésion pour s'attacher aux cellules endothéliales des organes cibles, incluant les CAM exprimées par les cellules tumorales ou les cellules endothéliales (revu par Honn et Tang 1992). Elles expriment des motifs à leur surface cellulaire qui peuvent être reconnus par la P- ou la E-sélectine des cellules endothéliales. Les cellules cancéreuses expriment d'autres molécules adhésives incluant des intégrines, responsables du processus tardif d'adhésion avec les cellules

endothéliales. Cette interaction détermine vraisemblablement la spécificité de l'adhésion entre la cellule cancéreuse et la cellule endothéliale, et donc la préférence quand à l'organe cible de la métastase (Honn et Tang 1992).

vi - Extravasation

Les cellules qui parviennent à survivre dans l'environnement hostile de la circulation et qui adhèrent avec succès aux cellules endothéliales doivent ensuite pénétrer dans le parenchyme d'un organe cible pour donner naissance à des foyers secondaires. Ce processus s'appelle extravasation. En plus d'impliquer la mobilité de la cellule métastatique, il fait intervenir encore une fois les enzymes protéolytiques qui dégradent la matrice extracellulaire et/ou les membranes basales qui agissent comme barrières physiques aux cellules potentiellement métastatiques. Les cellules tumorales quittent la circulation en induisant la rétraction des cellules endothéliales, et parfois les endommagent (Honn et Tang 1992). La cellule devra d'abord s'extravaser puis pénétrer dans le parenchyme de l'organe. La colonie métastatique devra enfin recevoir un apport vasculaire pour croître (revu par Hanahan et Folkman 1996) et recommencer le cycle de la formation de métastases.

vii - Prolifération des cellules métastatiques

Connu également sous le nom de "colonisation", cette dernière étape du processus métastatique consiste en une prolifération des cellules ayant franchi avec succès toutes les étapes précédentes. Un échec à l'une ou

l'autre de celles-ci freine le processus métastatique (Fidler 1991). Des travaux récents (revu par Chambers et Matrisian 1997) suggèrent que la contribution des enzymes de la famille des métalloprotéinases aux processus de la métastase intervient à l'étape de la régulation de la croissance cellulaire post-extravasation. Une fois établies, les métastases se dotent d'une vascularisation suffisante (angiogénèse, section viii, ci-dessous), prélude à la formation d'autres foyers métastatiques.

viii - Angiogenèse II

L'étape de la prolifération cellulaire tumorale dans un foyer secondaire représente le début véritable de la métastase. Tout comme pour la tumeur originale, la micrométastase doit, à une étape précoce de son développement, se vasculariser afin de pouvoir croître et dépasser la taille de quelques millimètres de diamètre qu'impose la limite de diffusion des nutriments. On a proposé que quelques cellules seulement de la micrométastase pourraient induire l'angiogénèse suite à des événements génétiques et/ou épigénétiques et que c'est la prolifération de ces cellules qui permettrait au foyer secondaire de s'accroître (Holmgren et al. 1995).

1.1.10 - Cinétique des cellules tumorales circulantes

Comme nous l'avons souligné plus tôt, la métastase est un processus complexe comprenant plusieurs étapes inter-reliées. Les travaux de Fidler indiquent que la plupart des cellules tumorales qui parviennent dans la circulation n'y survivent pas (Fidler 1991). Le pourcentage de cellules tumorales circulantes qui pourrait à former des métastases ne dépasse pas

0.01% (revu par Liotta et Stetler-Stevenson 1991). Si l'on connaît les étapes conduisant à la formation des métastases, en revanche, la cinétique d'apparition et de disparition des cellules métastatiques dans les organes et tissus est très mal connue (Koop et al. 1995). Les modèles expérimentaux traditionnels (métastase spontanée ou induite) fournissent très peu de renseignements concernant la cinétique d'apparition des métastases entre le moment de l'injection et le décompte des métastases dans le tissu cible (Chambers et al. 1995). Chambers et collaborateurs ont récemment publié les résultats de travaux utilisant une nouvelle technique de vidéomicroscopie *in vivo* (intravital videomicroscopy ou IVVM - Chambers et al. 1995, Koop et al. 1995). Celle-ci permet l'observation des cellules tumorales en mouvement à l'aide d'une caméra vidéo reliée à un microscope.

Les observations recueillies par la technique IVVM suggèrent que les cellules tumorales achèvent l'étape d'extravasation sans endommager la microcirculation, et que les cellules à faible potentiel métastatique peuvent extravaser aussi bien que les cellules hautement métastatique *in vivo* (Chambers et al. 1995). Ces travaux suggèrent que les cellules à potentiel métastatique variable se distinguent davantage par leur habileté à proliférer localement qu'à traverser la paroi des vaisseaux (Chambers et al. 1995). Il est à signaler que les travaux initiaux de Fidler employaient des cellules de mélanome de souris B16, une population hétérogène, tandis que les études plus récentes de IVVM employaient des cellules B16F10, une lignée sélectionnée pour son potentiel accrue à coloniser les poumons pour donner des métastases comparativement à la population initiale de cellules B16 (Fidler 1990). Les cellules B16F10 ont été obtenues en injectant

des cellules B16 à des souris, et puis en récoltant les cellules ayant formé des métastases pulmonaires (Fidler 1990). Cette opération fut répétée 10 fois.

1.1.11 - Gènes associés à la métastase

L'acquisition du phénotype transformé est un processus évolutif impliquant des changements fonctionnels, soit du type perte de fonction ou soit du type gain de fonction (Price et al. 1997). Quoiqu'il n'ait pas été possible à ce jour d'identifier les gènes impliqués dans l'acquisition et le maintien du phénotype métastatique (Thiery et Sastre-Galau 1995), des progrès dans la caractérisation moléculaire de l'invasion et la métastase ont permis l'identification de gènes ou de produits de gènes dont la perte (sous-expression) ou le gain (sur-expression) peuvent affecter le potentiel métastatique (Price et al. 1997). Les gains de fonction peuvent être analysés grâce aux techniques de transfection dans lesquelles le gène candidat est transfecté dans des cellules normales. Parmi ces gènes, on retrouve l'oncogène *ras* activé, qui est capable d'induire les phénotypes tumorigènes et métastatiques lorsque transfecté dans les fibroblastes embryonnaires de rats immortalisés (Pozzatti et al. 1986), et le gène codant pour la matrilysine (Wilson et al. 1997), une métalloprotéinase dont la sur-expression induit le phénotype métastatique. Plusieurs autres gènes appartenant à cette catégorie ont été identifiés: *pLM59*, *pGM21*, *transine* et *mts 1*.

Dans un second type d'altération, c'est le défaut d'expression du gène qui se traduit par un potentiel invasif et métastatique accru (revu par Price et al. 1997) Dans ce cas, le remplacement du gène absent, (tel que réalisé pour

les gènes *nm23* et E-cadhérine), conduit à en une abrogation du phénotype invasif (revu par Price et al. 1997). D'autres exemples de ce type de gènes figurent dans le Tableau 1.

Plusieurs des gènes associés à la métastase ont été identifiés par la technique d'hybridation différentielle de bibliothèques de cDNA (revue par Hart et Easty 1991). L'objectif de ce type d'étude est de détecter des clones de cDNA correspondant à des ARN messagers exprimés de façon différentielle dans des populations de cellules à potentiel métastatique variable. La sensibilité de cette technique est grandement améliorée par une étape préalable d'hybridation soustractive permettant d'atteindre des niveaux de détection allant jusqu'à 0.001% de l'ARN (Hart et Easty 1991). Les gènes identifiés par ces techniques (*pLM59*, *pGM21*, *transine*, *mts 1* *WDNM1* et 2 et *nm23*) figurent au Tableau 1.

Le gène *nm23* fut isolé par hybridation différentielle de lignées cellulaires de mélanome de souris (K-1735, Steeg et al. 1988). L'ARN messager du gène *nm23* est exprimé en plus grande quantité dans les cellules à faible potentiel métastatique suggérant que la perte de l'expression de ce gène est associée au développement des métastases. Des études portant sur le carcinome mammaire humain ont montré que la perte de *nm23* était associée à la présence de métastase ganglionnaire (Bevilacqua et al. 1989). De plus, des expériences de transfection du gène *nm23* ont montré une diminution de la tumorigénicité, une abrogation du potentiel métastatique et une inhibition de la motilité et de la colonisation cellulaire pour différents types de cellules néoplasiques murines et humaines (Leone et al. 1991, Kantor et al. 1993, MacDonald et al. 1995, Gunduz et al. 1997).

Toutefois, la relation entre l'expression de *nm23* et l'inhibition de la métastase ne semble pas absolue comme l'ont montré les études des lignées cellulaires clonales du mélanome de souris, du carcinome rénal humain et du carcinome colique humain (Radinsky et al. 1992). En effet, ces études n'ont pas montré d'association ferme entre les niveaux d'expression de *nm23* et le potentiel métastatique pour ces trois modèles tumoraux. Une étude entreprise par Myeroff et Markowitz (1993) a démontré que l'augmentation des niveaux d'expression de l'ARNm de *nm23* (*nm23-H1*) était comparable pour les tumeurs coliques fortement ou faiblement métastatiques. De plus, les auteurs ont conclu que malgré l'observation de délétions du gène *nm23-H1* dans quelques tumeurs coliques à mauvais pronostic, ce gène ne semble pas devoir fonctionner comme suppresseur de la métastase dans ce modèle (Myeroff et Markowitz 1993).

TABLEAU 1: Gènes associés à la métastase

Gène ou Clone	Modèle utilisé	Altération d'expression	Fonction connue ou postulée
<i>ras</i>	Cellules embryonnaires de rat	Sur-expression	Inducteur de métastase
Matrilysine	Carcinome de côlon	Sur-expression	Inducteur de métastase
<i>pLM59</i>	Tumeurs colorectales	Sur-expression	Oncogène ?
<i>pGM21</i>	Adénocarcinome de rat	Sur-expression	Oncogène ?
Transin	Carcinome épidermoïde murin	Sur-expression	Code pour un métalloprotéinase
<i>mts 1</i>	Carcinome mammaire murin	Sur-expression	Inducteur de motilité/métastase
E-cadhérine	Carcinome ovarien	Sous-expression	Gène-suppresseur d'invasion?
<i>DCC</i> ¹	Carcinome du côlon humain	Sous-expression	Gène-suppresseur de métastase?
<i>TIMP-2</i> ²	Mélanome humain	Sous-expression	Gène-suppresseur de métastase?
<i>WDM1</i>	Adénocarcinome mammaire rat	Sous-expression	Gène-suppresseur de métastase?
<i>WDM2</i>	Adénocarcinome mammaire rat	Sous-expression	Gène-suppresseur de métastase?
<i>nm23</i>	Mélanome murin K-1735	Sous-expression	Gène-suppresseur de métastase?
<i>APC</i> ³	Carcinome du côlon humain	Sous-expression	Gène-suppresseur de métastase?

1: *DCC* = deleted in colon carcinoma. (Thiery et Sastre-Galau 1995).

2: *TIMP* = tissue inhibitor of metalloproteinase

3: *APC* = adenomatous polyposis coli

Tableau 1: Liste des gènes identifiés par la technique d'hybridation différentielle (résumé par Hart et Easty 1991) ou de ceux dont des anomalies d'expression sont reliés au développement de la métastase (revu par Price et al. 1997). Tous ces gènes sont soit sur- ou sous-exprimés dans les métastases. Les points d'interrogation représentent des fonctions suspectées mais non encore prouvées (à l'exception du gène *APC*).

1.2 - Mutagenèse rétrovirale

1.2.1 - Rétrovirus

C'est Rous qui a démontré en 1911 qu'un sarcome spontané de poulet pouvait se transmettre d'un animal à l'autre par injection de cellules de la tumeur originale. Quoiqu'il fut difficile au début de transplanter avec succès les tumeurs, à chaque passage successif les tumeurs induites croissaient plus rapidement et formaient des métastases à un plus grand nombre de sites (revue par Laughlin et Pomerantz 1994) Finalement, on montra qu'un filtrat acellulaire de la tumeur était suffisant pour induire la formation de tumeurs. On montra plus tard que l'agent ultrafiltrable était le rétrovirus transformant RSV (ou Rous Sarcoma Virus) et que le pouvoir transformant résidait dans une courte séquence nucléotidique (*src*) présente dans le génome viral. L'hypothèse d'une étiologie virale des tumeurs remonte donc aux travaux amorcés au début du siècle par Peyton Rous. Toutefois, c'est le clonage moléculaire des séquences transformantes dans le génome des rétrovirus transformants aigus qui allaient permettre de mieux définir le concept d'oncogène viral et de proto-oncogène. Parallèlement, d'autres travaux ont permis d'expliquer la formation des tumeurs chez l'animal par d'autres mécanismes que la transduction rétrovirale. Par ailleurs, en 1983 on démontra que la protéine oncogénique du virus du sarcome simien (v-sis) présentait une identité de structure avec la chaîne β du PDGF (platelet-derived growth factor), facteur de croissance dérivé des plaquettes. Le virus avait capturé le gène

du PDGF permettant à ce dernier d'agir comme oncogène dans les cellules infectées (Waterfield et al. 1983, Doolittle et al. 1983).

Les rétrovirus ainsi appelé en raison de leur habileté de "rétro-transcrire" leur génomes sont des virus dont le génome est fait d'ARN. La réplication du virus dans la cellule infectée repose sur la copie de l'ARN viral en ADN double-brin et l'intégration du provirus dans la cellule cible (revu par Laughlin et Pomerantz 1994, Marin et al. 1994). Ce processus se déroule en deux étapes. Durant la première, le génome viral d'ARN est copié en ADN têt après l'entrée du virus dans la cellule. Cette étape nécessite l'activité de l'enzyme virale transcriptase inverse (revu par Jonkers et Berns 1996). Dans la deuxième étape, l'ADN viral est transporté dans le noyau de la cellule où il s'intègre sous forme de provirus dans le génome de la cellule (Jonkers et Berns 1996). Les gènes rétroviraux deviennent alors un élément permanent du génome de la cellule infectée et par conséquent, le génome de la cellule s'en trouve modifié. L'étape d'intégration est catalysée par l'intégrase virale. Quoique largement mais non complètement aléatoire (Marin et al. 1994), l'intégration du provirus demeure très stable, lui permettant d'être copié et transmis aux cellules filles à la façon d'un gène cellulaire normal (Jonkers et Berns 1996). Les gènes rétroviraux s'intègrent donc de façon permanente dans le génome de la cellule infectée. Le comportement des cellules infectées est déterminé conjointement par le niveau d'expression des gènes proviraux et des gènes cellulaires endogènes (Laughlin et Pomerantz 1994). Lors de leur intégration dans le noyau de la cellule les génomes proviraux peuvent provoquer des mutations des cellules cibles, processus appelé mutagenèse insertionnelle. Dans ce contexte, les techniques modernes d'ADN

recombinant permettent d'utiliser les rétrovirus comme outil expérimental pour l'étude des néoplasmes et de la métastase.

1.2.2 - Oncogènes viraux (v-onc) et cellulaires (c-onc)

Aujourd'hui, on reconnaît généralement deux grandes catégories de rétrovirus oncogènes (Jonkers et Berns 1996). La première se compose de virus transformants aigus. Les virus de ce groupe ont la capacité d'induire des tumeurs polyclonales quelques jours ou semaines seulement après l'infection de l'hôte. Ces virus contiennent dans leur génomes des séquences transformantes (v-onc pour oncogène viral) capables d'induire des tumeurs après une période courte de latence (Chabert-Gisselbrecht 1995). En revanche, les virus appartenant à la deuxième catégorie, celle des virus transformants lents, ne possèdent pas d'oncogènes dans leur génome et induisent des tumeurs selon un tout autre mécanisme. En effet, la transformation s'explique par le mécanisme de mutagenèse insertionnelle selon lequel l'ADN proviral s'intègre dans le génome de la cellule lors de l'infection virale. Tout semble indiquer que l'insertion du provirus est aléatoire. Si elle se produit à proximité de proto-oncogènes cellulaires, alors elle est susceptible de provoquer une transcription anormale des séquences cellulaires situées à proximité de l'ADN proviral nouvellement intégré. Pour former une tumeur, la cellule infectée par le rétrovirus doit acquérir en vertu d'une augmentation des niveaux d'expression du gène candidat un avantage prolifératif menant à l'expansion clonale. Suite à une telle insertion provirale dans une ou plusieurs cellules d'un tissu cible on assistera à la formation d'une tumeur mono- ou oligoclonale alors que les cellules ayant intégré des provirus

dans des régions transcriptionnellement silencieuses du génome conserveront un phénotype normal.

L'identification de séquences cellulaires normales apparentées aux séquences oncogéniques des virus transformants aigus suscita beaucoup d'intérêt. En effet, ces gènes ont pour fonction de réguler la croissance cellulaire et le développement de l'organisme. Ces séquences cellulaires, souvent conservées chez plusieurs espèces (Drosophile, levures, rongeurs et les humains), sont appelées proto-oncogènes (c-onc: oncogènes cellulaires) et montrent un haut degré d'homologie avec les séquences présentes dans les oncogènes viraux (v-onc). Il est maintenant établi que l'existence des proto-oncogènes cellulaires a précédé le développement des oncogènes viraux. Cette conclusion est basée sur la structure des gènes eucaryotes, qui sont composés de régions codantes, (exons), et de régions non codantes, (introns). Lors de la fabrication de l'ARN messenger, l'ADN est transcrit puis les introns sont épissés et éliminés résultant en un ARN messenger composé uniquement d'exons et donc plus court que le gène dont il dérive. La structure des oncogènes viraux ressemble davantage aux ARN messagers qu'aux gènes intacts indiquant l'origine cellulaire des séquences transformants des rétrovirus.

1.2.3 - Mutagenèse rétrovirale

Les rétrovirus sont des agents mutagènes puissants en vertu de leur habileté à s'insérer dans le génome cellulaire de façon aléatoire et de leur capacité de modifier le fonctionnement d'un ou de plusieurs gènes cellulaires (revue par Jonkers et Berns 1996). Tel que démontré pour la

première fois pour le virus ALV (avian leukosis virus) qui induit un lymphome des cellules B, la juxtaposition de séquences provirales à un proto-oncogène (*c-myc*) de l'hôte peut résulter en une activation de ce proto-oncogène (Hayward et al. 1981). Un fragment d'ADN exogène peut servir d'agent de mutagenèse insertionnelle, mais les vecteurs rétroviraux, notamment le virus de la leucémie murine de Moloney, comportent plusieurs avantages: tout d'abord, l'intégration se fait normalement sous forme de copies simples de l'ADN; ensuite l'intégration se fait normalement de façon préférentielle à proximité des gènes transcrits; enfin, l'intégration ne semble pas causer de réarrangements ni de délétions (revue par Natarajan et Boulter 1995). Plusieurs sites d'insertion rétrovirale conduisant à la formation de tumeurs ont été identifiés suite aux travaux utilisant le rétrovirus de Moloney. Il en existe deux variétés de ce virus: le virus de la leucémie murine de Moloney (M-MuLV ou Mo-MLV), qui induit des leucémies chez les rongeurs, et le virus de tumeur mammaire murine de Moloney (MMTV), provoquant la formation de tumeurs mammaires chez les rongeurs (revue par Berns 1988, Jonkers et Berns 1996).

i - Virus de la leucémie murine Moloney

Le virus de leucémie murine de Moloney appartient à la famille des virus leucémogènes murins qui comprennent aussi les virus Friend, Gross, AKV et Rauscher (revue par Goff 1989). Bien que chacun de ces virus provoque une maladie distincte chez les animaux infectés, le virus de Moloney, tout comme les autres membres de cette famille, ne transforme pas les cellules en culture; en effet, celles-ci subissent plutôt une infection chronique et

deviennent productrices de virus sans changements cytopathologiques apparents (revue par Goff 1989). Ces virus provoquent des leucémies chez les animaux infectés après une longue période de latence. Dans bien des cas, on a pu montrer que les cellules tumorales contenaient des séquences provirales intégrées à proximité d'oncogènes endogènes, suggérant que l'activation de ces gènes contribue à l'initiation de la cancérogenèse (Goff 1989). Des travaux récents indiquent que l'intégration du provirus M-MuLV dépend non de la synthèse d'ADN par la cellule infectée, comme on le croyait auparavant, mais plutôt de l'état en mitose de la cellule (revu par Marin et al. 1994). Il semble que la destruction de l'enveloppe nucléaire soit suffisante pour permettre l'accès du provirus à l'ADN de la cellule.

A - Structure du virus de Moloney

Tel qu'illustré dans la Figure 1, le génome du virus de la leucémie murine Moloney, tout comme celui des autres rétrovirus compétents pour la réplication, comprend trois régions codantes appelées *gag*, *pol* et *env*. Le gène *gag* (group specific antigen) code pour les protéines structurales du virus tandis que *env* code pour la glycoprotéine de l'enveloppe du virion. Le produit majeur du gène *pol* est l'enzyme polymérase virale transcriptase inverse, qui catalyse la synthèse de l'ADN viral à partir de l'ARN viral (revue par Schwartzberg et al. 1984). Le génome du virus contient aussi des séquences régulatrices, les LTR (pour long terminal repeat) à chacune des extrémités du provirus. Ce sont des séquences identiques présentes aux extrémités 3' et 5' des gènes structuraux (Laughlin et Pomerantz 1994). Les LTRs contiennent les séquences

nucléotidiques requises pour l'intégration, la réplication et l'expression virales, elles peuvent aussi agir comme promoteurs de la transcription des gènes viraux et accessoirement ceux de la cellule de l'hôte (Pimentel 1989). Enfin, le virus contient une région appelée ψ importante pour l'assemblage du virus dans les cellules infectées (Fisher et Goff 1998).

FIGURE 1: Structure du virus Moloney

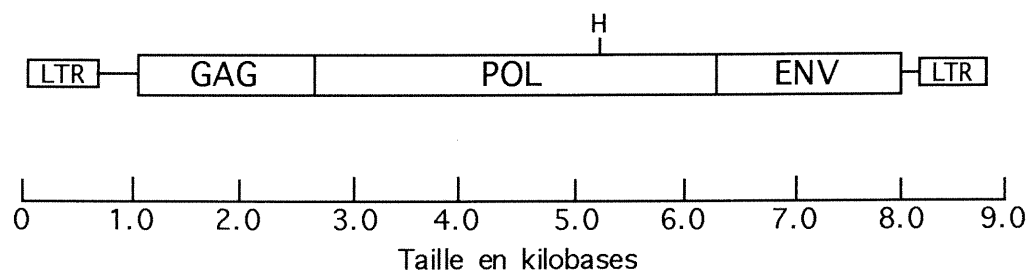


Figure 1: Diagramme du rétrovirus de leucémie murine de Moloney. Le site indiqué par la lettre H représente l'unique site pour l'enzyme de restriction HindIII. Les LTR sont les Long Terminal Repeat du virus. Les gènes *gag*, *pol* et *env* sont représentés (Schwartzberg et al. 1984).

B - Vecteurs rétroviraux dérivés du virus Moloney

Les rétrovirus sont maintenant utilisés de façon courante pour le transfert de gènes dans les cellules eucaryotes (Scarpa et al. 1991). On a même envisagé de les utiliser pour la thérapie génique chez l'humain. La structure de la majorité de ces vecteurs rétroviraux dérive de l'ADN proviral (Takahara et al. 1992) du virus de la leucémie murine Moloney.

Dans ces vecteurs, les séquences *gag*, *pol* et *env* ont été excisées et remplacées par d'autres séquences codantes susceptibles d'être transférées aux cellules cibles infectées. Ces vecteurs rétroviraux conservent certaines séquences de l'ADN proviral incluant les LTR 5' et 3' ainsi que le signal essentiel d'encapsulation nommé ψ (psi). Comme ces vecteurs sont dépourvus des séquences indispensables à la réplication ils ne peuvent se propager (Takahara et al. 1992). La production de particules virales infectieuses nécessite donc l'utilisation d'une lignée cellulaire capable d'assembler les virions. Celle-ci contient un deuxième virus auxiliaire dit "helper" dont on a enlevé le signal d'assemblage ψ tout en conservant les gènes *gag*, *pol* et *env*. C'est ce virus auxiliaire qui fournit les protéines nécessaires à la production de particules virales infectieuses (Markowitz et al. 1990).

ii - Lignée d'assemblage ψ_2

La lignée cellulaire ψ_2 est le prototype des lignées d'encapsulation (Markowitz et al. 1988a, 1988b, 1988c, 1990, Muenchau et al. 1990, Scarpa et al. 1991, Takahara et al. 1992). Le virus auxiliaire contenu dans cette lignée, pMOV ψ^- , ne contient pas le signal d'assemblage ψ mais fournit toutes les autres composantes requises pour la formation et la propagation des virions (Mann et al. 1983, Markowitz et al. 1988a) par les cellules ψ_2 . La lignée ψ_2N_2 permet aussi la production du vecteur rétroviral défectif N2.

iii - Vecteur N2

Le vecteur N2 dérive d'un rétrovirus Moloney dont une portion du génome a été remplacée par un gène codant pour le gène de résistance à la néomycine. C'est le gène "néo" qui confère la résistance à la généticine (G418/Gibco). La Figure 2 schématise le vecteur N2.

FIGURE 2: Structure du vecteur N2

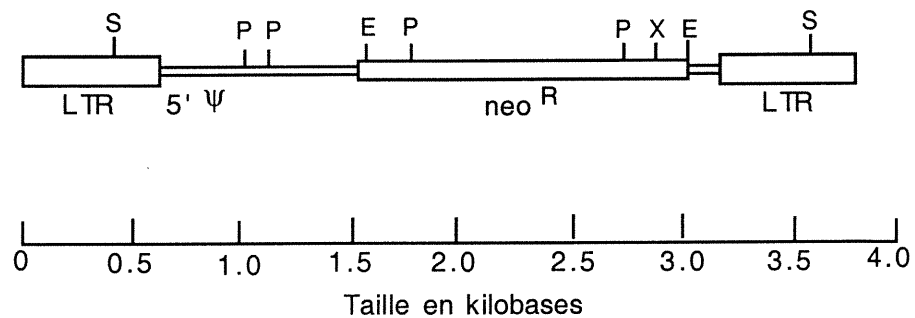


Figure 2: Diagramme du vecteur proviral N2. De 0 à 1.5 et de 3.0 à 3.8 kb: séquences virales du virus de la leucémie murine de Moloney (M-MuLV). La boîte de 1.5 à 3.0 kb correspond à la séquence Tn5 contenant le gène de résistance à la néomycine (antibiotique G418 de Gibco/BRL). Les LTR sont les Long Terminal Repeat du virus. Les sites indiqués par les lettres sont les sites de digestion d'enzymes de restriction suivants: S, SacI, P, Pst1, E, EcoRI, X, Xho1, C, ClaI. (Eglitis et al. 1985).

iv - Mutagenèse insertionnelle et cancer

L'étude du génome des cellules tumorales visant à identifier des gènes impliqués dans les processus de tumorigenèse et de métastase est facilitée par l'application des techniques de biologie moléculaire et des outils de la rétrovirologie (Thomas 1995). L'hypothèse voulant que l'expression de certains gènes soit liée au développement de cancers fut proposée pour la première fois en 1969 par Huebner et Todaro. Depuis, on sait qu'il existe une relation causale entre l'intégration d'un provirus et l'apparition de tumeurs (Jonkers et Berns 1996). Même si l'infection rétrovirale est polyclonale, on sait que l'émergence d'une tumeur résulte de l'expression clonale d'une cellule ayant acquis un avantage prolifératif (Chabert-Gisselbrecht 1995). L'intégration du provirus peut donc servir de marqueur moléculaire pour identifier des gènes impliqués dans le processus de tumorigenèse (Keller et al. 1985). Cette intégration offre la possibilité d'identifier de nouveaux gènes par clonage de la région jonctionnelle entre l'ADN cellulaire et l'ADN proviral.

L'intégration du provirus peut affecter l'expression ou la structure de gènes impliqués dans la transduction de signaux de prolifération ou de différenciation depuis la membrane cellulaire jusqu'au noyau. Ces gènes peuvent être rangés dans (au moins) quatre catégories fonctionnelles, incluant les facteurs de croissance, les récepteurs de facteurs de croissance, des protéines impliquées dans la transduction des signaux et des protéines nucléaires, dont la plupart possèdent une capacité d'agir comme facteur de transcription (revu par Tsichlis et Lazo 1995). Non seulement une

infection rétrovirale peut-elle mener au développement d'une tumeur par insertion du provirus, elle permet aussi d'en étudier le mécanisme moléculaire (Varmus et al. 1981, Cepko et al. 1984, Friedrich et Soriano 1993).

Une étude de ce type nécessite le clonage et la caractérisation des séquences d'ADN cellulaire jouxtant le site d'intégration du provirus dans le génome de la cellule tumorale (Jonkers et Berns 1996). Grâce à cette approche méthodologique on a pu identifier de nouveaux oncogènes (Chabert-Gisselbrecht 1995) et mieux connaître le fonctionnement du système hématopoïétique chez le rongeur (Keller et al. 1985, Jonkers et Berns 1996). En effet, grâce à l'étude des sites d'insertions rétroviraux présents dans les cellules de leucémies et lymphomes murins on a pu préciser le rôle que jouent les proto-oncogènes *myc* et *pim* dans l'apparition de ces néoplasmes du système hématopoïétique (revue par Jonkers et Berns 1996). On sait par exemple que dans plus de 50% des lymphomes précoces il y a activation du gène *pim-1* lors de l'intégration du provirus (Cuypers et al. 1984).

Un des principaux buts visés par la technique de mutagenèse rétrovirale est l'identification des sites d'intégration communs (common integration sites) à plusieurs tumeurs distinctes du même type (Jonkers et Berns 1996). À cet égard, le gène *int-1* a été identifié comme étant un site fréquemment activé lors de l'intégration du virus MMTV dans des carcinomes mammaires de souris C3H (Nusse et Varmus 1982, Nusse et al. 1984). Un deuxième gène impliqué dans les carcinomes mammaires murins, *int-2*, fut identifié (Peters et al. 1983) ce qui a permis de suggérer un mécanisme

de coopération entre ces deux oncogènes putatifs lors du développement de ces tumeurs (Peters et al. 1986). Un autre des gènes identifié grâce à cette technique est le gène *Vin-1* (Tremblay et al. 1992), celui qui encode la cycline D2 et dont la sur-expression provoque le développement de la leucémie chez la souris (Hanna et al. 1993). Quand au gène *Mlvi-1*, identifié par le groupe de Tsichlis (Tsichlis et al. 1983), il appartient à une famille de gènes impliqués dans l'induction de lymphomes murins par le virus Mo-MLV. Un homologue a été identifié chez l'homme, *MLVI-4*, et on a montré qu'il était réarrangé dans les myélomes multiples (Palumbo et al. 1990). Enfin, le gène *Dsi-1* qui est impliqué dans le développement de thymomes chez le rat a été identifié suite à l'étude des sites d'intégration du provirus Moloney (Mo-MLV) dans les tumeurs (Vijaya et al. 1987).

v - Mutagenèse insertionnelle et métastase

Plusieurs travaux ont utilisé le rétrovirus de leucémie murine de Moloney pour l'identification des gènes associés à la progression tumorale et à la métastase. Une de ces études a permis de cloner le gène *Tpl-1* et d'en définir le rôle dans le développement du lymphome thymique chez le rat (Bear et al. 1989). Le locus *Tpl-1* qui était la cible d'une intégration tardive a été associé à la progression tumorale dans ce modèle. L'intégration du virus de Moloney dans le gène *pim-2* est également associée à la progression tumorale et à la métastase, plutôt qu'au stade de développement tumoral, dans un modèle de lymphome de souris (Breuer et al. 1989). De façon générale, ces études suggèrent que les sites d'intégration de provirus associés à la progression tumorale et la métastase sont des événements tardifs dans l'évolution d'une tumeur.

Une autre étude jumelant la mutagenèse rétrovirale à une technique *in vitro* de sélection pour mesurer l'invasion cellulaire a permis l'identification du gène *Tiam-1*, un inducteur du processus d'invasion (Habets et al. 1994). En effet, la transfection de cDNAs du gène *Tiam-1* pouvait induire l'apparition du phénotype invasif dans les cellules non invasives de lymphome T BW5147.

Puisque le gène *Wnt-1* est identique à *int-1*, une nouvelle nomenclature a été proposée de façon à regrouper le gène *int-1* et d'autres gènes apparentés (Nusse et al. 1991). On a identifié plusieurs membres de la famille *Wnt* dans de nombreux espèces animales y compris l'homme. La sur-expression du gène *Wnt-1* dans la glande mammaire de souris transgéniques MMTV-*Wnt-1* conduit à une hyperplasie des cellules épithéliales mammaires suggérant que *Wnt-1* contribue à la tumorigenèse mammaire (revue par Jonkers et Berns 1996). Par ailleurs, l'amplification génique d'un autre membre de la famille *Wnt*, *Wnt-2*, entraînée par une insertion provirale, semble participer à la progression tumorale des tumeurs mammaires chez la souris (Roelink et al. 1992). Les gènes décrits ci-dessus figurent au Tableau 2. La pertinence des travaux visant à identifier les gènes impliqués dans le cancer et la progression tumorale est soulignée par l'identification de gènes humains homologues aux gènes identifiés chez les rongeurs. À ce titre citons entre autres les membres de la famille de *Wnt*, *MLVI*, et *Pim-1* (revue par Jonkers et Berns 1996). L'étude de la fonction des gènes humains devrait permettre de clarifier leur rôle dans les cancers humains.

TABLEAU 2: Gènes identifiés par la technique de mutagenèse rétrovirale
(liste non-exhaustive)

Gène	Fonction si connue	Modèle étudié	Virus	Référence
<i>Mlvi</i>	oncogène?	lymphome de rat	Mo-MLV	Tsichlis et al. 1983
<i>int-1</i>	oncogène putatif	carcinome mammaire murin	MMTV	Nusse et Varmus 1982
<i>pim-1</i>	oncogène (kinase)	lymphome murin	Mo-MLV	Cuypers et al. 1984
<i>Dsi-1</i>	oncogène?	thymome de rat	Mo-MLV	Vijaya et al. 1987
<i>pim-2</i>	progression tumorale	lymphome murin	Mo-MLV	Breuer et al. 1989
<i>Tpl-1</i>	progression tumorale	thymome de rat	Mo-MLV	Bear et al. 1989
<i>Wnt-2</i>	progression tumorale	carcinome mammaire murin	MMTV	Roelink et al. 1992
<i>Vin-1</i>	cycline D2	leucémies murines (cellules T)	Mo-MLV	Tremblay et al. 1992
<i>Tiam-1</i>	inducteur d'invasion	lymphome	Mo-MLV	Habets et al. 1994

MMTV: Mouse mammary tumour virus

Mo-MLV: Moloney murine leukemia virus

Mlvi: Moloney leukemia virus insertion site (famille de proto-oncogènes)

Pour une liste exhaustive des sites d'insertions impliqués dans le développement des leucémies et lymphomes murins, voir la revue de Jonkers et Berns 1996.

CHAPITRE 2: MODÈLE ET APPROCHE EXPÉRIMENTALE

2.1 - Modèle SMF/RMS

Le modèle SMF/RMS a été développé dans le laboratoire du Dr. F. Babaï au département de pathologie de l'Université de Montréal (Babaï et al. 1988, Babaï et Royal 1994). Un rhabdomyosarcome a été induit chez le rat Fischer par injection de sulfure de nickel dans le muscle squelettique (de la patte postérieure). Cette tumeur primitive a été mise en culture et plusieurs lignées cellulaires furent établies (Babaï et al. 1988). Une lignée, SMF-A, a été établie à partir d'une métastase ganglionnaire abdominale de la tumeur originale. Les cellules de cette lignée étaient invasives et métastatiques lorsque transplantées chez des rats syngéniques. La lignée SMF-A a été congelée et mise en culture à plusieurs reprises et des changements dans son comportement métastatique ont été constatés au passage 47, lorsque les rats injectés avec cette lignée ne formaient plus de métastases. Cette lignée modifiée a été désignée SMF-D et congelée. À partir des lignées parentales SMF-A et SMF-D ont été établis plusieurs sous-clones notamment SMF-Ai et SMF-Da. Les potentiels invasifs et métastatiques des lignées cellulaires ont été contrôlés par transplantation orthotopique chez des rats syngéniques, suivie d'un examen histologique pour vérifier la présence d'invasion musculaire ou vasculaire ainsi que la présence d'une réaction inflammatoire, suggérant la régression des cellules tumorales. Le modèle comprend des lignées cellulaires qui démontrent un potentiel métastatique variant de très métastatique (SMF-Ai), invasif et non-métastatique (RMS-Be, Herrera-Gayol et al. 1995) et non

invasif et non métastatique (SMF-Da). De ce fait ce modèle expérimental constitue un outil de choix pour l'étude de la métastase.

Premièrement, toutes les lignées cellulaires du modèle dérivent d'une tumeur induite chez le rat Fischer. Ainsi, en plus des études *in vitro*, des études *in vivo* par transplantation chez des rats syngéniques sont possibles. Deuxièmement, puisque les lignées cellulaires ont été obtenues à partir du muscle squelettique, des études de tumorigenicité, d'invasion et de métastase après orthotransplantation (transplantation intramusculaire) peuvent être réalisées. Les myofibres se prêtent très bien à l'étude des étapes du processus invasif puisque ces fibres sont entièrement entourées d'une lame basale. Des travaux antérieures portant sur l'étude de l'invasivité après orthotransplantation des cellules tumorales ont montré trois types d'invasion: l'invasion intercellulaire, translaminaire et intra- ou transcellulaire (Babaï 1976, Babaï et Royal 1994). Ce modèle fut utilisé notamment pour l'étude de la relation entre l'état de différenciation et le potentiel métastatique (Herrera-Gayol et al. 1995). Les observations essentielles découlant de cette étude figurent dans le Tableau 3.

TABLEAU 3: Caractéristiques des lignées cellulaires du modèle SMF/RMS

	Métastases	Invasion TC ¹	Invasion IC ²	Invasion TL ³	Régression
SMF-Ai	+	+	+	+	--
SMF-Da	--	--	--	--	+ ⁴
RMS-Be	--	--	+	--	--

Explications: 1: TC = transcellulaire
 2: IC = intercellulaire
 3: TL = translaminaire
 4: Régression de type immunologique

Tableau 3: Résumé du comportement métastatique, des types d'invasion et de régression constatés après injection chez des rats syngéniques des trois lignées cellulaires du modèle SMF/RMS.

2.1.1 - Relation entre l'état de différenciation et le potentiel métastatique

Le degré de malignité d'une tumeur est directement relié au caractère invasif et à la perte de différenciation des cellules tumorales. Le modèle SMF/RMS qui comporte des lignées cellulaires avec différents potentiels métastatiques et des états de différenciation définis a permis de démontrer une relation directe entre le potentiel d'invasion translaminaire et la capacité métastatique des cellules tumorales par voie hématogène (Herrera-Gayol et al. 1995).

2.1.2 - Étude des gènes exprimés dans le modèle par hybridation différentielle

Une étude des gènes exprimés de façon spécifique dans les lignées métastatique (SMF-Ai) et non métastatique (SMF-Da) de ce modèle a été entreprise en utilisant l'approche d'hybridation différentielle des ARNs messagers cellulaires (Daigneault et al. 1995). Plusieurs gènes exprimés de façon différentielle ont été isolés et il fut montré que ceux-ci avaient des homologies avec des molécules déjà connues: beta-2-microglobuline, lactate déshydrogénase, protéine ribosomale L38, protéine ribosomale S4, phosphoprotéine ribosomale acide P1 (toutes sur-exprimées dans les cellules non métastatiques SMF-Da), et trois clones (smf-7, smf-40 et smf-61) sur-exprimés dans les cellules métastatiques SMF-Ai ayant des homologies avec les gènes humains *fus* et *TB3-1*. Un seul gène sur-exprimé dans les cellules de la lignée métastatique n'avait aucune homologie connue. Une étude préliminaire de l'expression de ces deux clones (smf-7 et smf-61) chez d'autres types de cellules cancéreuses suggère l'existence de gènes homologues à ces clones dans les néoplasies humaines (Daigneault et al. 1995).

2.2 - Approche expérimentale

2.2.1 - Mutagenèse rétrovirale de la lignée non métastatique SMF-Da avec le virus N2

Nous avons émis l'hypothèse que l'insertion aléatoire d'un ou de plusieurs éléments proviraux dans le génome de la lignée SMF-Da pourrait faire apparaître des variants de l'expression génique ayant un phénotype métastatique. Le virus déficient N2 a été choisi en vertu de la possibilité d'obtenir des titres élevés de ce virus et de pouvoir sélectionner des clones de cellules infectées grâce à l'expression du gène de résistance à la néomycine (G418) (Armentano et al. 1987). Des stocks du virus N2 furent produits et utilisés pour les expériences initiales de mutagenèse. Après injection des cellules infectées *in vitro* à un site orthotopique, soit la patte postérieure de l'animal, on a vérifié à intervalles réguliers la présence de métastases dans les ganglions iliaques régionaux et dans le parenchyme pulmonaire. Les foyers métastatiques serviraient une fois obtenus au clonage moléculaire des séquences contenant le rétrovirus intégré et à l'identification ultérieure d'un gène impliqué dans la progression métastatique. Une série de 3 expériences distinctes utilisant la lignée SMF-Da fut donc entreprise. Dans chacune d'elles, on a testé le potentiel tumorigène et métastatique des cellules SMF-Da avant et après infection avec le virus N2 en utilisant des rats syngéniques. Les populations de cellules SMF-Da mutées, identifiées par leur résistance à la néomycine (G418), furent injectées à des rats syngéniques. En parallèle, des injections contrôles de cellules SMF-Da (contrôle négatif) et de cellules

métastatiques SMF-Ai (contrôle positif) furent ajoutées à chacun des groupes expérimentaux.

2.2.2 - Mutagenèse rétrovirale de la lignée non métastatique avec le virus de la leucémie murine Moloney (M-MuLV)

Le virus de la leucémie murine de Moloney possède la propriété de s'intégrer de façon stable dans la cellule hôte qu'il infecte (Bachelier et Fan 1981). On considère que cette infection est efficace puisque l'ADN viral peut être mis en évidence dans toutes les cellules d'une population infectée (Schwartzberg et al. 1984). L'existence de sites d'intégrations virales multiples dans le génome de la cellule infectée a été confirmé mais il n'est pas exclu qu'il puisse exister des sites préférentiels pour l'intégration d'un provirus (Scherdin et al. 1990, Rohdewold et al. 1987). Par exemple, l'intégration du rétrovirus de Moloney se produit de façon préférentielle à proximité des régions dites hypersensibles à la DNase 1 (Rohdewold et al. 1987). Ces observations suggèrent que l'intégration rétrovirale s'effectue préférentiellement dans les régions actives de la chromatine (Rohdewold et al. 1987). Des travaux antérieurs ont montré l'efficacité du virus de Moloney pour induire le phénomène de mutagenèse insertionnelle (Cuypers et al. 1986), d'où l'intérêt de l'utiliser pour l'étude de la sélection clonale impliquée dans la progression du lymphome murin.

2.2.3 - Les outils complémentaires à l'approche par mutagenèse insertionnelle

i - La transfection des lignées SMF-Da et SMF-Ai avec le gène β -gal

Nous avons émis l'hypothèse que la transfection du gène codant pour l'enzyme β -galactosidase pourrait faciliter le repérage et l'évaluation quantitative du nombre des cellules SMF-Da *in vivo*. En effet, un simple test histochimique permet de repérer les transfectants. Cette épreuve utilise le X-gal comme substrat de l'enzyme β -galactosidase et confère aux cellules transfectées une coloration d'un bleu azur intense localisée principalement dans le noyau de la cellule. Les lignées cellulaires transfectées furent aussi évaluées pour vérifier la stabilité de l'expression de marqueurs de différenciation myogénique (desmine, vimentine et alpha-actines) afin d'exclure un changement de phénotype lié à la transfection. Comme prérequis à ces expériences, les lignées transfectées devaient avoir un comportement biologique identique aux lignées parentales dont elles dérivent et pouvoir exprimer des gènes transfectés de façon stable pendant plusieurs mois. Nous avons ainsi transfecté les lignées cellulaires hautement métastatique (SMF-Ai) et non métastatique (SMF-Da) avec un vecteur permettant aux cellules d'exprimer l'enzyme β -galactosidase et avons vérifié la stabilité de leur phénotype pour les caractéristiques suivants: morphologie cellulaire, cycle cellulaire et expression de marqueurs de différenciation myogénique (desmine, vimentine et alpha-actine).

Le premier test *in vivo* effectué sur les lignées cellulaires transfectées fut un test de tumorigenicité visant à vérifier la stabilité du comportement tumorigène des cellules transfectées. Pour ce faire, des injections (transplantations) orthotopiques (dans le muscle squelettique de la patte postérieure des animaux) ont été effectuées. Tel qu'attendu nous avons observé un comportement identique pour les lignées transfectées et les lignées parentales non transfectées. L'étape subséquente faisant suite à l'évaluation du potentiel tumorigène fut de contrôler l'expression de l'enzyme β -galactosidase dans les cellules transfectées. Nous voulions ainsi vérifier si les cellules capables de former des tumeurs conservaient l'expression de la β -gal après transfert chez l'animal. Pour ce faire, nous avons évalué la capacité des transfectants à former des tumeurs *in vivo*, et examiné les poumons pour confirmer la présence des cellules de la lignée métastatique SMF-Ai β -gal. L'approche utilisée pour tester le potentiel métastatique de la lignée SMF-Ai β -gal est décrite dans la Section des Matériels et Méthodes à la rubrique métastase spontanée.

ii - Rétention différentielle de la Rhodamine 123 dans les lignées cellulaires SMF-Da et SMF-Ai

Plusieurs travaux ont montré qu'il existe une corrélation significative entre l'expression de la glycoprotéine P170 (protéine de 170 kilodaltons) codée par le gène *MDR* (Multidrug Resistance), et l'accumulation intracellulaire du fluorochrome Rhodamine 123 et de plusieurs agents chimiothérapeutiques (Efferth et al. 1989, Pétriz et Garcia-Lopez, 1997). Les gènes de la famille *MDR* ont été identifiés chez l'homme et chez plusieurs autres espèces animales dont le rat (Silverman et al. 1991). Le

mécanisme exact du transport cellulaire des drogues par la P170 n'est pas encore complètement elucidé (revu par Borst et Schinkel 1997) De plus, il semble qu'une augmentation des niveaux d'expression de la P170 s'observe dans les tumeurs les plus agressives (Nadakavukaren et Nadakavukaren 1985, Jardillier et al. 1994, Kitadai et al. 1995, Kitadai et al. 1996 et Greene 1997). Toutefois une autre étude a montré l'association entre la surexpression de la P170 et la diminution du potentiel métastatique d'un ostéosarcome humain (Scotlandi et al. 1996). L'activation spontanée du gène *mdr* dans une lignée non métastatique de rhabdomyosarcome de rat non traité avec des drogues a été démontrée (Hanania et al. 1991). La régulation de l'expression des gènes *mdr* dans les cellules cancéreuses demeure jusqu'à présent incomplètement élucidée (Benchimol et Ling 1994). Nous avons observé et exploité la rétention différentielle du fluorochrome Rhodamine 123, dans les lignées de notre modèle. Les cellules de la lignée SMF-Da ne retiennent pas le fluorochrome tandis que les cellules de la lignée SMF-Ai montrent au contraire une rétention élevée du fluorochrome lorsque mesuré par cytométrie en flux.

2.2.4 - Étude de la cinétique d'invasion

Nous avons développé un outil permettant l'identification des cellules tumorales isolées ou groupées en petits amas après injection chez l'animal. Nous l'avons utilisé pour étudier la localisation des cellules tumorales pour établir leur cinétique de déplacement *in vivo* et pour évaluer la propagation des cellules tumorales métastatiques et non métastatiques dans un organe cible: les poumons. Cette approche repose sur l'utilisation

du modèle de métastase expérimentale tel que décrit dans la Section des Matériels et Méthodes. Ceci nous a permis d'obtenir des informations détaillées concernant le mouvement précoce des cellules en migration et pour confirmer l'étape critique au delà de laquelle les cellules des lignées non métastatiques (SMF-Da et SMF-Da β -gal) cessent de progresser dans la cascade métastatique.

i - Les lignées SMF-Ai β -gal et SMF-Da β -gal

Nous avons émis l'hypothèse que les cellules de la lignée métastatique SMF-Ai β -gal se comporteraient comme celles de la lignée parentale SMF-Ai. Les cellules de ces lignées sont petites et difficiles à distinguer des lymphocytes sur les coupes colorées à l'HPS. La réaction histochimique X-gal a permis l'identification non équivoque des cellules SMF-Ai β -gal et des cellules de la lignée non métastatique SMF-Da β -gal. Ces dernières ont une taille beaucoup plus importante que les premières et donc peuvent être plus facilement distinguées sur les coupes colorées à l'HPS.

ii - La lignée RMS-Be9 β -gal

La lignée cellulaire RMS-Be9 possède un phénotype intermédiaire entre celui des lignées SMF-Ai et des lignées SMF-Da. La lignée RMS-Be9 montre des signes d'invasion intercellulaire mais les tumeurs demeurent non métastatiques, non régressives et bien différenciées (Herrera-Garol et al. 1995). Nous avons utilisé la lignée transfectée RMS-Be9 β -gal dans nos études de cinétique *in vivo* pour compléter nos observations et vérifier la

stabilité du comportement non métastatique en l'absence de facteur immunologique responsable de la régression tumorale.

CHAPITRE 3: MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 - Cellules et milieux

3.1.1 - Culture cellulaire

Les lignées cellulaires parentales SMF-Da et SMF-Ai proviennent d'une métastase ganglionnaire d'un rhabdomyosarcome chez le rat induit par application de sulfure de nickel dans le muscle de la patte postérieure (Babaï et al. 1986, Babaï et Royal 1994). La lignée RMS-Be dérive, elle aussi, d'un rhabdomyosarcome de rat induit par sulfure de nickel (Herrera-Gayol et al. 1995). Les lignées transfectées SMF-Da β -gal, SMF-Ai β -gal et RMS-Be β -gal contiennent toutes le gène de l'enzyme de β -galactosidase (β -gal) de *E.coli* et le gène de résistance à la néomycine (néo) qui confère aux cellules la résistance à l'antibiotique G418 (Geneticine de Gibco/BRL). Ces six lignées ont été maintenues dans le milieu de culture DMEM (Gibco/BRL) contenant 10% de sérum de veau foetal inactivé (SVFi, Hyclone) à 37°C pendant 45 minutes. Les cellules sont repiquées une fois par semaine. La lignée fibroblastique Rat-1 est cultivée dans le milieu de culture MEM (Gibco/BRL) avec 10% de sérum de veau non inactivé. Les lignées NIH 3T3 et NIH 3T3-Moloney sont cultivées en DMEM avec 5% de sérum de veau non inactivé (Gibco/BRL). La lignée ψ 2N2 est maintenue en culture en DMEM avec 5% de SVFi. La lignée XC, dérivée d'un sarcome de rat induit par le virus de sarcome de Rous (cité par Shackelford et Varmus 1988) a été maintenue en DMEM avec 10% de SVFi. Toutes les lignées cellulaires ont été maintenues dans un incubateur

à CO₂ à 37°C avec atmosphère humidifié, et testées régulièrement pour la présence de mycoplasmes avec le test de Hoechst (ICN Biomedicals). Tous les milieux de culture contiennent de la pénicilline et de la streptomycine (Gibco/BRL) à des concentrations de 50 u/ml et 50 µg/ml, respectivement. Lorsque les cultures cellulaires proviennent de stocks congelés, les cellules subissent au moins deux passages avant d'être utilisées pour des expériences.

3.1.2 - Clonage de lignées cellulaires

Les lignées SMF-Daβ-gal, SMF-Aiβ-gal et RMSBe-9β-gal transfectées avec β-gal et Néo sont isolées par la méthode de dilution limite. Environ 500 cellules transfectées sontensemencées dans des pétris de 150 mm 48 heures après la transfection. Les cellules sont maintenues en présence de G418 pendant 10-14 jours. Les cellules qui ont incorporé le gène néo croissent sous forme de colonies isolées au fond du pétri. La même stratégie de clonage par repiquage de colonies résistantes à la G418 est employée pour la sélection de clones de cellules infectées avec le virus N2.

3.2 - Production virale et infection

3.2.1 - Virus

i - Rétrovirus défectif N2

N2 dérive d'un virus Moloney. Il contient un signal ψ intact mais les gènes viraux *pol*, *env* et une partie de *gag* ont été remplacés par un gène

codant pour la résistance à la néomycine (Armentano et al. 1987). Pour produire le virus, nous avons utilisé la lignée cellulaire $\psi 2$ porteuse du virus auxiliaire pMOV- ψ^- . Après transfection avec le vecteur viral défectif N2, la lignée qui en résulte, $\psi 2N2$, produit le rétrovirus défectif N2 grâce aux produits fournis par pMOV- ψ^- et au signal d'assemblage fourni par N2 (Armentano et al. 1987). N2 étant un rétrovirus défectif, il ne peut se répliquer sans la présence de pMOV- ψ^- dans les cellules $\psi 2N2$ transfectée avec le vecteur viral défectif N2 (Armentano et al. 1987). Lorsque N2 est transfecté dans les cellules $\psi 2$, l'ARN de N2 est transcrit et assemblé dans des virions en utilisant les protéines nécessaires fournies par le virus auxiliaire (Markowitz 1988a). Le virus mutant auxiliaire, pMOV- ψ^- , a été créé en délétant 350 nucléotides d'un clone d'ADN proviral (Mann et al. 1983). Une fois intégrée de façon stable dans le génome de la lignée cellulaire $\psi 2$, pMOV- ψ^- fournit les séquences nécessaires pour la production de particules virales tout en étant incapable d'encapsider son propre ARN (Mann et al. 1983).

ii - Rétrovirus Moloney

Le rétrovirus de leucémie murine de Moloney (M-MuLV) utilisé dans cette étude est un virus écotropique de type C capable d'infecter les cellules de rongeurs mais non les cellules des autres espèces. Ces virus sont généralement assemblés du côté interne de la membrane plasmique de la cellule infectée et relâchés à l'extérieur de la cellule par bourgeonnement sans provoquer la lyse de la cellule (revue par Aboud et Hassan 1983).

3.2.2 - Production de virus

Pour la production de virus N2, 30 pétris de 10 mm sont ensemencés avec les cellules ψ 2N2 (environ 25,000 cellules par pétri). Lorsque le tapis cellulaire atteint 85% de confluence, le milieu de culture est retiré et remplacé par 2 ml de DMEM-5% SVFi préchauffé à 37°C. Les pétris sont retournés à l'incubateur pendant 2 heures à 37°C avec agitation toutes les 15 minutes. Les cellules sont incubées pendant 2 heures, les surnageants sont récoltés, et directement congelés à -80°C. Une deuxième collecte de virus se fait avec les mêmes pétris. Pour la production de virus de Moloney, la technique est essentiellement la même à l'exception des cellules productrices, NIH 3T3-Moloney qui sont infectées avec le virus.

i - Titration du virus N2 par infection des cellules Rat-1

Des pétris de 60 mm sont ensemencés avec 5×10^4 cellules Rat-1. Le lendemain, le milieu de culture est retiré et remplacé par 200 μ l de suspension virale (surnageant des cultures ψ 2N2) diluée dans du milieu MEM avec 10% de sérum de veau, à des dilutions sériées de 1:5 jusqu'à 1:10,000. Chaque dilution contient du polybrène (Sigma) à 8 μ g/ml. Des pétris en triplicata sont infectés pour chaque dilution. Les pétris sont retournés à l'incubateur pendant 2 heures à 37°C avec agitation aux 15 minutes pour redistribuer le surnageant. Après incubation, les surnageants contenant le virus sont retirés et remplacés par 2 ml de MEM/10% de SV et 200 μ g/ml de G418. 3 pétris contrôles non infectés reçoivent du G418 tandis que 3 autres servent de contrôles de la croissance

des Rat-1. Lorsque les contrôles de croissance non traités parviennent à confluence, tous les pétris sont colorés pendant 20 minutes avec du bleu de méthylène 0.2% dissout dans une solution de méthanol:eau 1:2. Après coloration, les pétris sont lavés à l'eau courante et les colonies de cellules résistantes au G418 comptées. Le titre viral en pfu (plaque-forming units) est calculé selon la formule suivante:

$$\text{nombre de colonies} \times \text{dilution} \times 5 = \text{titre de virus en pfu/ml}$$

ii - Titration du virus infectieux Moloney par le test XC

Un autre essai de titration est requis pour évaluer la production de virus Moloney (M-MuLV) non mutant puisque ce virus ne contient pas le gène de résistance à la G418 et qu'il ne produit pas d'effets cytopathologiques visibles dans les cellules en culture (Rowe et al. 1970). Le virus doit être titré par le test sur cellules XC (Rowe et al. 1970). Le test, utilisé pour la détection de virus écotropiques, emploie la lignée cellulaire XC, une lignée tumorale établie à partir d'une tumeur de rat Wistar induite par le virus de sarcome de Rous. Le génome des cellules XC contient le génome du virus de sarcome de Rous mais ces cellules ne produisent pas de particules virales infectieuses. Lorsqu'ensemencées en présence de cellules infectées avec un virus de leucémie murin (dans notre étude ce sont les NIH 3T3 infectées avec Moloney), les cellules XC forment des syncytia qui prennent la forme de plaques dont le nombre est directement proportionnel au nombre de particules virales infectieuses (1 plaque = une particule virale infectieuse).

Au jour 1, 3.5×10^3 cellules NIH 3T3 sont ensemencées dans des pétris de 60 mm. Le lendemain, le virus est dilué dans du DMEM avec 5% de sérum de veau non inactivé et 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Polybrène. Les pétris sont infectés avec 200 μl de virus à différentes dilutions en triplicata. Les pétris sont incubés à 37°C pendant 60 minutes avec agitation aux 15 minutes. Ensuite, les surnageants viraux sont remplacés par 3 ml de milieu avec 5% de sérum de veau et les pétris sont retournés à l'incubateur. Lorsque les cellules atteignent la confluence, après 5 ou 6 jours, le milieu est retiré et les pétris sont placés à découvert pendant 30 secondes sous les rayons UV de la hotte de culture. L'irradiation des cellules interrompt la croissance cellulaire mais n'empêche pas la production de particules virales. Après irradiation des cellules, 1×10^6 de cellules XC en suspension dans du DMEM/5% SV sont ajoutées à chaque pétri. 24 heures plus tard le milieu est renouvelé; après 3 ou 4 jours les cellules XC atteignent la confluence. Le milieu de culture est alors retiré, les cellules fixées et colorées au bleu de méthylène 0.2% dans de l'eau:méthanol 1:1 pendant 20 minutes. Les pétris sont enfin rincés à l'eau courante, et les syncytia sont comptés. La formule ci-haut (Section 3.2.2 i) a été employée pour calculer le titre viral.

iii - Test Rt pour détection de l'enzyme viral transcriptase inverse

Les populations ou clones de cellules infectés par les virus N2 ou Moloney sont testées pour leur production de l'enzyme viral transcriptase inverse par la technique d'Élisa (Trousse non radioactive de Boehringer Mannheim). Les surnageants (5 à 11 ml) de chaque pétri de cellules sont d'abord récoltés et centrifugés à basse vitesse (1500 rpm pendant 10 minutes) pour enlever les débris cellulaires puis ensuite centrifugés

pendant 60 minutes à 45,000 rpm (Centrifugeuse Sorvall Ultra) à 4°C. Les culots de virus sont lysés par resuspension dans un tampon de lyse pendant 30 minutes à température de la pièce (le tampon de lyse est fourni dans la trousse). 20 µl du mélange de réactifs (nucléotides conjugués à la digoxigénine et la biotine, gabarit et amorce) est ajouté à chaque tube de lysat et ceci est suivi d'une incubation de 1 heure à 37°C. Après l'incubation, les échantillons (60 µl) sont transférés dans des puits enrobés de streptavidine et incubés pendant 60 minutes à 37°C. Après l'incubation, les surnageants sont jetés et les puits rincés 5 fois avec un tampon de lavage. 200 µl d'anti-DIG-POD (un anti-digoxigénine conjugué à la peroxydase) sont ajoutés à chaque puits. Ceci est suivi d'une autre incubation de 60 minutes à 37°C. Les puits sont lavés comme précédemment et 200 µl de substrat POD (substrat de la peroxydase) sont ajoutés à chaque puits. L'absorbance est lue à 405 nm (référence à 492 nm) après 10-30 minutes. En parallèle, une courbe standard est construite à l'aide d'enzyme viral transcriptase inverse fournie dans la trousse. Les résultats des absorbances des surnageants sont alors rapportés sur la courbe standard et la quantité d'enzyme virale est estimée.

3.2.3 - Infection virale des cultures cellulaires par N2 ou Moloney

Pour l'infection des SMF-Da, SMF-Ai, SMF-Daβ-gal et les SMF-Aiβ-gal, 6 pétris de 150 mm sontensemencés avec 5×10^5 cellules de chaque lignée. Le lendemain, 5 pétris de chaque lignée sont infectés avec 10^7 particules virales de N2 par pétri dans 3-4 ml de DMEM/10% SVFi et 8 µg/ml de Polybrène. Le 6e pétri sert de contrôle non infecté. Une multiplicité d'infection de 10 est employée dans le cas d'une infection avec le virus de

Moloney. 10 particules virales par celluleensemencée à infecter sont donc diluées dans le milieu de culture (15 mls). Les particules virales sont laissées en contact avec les cellules pendant 2 heures à 37°C avec agitation aux 15 minutes. Ensuite les pétris sont lavés avec du milieu et du DMEM frais (avec SVFi) est ajouté à chaque pétri. Pour sélectionner les cellules infectées par le virus N2, les pétris sont traités au G418 pendant 12 à 16 jours. Les cellules qui résistent aux effets toxiques du G418 sont considérées infectées par N2, qui possède le gène de résistance à la G418. Aucune sélection n'est utilisée pour les cellules infectées par Moloney.

3.3 - Transfection de lignées cellulaires

La transfection des lignées cellulaires avec l'enzyme bactérien β -galactosidase permet de visualiser facilement les cellules grâce à la réaction de l'enzyme avec son substrat, X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside de Boehringer Mannheim), qui donne un produit de réaction coloré d'un bleu azur intense. Ce produit est visible macroscopiquement et microscopiquement dans les cultures de cellules, ainsi qu'à l'intérieur des cellules et sur des coupes congelées de tissus animaux. Le produit ne s'estompe pas lors des contre-colorations des coupes de tissus avec la coloration au HPS, utilisée pour l'identification des structures tissulaires (tissu musculaire, cellules de la réaction inflammatoire, macrophages, lymphocytes).

3.3.1 - Vecteurs et constructions

pSV2néo (0.2 μ g) et MSV β -gal (2.0 μ g) sont transfectés dans les lignées SMF-Da (non métastatiques), SMF-Ai (métastatiques) et RMS-Be (invasives mais non métastatiques). Pour la transfection, la Lipofectine (lignée SMF-Da) ou la Lipofectamine (lignées SMF-Ai et RMS-Be) ont été employés selon les instructions du fournisseur (Gibco/BRL). Les cellules transfectées sont sélectionnées par exposition au G418 à 400 mg/ml pour une période de 16 jours. Les constructions utilisées sont illustrées à la Figure 3.

FIGURE 3: Schéma des vecteurs utilisés pour la transfection des cellules

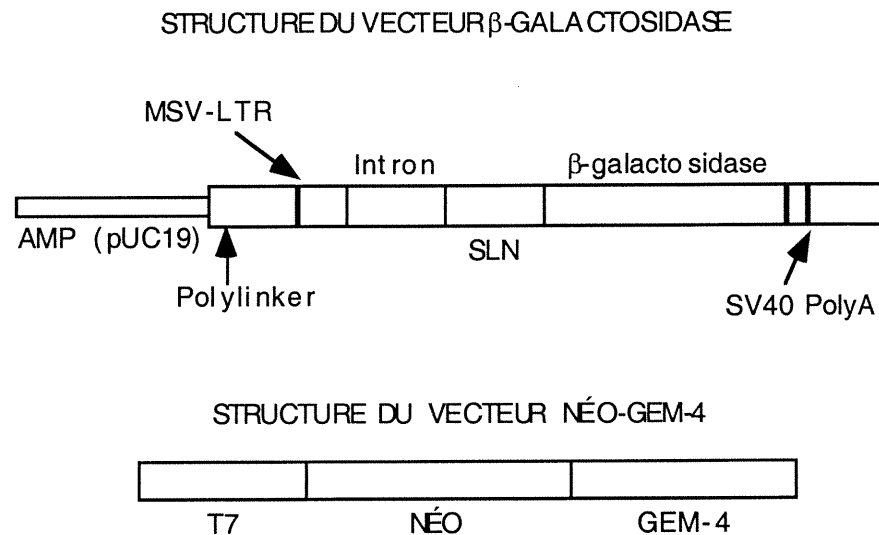


Figure 3: Illustration schématique des constructions des vecteurs utilisés pour les transfections (gracieusement obtenues du Dr. Y. Monczak (Villemur et al. 1987). Le vecteur de β -galactosidase contient un Signal de Localisation Nucléaire (SLN) qui dirige l'expression de l'enzyme vers le noyau de la cellule transfectée.

3.3.2 - Détection des clones β -gal par histochimie avec X-gal

Des clones individuels résistants à la G418 ont été sélectionnés et testés pour leur expression de l'activité de l'enzyme β -galactosidase en utilisant le X-gal comme substrat de l'enzyme. Brièvement, les cellules en pétris ou des coupes de tissus (poumons d'animaux injectées avec cellules β -gal) sur lames de verre sont rincées au PBS, fixées pendant 5-10 minutes dans la paraformaldehyde 2%, rincées à nouveau dans du PBS et exposées au X-gal. Le tampon X-gal (ferricyanide de potassium 5mM, ferrocyanide de potassium 5mM, chlorure de magnésium 2mM dans du PBS) contient 0.5 mg/ml de X-gal qui est préalablement dissout dans du DMSO (Dimethyl Sulphoxide, BDH) à 40 mg/ml et ajouté directement au tampon. Le X-gal est clivé par l'enzyme β -gal et le produit clivé prend une coloration bleu azuré intense et insoluble, caractéristique de la réaction. Les lignées cellulaires contenant β -gal étaient stables pour leur expression de l'enzyme β -gal pour au moins 20 passages.

3.4 - Rétention de la Rhodamine 123

3.4.1 - Coloration, test de rétention et analyse au FACS

Pour tester la capacité de rétention de la Rhodamine 123 dans les lignées cellulaires, les cellules sontensemencées en pétris de 60 mm pour atteindre 80% de confluence le jour du test. Le stock de Rhodamine 123 (Aldrich) est préparé fraîchement à 1 mg/ml dans de l'eau nanopure, filtré et ajouté directement au milieu de culture préchauffé à 37°C pour obtenir une concentration finale de 26 μ M lors du test. Le test de coloration se fait

à la noirceur. Le milieu de culture est retiré et du milieu préchauffé contenant la Rho 123 est ajouté. Les pétris sont alors incubés pendant 40 minutes à 37°C. Après la période d'incubation, les pétris sont lavés 3 fois avec du milieu préchauffé et retournés à l'incubateur pour 6 heures d'incubation. Les cellules sont ensuite trypsinisées, lavées au PBS et fixées à la paraformaldehyde 2% en PBS. L'analyse des échantillons a été effectuée par cytométrie en flux à l'aide d'un cytomètre (appareil FACStar de Becton-Dickinson). Cet appareil est muni d'un laser argon refroidi à l'eau, émettant à 488 nanomètres. La fluorescence verte (FITC) a été captée par un filtre à bande passante de 530 nanomètres. Le pourcentage de cellules positives a été déterminé en ajustant la limite inférieure des barrières de l'appareil de façon à exclure l'autofluorescence (fluorescence nonspécifique) des cellules nonexposées à la Rhodamine (Thorlacijs et al. 1997). Les données sont recueillies et analysées par le programme Consort 30 pour un nombre totale de 10,000 événements. Les échantillons fixés à la paraformaldehyde doivent être analysés entre 2 heures et 5 jours après la fixation. Après 5 jours suivant la fixation, l'intensité de la fluorescence baisse.

3.4.2 - Cytométrie en flux pour triage de cellules

Pour trier les cellules à forte rétention de la Rhodamine 123, des pétris de 150 mm sontensemencés avec les cellules à trier. La coloration se fait tel que décrit dans la section 3.4.1 mais la période de lavage est prolongée et les cellules sont incubées toute la nuit (12 heures) au lieu de 6 heures. Le lendemain, les cellules sont trypsinisées et lavées 3 fois au PBS. Les cellules sont alors comptées et la concentration est ajustée à 3×10^6 cellules

par ml pour le tri. Après une lecture rapide d'un échantillon des cellules pour obtenir leur profil de rétention, les barrières de l'appareil sont ajustées et les cellules sont triées directement dans des tubes contenant du milieu de culture avec 15% de SVFi.

3.5 - Animaux et injections

Des rats mâles Fischer 344 pesant entre 75 et 100 g proviennent de Charles River Canada. Les animaux sont logés à l'animalerie de l'Université de Montréal avec libre accès à l'eau et à la nourriture.

3.5.1 - Expériences de métastase spontanée

Les expériences de métastase spontanée tentent de reproduire la situation *in vivo* d'une cellule cancéreuse potentiellement métastatique en plaçant les cellules dans un site orthotopique (revu par Jouanneau et al. 1995). 5×10^6 cellules par lignée cellulaire sont injectées par voie intramusculaire dans les muscles de la patte postérieure de l'animal. La viabilité cellulaire contrôlée avant injection excédait 85% pour ces essais de tumorigénicité. La formation de tumeurs est contrôlée une ou deux fois par semaine par palpation du membre injecté. Lorsque la taille de la tumeur dépasse 3 x 3 centimètres l'animal est sacrifié, à défaut de quoi les rats sont gardés 2 à 3 mois. Au moment du sacrifice, la tumeur ou le site d'injection, les ganglions iliaques et les poumons sont prélevés.

3.5.2 - Expériences de métastase expérimentale

Les expériences de métastase expérimentale vérifient le comportement métastatique d'une population de cellules en les injectant directement dans la circulation sanguine (veineuse). Ceci a pour effet de court-circuiter le trajet normalement emprunté par une cellule cancéreuse *in vivo* (revu par Jouanneau et al. 1995). 1×10^6 cellules de chaque lignée sont injectées directement dans la veine jugulaire des rats anesthésiés à l'éther. Lors du sacrifice (immédiatement suivant l'injection ainsi qu'après 1, 6, 12 et 24 heures et 7, 14 et 21 jours) les poumons sont perfusés au PBS par voie trachéale, examinés et prélevés pour être fixés à l'éthanol 70% ou congelés dans l'azote liquide par "snap-freeze" avant d'être transférés à un congélateur -80°C .

3.5.3 - Histologie des tissus animaux

Lors des expériences avec les animaux, des échantillons représentatifs sont prélevés et fixés dans une solution de formaline neutre 10% tamponnée. Ils sont ensuite enrobés en blocs de paraffine, coupés et étalés sur lames de verre. Des lames sont colorées selon la méthode HPS (Hématoxyline-Phloxine-Safran) pour examen microscopique. Une autre série d'échantillons de ces tissus est congelée dans de l'azote liquide et subséquemment conservée dans un congélateur à -80°C . Ces échantillons sont utilisés pour faire des coupes congelées pour l'analyse histochimique avec X-gal. Les tissus ont été coupés à l'aide d'un cryostat Reichert-Jung

(modèle 1800). Une portion des tissus a aussi été fixée dans de l'éthanol 70% pour immunohistochimie (section suivante).

3.5.4 - Immunohistochimie

Les tissus fixés à l'éthanol 70% ou à la paraformaldehyde 3.7% en PBS sont enrobés en paraffine et coupés à 5 μm . La réaction d'immunoperoxidase est utilisée pour la localisation de la desmine, de la vimentine et de l'actine alpha du muscle lisse. Les coupes sont déparaffinées, réhydratées, lavées au PBS et pré-incubées dans un bain de méthanol/ peroxyde d'hydrogène pendant 30 minutes à la température de la pièce. Après deux lavages au PBS, les coupes sont pré-incubées dans du sérum de cheval pendant 20 minutes à température de la pièce. Les coupes sont ensuite incubées avec un anticorps anti-desmine (Amersham) à une dilution de 1:10, un anti-vimentine (Amersham) à 1:5 ou avec un anti-actine du muscle lisse (Sigma) à 1:200 en PBS pendant toute la nuit à 4°C. Après deux lavages au PBS, les coupes sont incubées avec un anti-IgG de souris et un anticorps biotinylé de cheval pendant 30 minutes à température de la pièce. Après deux lavages au PBS, les coupes sont incubées avec un complexe avidine-peroxidase pendant 40 minutes à la température de la pièce suivant les instructions du manufacturier (Vector Labs). L'activité peroxidasique est révélée en plongeant les coupes dans un bain de PBS contenant le tétrachlorure de diaminobenzidine (DAB) et du peroxyde d'hydrogène. Les coupes sont lavées à l'eau courante et contre-colorées légèrement à l'hématoxyline.

3.5.5 - Calcul des décomptes cellulaires

Pour calculer le nombre moyen de cellules par unité d'aire pulmonaire, 5 surfaces représentant approximativement 2.4 mm² (ce dernier calcul est basé sur le diamètre en millimètres du champ visuel du microscope, la formule pour le calcul de la surface d'un cercle est donné ci-dessous) ont été choisies de façon aléatoire et les cellules bleues ont été dénombrées pour chaque coupe, puis les moyennes des décomptes ont été calculées pour chaque coupe ainsi que pour chaque animal. Au moins 20 coupes par animal ont été examinées.

$$\pi/4 \times d^2 \quad \text{où } d = \text{diamètre (1.75 mm, estimé à l'aide d'un hémacymètre)}$$

3.6 - Analyse de l'ADN et de l'ARN

3.6.1 - Extraction d'ADN de culots de cellules

L'ADN est extrait de culots de cellules congelées avec le réactif DNAzol (Gibco /BRL) lequel contient un détergent de guanidine. 1 ml de DNAzol est ajouté à des culots congelés de cellules de 1-3 x 10⁷ cellules. Les cellules sont lysées en pipettant doucement la suspension avec des pipettes munies d'embouts coupés. L'ADN est précipité en ajoutant 500 µl d'éthanol 100% par ml de DNAzol utilisé. Les tubes d'extraction sont inversés plusieurs fois doucement, puis on les laisse reposer. Après 2-3 minutes, un précipité blanc de filaments d'ADN apparaît dans chaque tube. Ce précipité est transféré soigneusement dans un autre tube de type

Eppendorf à l'aide d'un embout de pipette puis lavé deux fois avec de l'éthanol 95%. Ensuite, l'ADN est séché à l'air libre avant d'être dissout dans de l'eau. Le dosage des échantillons se fait par spectrophotométrie (GeneQuant RNA/DNA Calculator de Pharmacia Biotech).

3.6.2 - Analyse de l'ADN par la technique de Southern

i - Technique de buvardage selon Southern

Des échantillons contenant de 10 à 12.5 µg d'ADN sont incubés en présence de 5 unités d'enzyme par µg d'ADN avec les enzymes de restriction EcoR1 et HindIII. Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose 0.8% dans un tampon de TAE 1x (Tris-acétate 0.04 M, EDTA 0.001 M, appareil d'électrophorèse H4 de Life Technologies (Gibco/BRL)). Après l'électrophorèse, les fragments d'ADN sont transférés sur membrane de nitrocellulose Hybond-N+ (Amersham) préalablement humectée dans de l'eau. Le transfert se fait à l'aide d'une pompe à vide (appareil VacuGene XL de Pharmacia Biotech). Le transfert se déroule en présence de HCl pendant 40 minutes suivi de NaOH pendant 60 minutes. La membrane est rincée une fois dans du SET 1x (NaCl 0.1 M, TrisHCl 10 mM, EDTA 1 mM) et conservée entre deux papiers-filtres jusqu'au moment de l'hybridation.

ii - Préparation des sondes

La sonde pRMO-1 provient du laboratoire du Dr. Guy Lemay du Département de Microbiologie et Immunologie (Lemay et Jolicoeur 1984).

Un échantillon de 50 à 100 ng d'ADN dans un volume de 34 μ l d'eau est porté à ébullition au bain marie. 10 μ l de réactif OLB contenant les hexadeoxyribonucléotides (Pharmacia Biotech) dans un tampon de HEPES 1M sont ajoutés avec 50 μ Curies de dCTP marqué avec l'alpha-³²P et 2 unités d'enzyme Klenow (Pharmacia Biotech). Le mélange est incubé pendant 50 minutes à 37°C. Après l'incubation, la sonde marquée est purifiée par passage sur une colonne de Séphadex G-50 (Pharmacia Biotech). Pour préparer la colonne achetée préloadée pour l'élution de la sonde, 3 ml de tampon HENS sont ajoutés à la colonne suivi d'une décantation immédiate. Un deuxième échantillon de 3 ml de tampon HENS est ensuite ajouté et élué. L'élution du marqueur se fait dans un volume de 400 μ l de tampon HENS (HEPES 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 10 mM et 1% de sulfate dodecyl de sodium). La sonde (50 μ l) est ajoutée à la colonne, suivi de 400 μ l de tampon HENS. Les premiers 400 μ l à éluer de la colonne sont jetés et un autre 400 μ l de tampon HENS est ajouté à la colonne. 400 μ l sont alors récupérés dans un tube Eppendorf. Un échantillon de 5 μ l de la sonde éluee est compté dans un volume de 5 ml de liquide à scintillation (Universol de Pharmacia) dans un compteur à radioactivité (LS600SC de Beckman).

iii - Hybridation des membranes

Les membranes sont pré hybridées pendant 1-2 heures à 65° C dans un tampon de SET 4x contenant 0.1% de pyrophosphate de sodium, 0.2% de SDS et 100 μ g/ml d'héparine. Après la pré hybridation, le tampon est rejeté et remplacé par un tampon d'hybridation (SET 4x, héparine à 500 μ g/ml). La sonde radioactive dénaturée par ébullition est ajoutée à la

solution (40 à 50 x 10⁶ cpm par hybridation). Les membranes sont hybridées pendant 16 heures à 65°C. Le lendemain, les hybridations non spécifiques et les fragments de sonde libres sont enlevés par lavages successifs dans du SET 2x (10 minutes) à 65°C, puis dans du SET 0.5x/SDS 0.5% (trois lavages de 20 minutes chacun) à 65°C, et finalement dans du SET 0.05x pendant 5 minutes à la température de la pièce. Les membranes sont placées dans des cassettes avec un film Kodak X-OMAT AR pendant 1 à 7 jours.

3.6.3 - Transformation de bactéries compétentes

Le contenu d'un tube contenant 200 µl de bactéries compétentes décongelées est ajouté à 5 ng d'ADN dilué dans 5 µl de milieu bactérien LB. Le mélange est incubé pendant 30 minutes sur la glace, suivi d'un choc thermique à 42°C pendant 40 secondes. Le mélange est dilué jusqu'à 1 ml avec du milieu LB et les bactéries ainsi transformées sont étalées sur des pétris de 100 mm contenant une gélose OBA (Ordinary Bottom Agar: 2% bacto-tryptone, 0.5% extrait de levure, NaCl 0.1M, agar) et de l'ampicilline à 100 µg/ml. Les pétris sont incubés pendant la nuit à 37°C et le lendemain les colonies de bactéries sont prélevées.

3.6.4 - Préparation d'ADN de plasmides par "mini-prep"

Chaque colonie bactérienne choisie estensemencée dans un tube de 5 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Les tubes sont incubés pendant la nuit dans un agitateur à 37°C. Le lendemain, 1 ml de chaque tube est transféré à un tube de type Eppendorf et centrifugé à 12,000g

pendant 2 minutes. Le milieu est décanté et le culot de bactéries resuspendu dans 100 μ l de tampon de lyse STET (Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, sucrose 8% et Triton X-100 5%). 8 μ l de lysozyme frais sont ajoutés à chaque tube et les tubes sont incubés pendant 60 secondes dans un bain-marie d'eau bouillante. Les tubes sont refroidis brièvement sur la glace avant d'être centrifugés à 12,000g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est jeté et 110 μ l d'isopropanol est ajouté à chaque surnageant. Les tubes sont incubés pendant 10 minutes à la température de la pièce avant d'être centrifugés à 12,000g pendant 6 minutes à 22°C. Le culot est lavé deux fois avec de l'éthanol 70%, et resuspendu dans 30-40 μ l de Tris 10 mM à un pH de 8.0.

3.6.5 - Extraction d'ARN de culots de cellules

L'ARN est isolé de culots de cellules congelées tout comme pour l'isolement de l'ADN (section 3.6.1 ci-dessus) sauf qu'on utilise le réactif TRIzol (Gibco/BRL) qui contient du guanidine. Pour maintenir l'intégrité de l'ARN, toutes les manipulations se font sur la glace et l'ARN isolé est soigneusement gardé à -80°.

3.6.6 - Analyse de l'ARN par la technique de Northern

i - Technique de buvardage selon Northern

L'ARN est séparé par électrophorèse dans un gel d'agarose 1.0% solubilisé dans un tampon de phosphate de sodium 0.1M, le tout traité au diethyl pyrocarbonate (DEPC de BDH) pour éliminer les RNAses.

L'électrophorèse se fait dans un appareil d'électrophorèse H4 de Life Technologies (Gibco/BRL). Chacun des échantillons d'ARN est resuspendu dans un tampon contenant du glyoxal déionisé et du DMSO dans un tampon de phosphate de sodium, le tout traité au DEPC. Nous n'ajoutons pas de bromure d'éthidium aux gels puisque ce composé réagit avec le glyoxal. Le tampon d'électrophorèse doit être mélangé soit manuellement aux 30 minutes ou avec une pompe à recirculation pour empêcher la formation de gradients d'ions H⁺. Après l'électrophorèse, les fragments d'ARN sont transférés sur membrane de nitrocellulose Hybond-N+ (Amersham) préalablement humectée dans de l'eau-DEPC. Le transfert se fait à l'aide d'une pompe à vide comme pour le transfert de l'ADN (appareil VacuGene XL de Pharmacia Biotech).

ii - Préparation des sondes

La sonde MDR1.1 a été achetée chez ATCC (American Type Culture Collection). Cette sonde, cloné du foie humain (van der Blik et al. 1988) est un cDNA correspondant au gene humain *MDR1* qui démontre de hauts degrés d'homologies de séquence et fonctionnelles avec les genes *mdr* des rongeurs (Santoni-Rugui et Silverman 1997). La sonde MDR1.1 a été marquée comme dans la section 3.6.2 ii ci-haut.

iii - Hybridation des membranes

L'hybridation des membranes se fait tel que décrit à la section 3.6.2 iii.

CHAPITRE 4: RÉSULTATS

4.1 - Mutagenèse rétrovirale

4.1.1 - Mutagenèse rétrovirale avec le virus N2

Notre première approche pour la mutagenèse a été réalisée à l'aide du rétrovirus déficient N2. Les infections furent rapides (2 heures dans un incubateur) et, à l'exception d'une expérience, ont été très efficaces comme l'indique les taux d'infection avec le G418 (Tableau 4).

i - Production du virus N2

Après chaque production de virus, tous les lots de surnageant viral furent titrés par infection de cellules Rat-1 tel que décrit à la section 3.2.1 i. Les résultats de deux titrations représentatives figurent au Tableau 4. Les cellules infectées ainsi que les cellules contrôles ont été exposées à 400 µg/ml de G418 pendant 17 jours. En parallèle, les cellules Rat-1 non infectées et non traitées au G418 maisensemencées à la même densité que celles traitées à la G418 ont servi de contrôle pour la croissance normale de cette lignée.

TABLEAU 4: Titration des productions virales de N2 par infection des cellules Rat-1

Production virale ¹	Dilution de N2	Volume utilisé	# de colonies	Titre en pfu/ml ²
Lot 1	1:5000	200 µl	211.0	5.3 x 10 ⁶
Lot 2	1:8000	200 µl	39.3	1.6 x 10 ⁶

Explications: 1: Les numéros de lots représentent différentes dates de productions virale
2: Le titre est calculé selon la formule donné dans la section 3.4.1 i.

Tableau 4: Ce tableau résume les deux productions virales utilisées pour les expériences de mutagenèse. Le virus N2 est produit par la lignée cellulaire ψ 2N2 décrite à la section 1.2.3 iii. Chaque lot de virus a été titré à plusieurs dilutions et les résultats représentatifs de chaque titration sont illustrés.

Quoique plusieurs dilutions aient été testées pour chaque lot de production virale, les résultats présentés sont ceux qui, pour chaque titration, illustrent le mieux les titres viraux; des dilutions inférieures à 1:5000 (par exemple 1:2500) ont résulté en un nombre trop élevé de colonies interférant avec un décompte précis. D'autres lots de virus ont été produits avec des titres très similaires et furent gardés à -80°C.

ii - Taux des infections des cellules SMF-Da avec N2

Le Tableau 5 résume les résultats des tests d'efficacité des infections avec le virus N2. Pour toutes les expériences d'infection, un échantillon de la population totale de cellules infectées ainsi que la population non infectée fut testé pour l'efficacité à l'infection. Pour les expériences A et C, 100 cellules ont étéensemencées dans 2 pétris (100 mm) et pour l'expérience B,

500 cellules ont été ensemencées par pétri. Pour chaque expérience, un des deux pétris a été exposé au G418 (400 µg/ml) pendant 14-16 jours (ou dès que les colonies non infectées et donc non résistantes ont démontré des signes de dégénérescence) tandis que l'autre pétri servait de contrôle. Les colonies de cellules résistantes aux effets de la G418 ont été dénombrées et comparées aux nombres de colonies formées sur les pétris de cellules non exposées. Plus les deux chiffres s'approchent de l'égalité, plus l'infection est efficace. Les infections A (lot 2) et B (lot 1) affichent un très haut taux d'efficacité sauf pour deux pétris (pétri II - A et VIII - B). L'infection C, réalisée avec le lot 1 de virus, montrait un taux d'infection des cellules beaucoup plus bas malgré l'utilisation du même lot de virus N2 que celui qui avait servi à l'expérience A. Les cellules ont donc été traitées au G418 pendant 14 jours afin d'éliminer les cellules non infectées avant de procéder à l'injection. Le Tableau 5 résume les résultats de trois expériences distinctes (A, B et C) d'infection de cellules de la lignée SMF-Da avec le virus N2.

TABLEAU 5: Colonies de SMF-DaN2 avec ou sans G418 pour les trois expériences (A, B et C) de mutagenèse avec N2

Cellule	Pétri	Infection	Titre viral N2	Colonies G418	Taux	
					Contrôle	d'infection
SMF-Da	Co	A	--	16 ²	59	--
SMF-DaN2	I	A	1.6 x 10 ⁶ pfu/ml	58	44	~99% ¹
SMF-DaN2	II	A	1.6 x 10 ⁶ pfu/ml	49	53	93%
SMF-DaN2	III	A	1.6 x 10 ⁶ pfu/ml	98	93	~99% ¹
SMF-DaN2	IV	A	1.6 x 10 ⁶ pfu/ml	71	61	~99% ¹
SMF-DaN2	V	A	1.6 x 10 ⁶ pfu/ml	89	81	~99% ¹
SMF-Da	Co	B	--	0	453	--
SMF-DaN2	VI	B	5.3 x 10 ⁶ pfu/ml	413	404	~99% ¹
SMF-DaN2	VII	B	5.3 x 10 ⁶ pfu/ml	501	468	~99% ¹
SMF-DaN2	VIII	B	5.3 x 10 ⁶ pfu/ml	378	526	72%
SMF-Da	Co	C	--	0	131	--
SMF-DaN2	IX	C	5.3 x 10 ⁶ pfu/ml	51	107	48%
SMF-DaN2	X	C	5.3 x 10 ⁶ pfu/ml	79	172	46%
SMF-DaN2	XI	C	5.3 x 10 ⁶ pfu/ml	59	136	43%
SMF-DaN2	XII	C	5.3 x 10 ⁶ pfu/ml	42	121	35%

Explications: 1: Dû à l'inexactitude d'ensemencement de petits nombres de cellules, nous avons convenu que l'efficacité de cette infection était d'au moins 99%.
2: Ces colonies étaient des micro colonies de cellules en dégénérescence

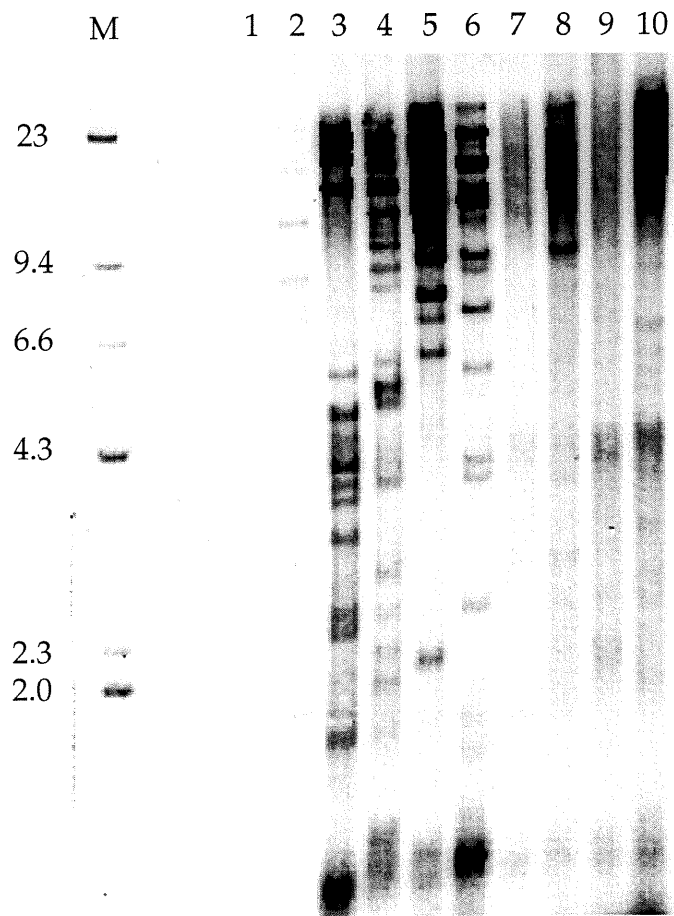
Tableau 5: Résultats des tests des taux d'infection des cellules SMF-Da avec le virus N2. Le décompte des colonies s'effectue généralement après 16 jours de traitement ou dès que les colonies contrôles (non infectées) montrent des signes de dégénérescence.

Une confirmation des résultats présentés au Tableau 5, et une démonstration plus directe de l'intégration du provirus de N2 dans le génome des cellules SMF-Da infectées fut obtenue par l'étude de l'ADN des cellules. Une analyse Southern avec une sonde LTR (du virus de Moloney) a été réalisée pour: 1) une tumeur SMF-Da; 2) une tumeur DaN2; 3) des clones de DaN2 (clones cl.1, cl.4, cl.7 et cl.9 provenant de pétris infectés de l'expérience B); et 4) pour les ADN des populations de 4 pétris de cellules infectées de l'expérience C. Des bandes qui représentent des intégrations virales dans le génome des cellules infectées sont visibles (environ 20 par clone) à la Figure 4. Pour les populations non clonales de DaN2 de l'infection C, on observe moins de bandes (le taux d'infection est beaucoup plus bas - environ la moitié de celui de l'infection A et B tel que résumé dans le Tableau 5).

Figure 4: Buvar dage selon Southern des cellules DaN2

Le marqueur (M) utilisé est le λ DNA/Hind III marqué au dCTP-³²P pour en faciliter la détection sur les films. Le contrôle négatif de l'analyse avec la sonde LTR consiste en l'ADN des cellules non mutées SMF-Da provenant d'une tumeur précoce formée après injection des cellules SMF-Da (1). Par contre, la sonde LTR a détecté plusieurs bandes d'intégration virales dans tous les ADN des cellules SMF-DaN2 (2 à 10). Ces populations incluent 4 clones isolés des pétris de l'infection B (3, 4, 5, 6) et l'ADN provenant du mélange de 4 populations (4 pétris) de l'infection C (7, 8, 9, 10). Tous les ADNs ont été digérés avec les enzymes de restriction EcoRI et HindIII tel que décrit dans la section 3.6.2.

FIGURE 4: Analyse par buvardage Southern des cellules DaN2



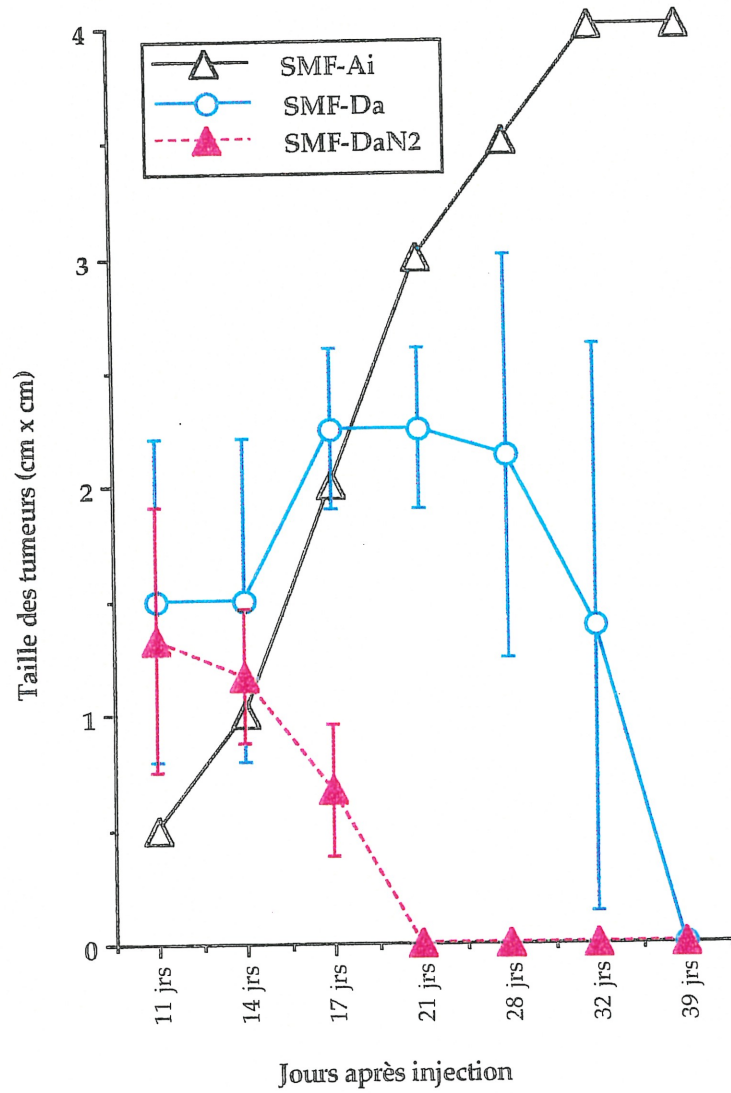
iii - Expériences de métastase spontanée des SMF-DaN2 chez des rats syngénétiques

A - Expérience d'injection A

Un total de 21 rats Fischer ont été injectés avec des cellules incluant 3 contrôles positifs qui ont reçu une injection de cellules SMF-Ai, et 3 contrôles négatifs qui ont reçu une injection de cellules SMF-Da non mutées. Chaque animal (contrôle et test) a reçu 5×10^6 cellules. Les résultats du suivi de la taille tumorale sont présentés à la Figure 5. Comme prévu, le développement tumoral chez les animaux injectés avec SMF-Ai était continu et égal pour les 3 animaux, atteignant des volumes de 4 x 4 centimètres au jour 32 après l'injection (Fig.5, SMF-Ai). Dix jours après l'injection, 2 des 3 des animaux injectés avec des cellules SMF-Da avaient développé des tumeurs précoces ayant atteint des volumes d'environ 1 à 2 cm x 2 cm, mais celles-ci ont régressé pour disparaître à 39 jours après l'injection (Fig.5, SMF-Da). 3 des 15 animaux injectés avec les cellules SMF-DaN2 ont montré des signes de développement tumoral sous forme de petites tuméfactions mais chacune de ces tumeurs précoces a régressé avant le jour 21 post-injection (Fig. 5, SMF-DaN2). Un des 3 animaux injectés avec les cellules SMF-Da et 12 des 15 animaux injectés avec les cellules SMF-DaN2 n'ont jamais développé de tumeurs (résultats non indiqués sur la Figure 5). Donc, l'intégration du virus N2 dans les cellules SMF-DaN2 n'a pas induit le phénotype métastasant par l'essai de métastase spontanée.

Figure 5: Expérience de métastase spontanée des SMF-DaN2 chez des rats syngéniques. 21 rats Fischer incluant 3 contrôles positifs et 3 contrôles négatifs ont été injectés avec des cellules tumorales. La courbe noire (triangles ouverts) représente des animaux injectés avec SMF-Ai, la courbe bleue (cercles ouverts) des animaux injectés avec SMF-Da et la courbe rouge (triangles remplies) les animaux injectés avec les cellules infectées SMF-DaN2. Seules les animaux injectés avec les cellules SMF-Ai ont développé des métastases.

Figure 5: Tumorigénicité des cellules SMF-Ai (groupe contrôle +), SMF-Da (groupe contrôle) et SMF-DaN2

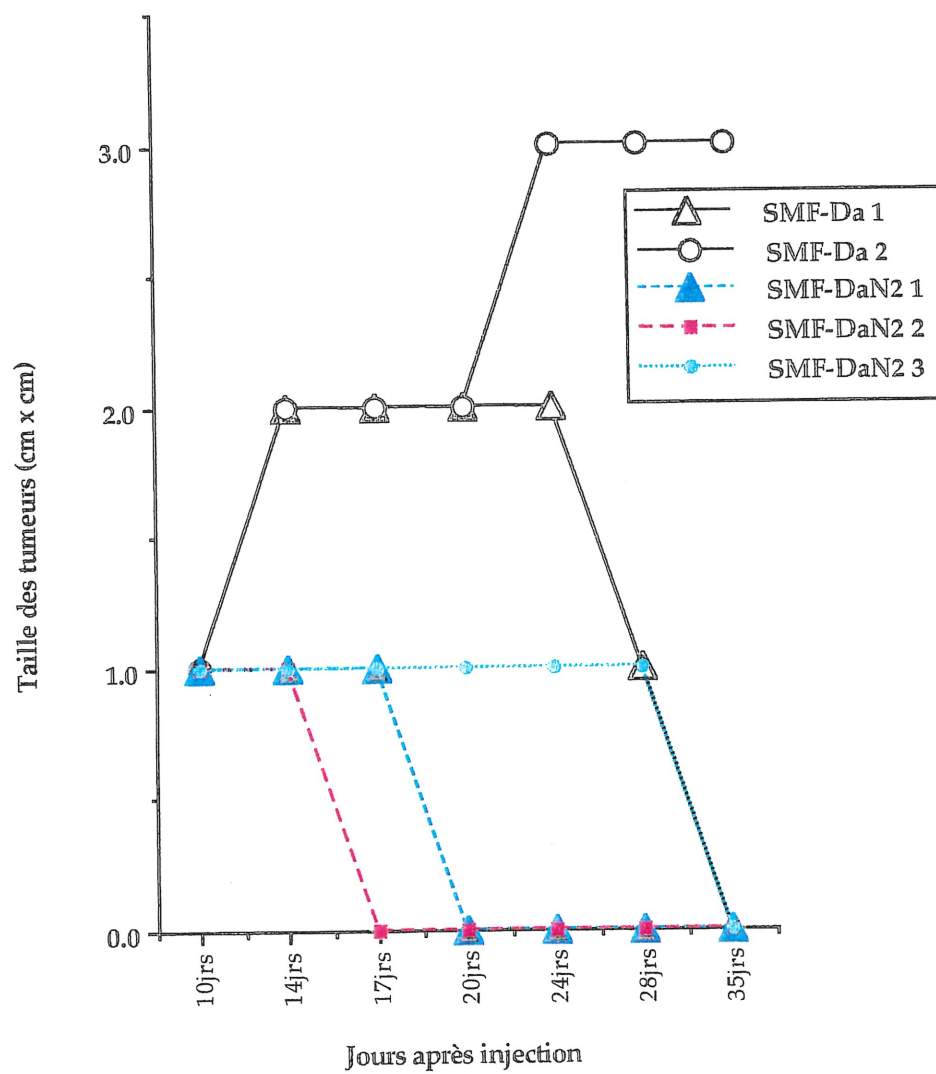


B - Expérience d'injection B

Un total de 15 rats ont été injectés incluant 3 contrôles qui ont reçu une injection de cellules SMF-Da non mutées. Chaque animal (contrôle et test) a reçu 5×10^6 cellules. 12 animaux ont reçu des cellules SMF-DaN2 sélectionnées pour leur rétention élevée de Rhodamine 123 (cellules décrites dans la section 4.2.1). Les résultats du suivi de la taille tumorale figurent à la Figure 6. Chacun des trois animaux contrôles injectés avec SMF-Da a développé des tumeurs précoces dès le jour 10 post-injection, mais 2 des 3 tumeurs ont ensuite totalement régressé au jour 35 après injection (Fig. 6, SMF-Da 1). La troisième tumeur induite par les SMF-Da avait atteint un volume de 3 x 3 centimètres au jour 23 après injection, l'animal a été sacrifié au jour 35. Un échantillon de la tumeur a été mis en culture et un autre a été congelé en azote (Fig. 6, SMF-Da 2). De cet échantillon de tumeur l'ADN a été extrait et analysé par buvardage Southern (Figure 4, #1). 3/12 des rats injectés avec les cellules SMF-DaN2 ont développé des tumeurs précoces au jour 10 après injection mais celles-ci ont régressé au jour 20 après injection (Fig. 6, SMF-DaN2 1), et 5/12 des rats injectés avec les cellules SMF-DaN2 ont développé des tumeurs précoces entre les jours 10 et 14 après injection, 4 de celles-ci ayant régressé au jour 17 après injection (Fig. 6, SMF-DaN2 2). Une biopsie a été faite de la cinquième tumeur (SMF-DaN2 3) avant sa régression au jour 35, l'ADN a été extrait et analysé par buvardage Southern (Figure 4, #2). 3 de 12 des rats injectés avec les cellules SMF-DaN2 n'ont pas développé de tumeurs (résultats non indiqués sur la Figure 6). Aucune métastase n'a été observée.

Figure 6: Expérience de métastase spontanée des SMF-DaN2 chez des rats syngéniques. 15 rats Fischer incluant 3 contrôles ont été injectés avec des cellules tumorales. La courbe noire (triangles ouverts) représente des animaux injectés avec SMF-Da. Toutes les courbes suivantes sont des animaux injectés avec des cellules SMF-DaN2 sélectionnées pour leur forte rétention de Rhodamine 123. La courbe noire (cercles ouverts) l'animal injecté avec SMF-Da qui a développé une tumeur persistante, la courbe bleue (triangles remplis) les animaux injectés avec SMF-DaN2 dont les tumeurs ont régressé au jour 20 post injection, la courbe rouge (petits carrés remplis) les animaux injectés avec SMF-DaN2 dont les tumeurs ont régressé au jour 17 post injection et la courbe bleue pâle (petits cercles remplis) l'animal dont une biopsie a été faite de la tumeur avant sa régression au jour 35 post injection.

Figure 6: Tumorigénicité des cellules SMF-Da (groupes contrôles 1 et 2) et SMF-DaN2



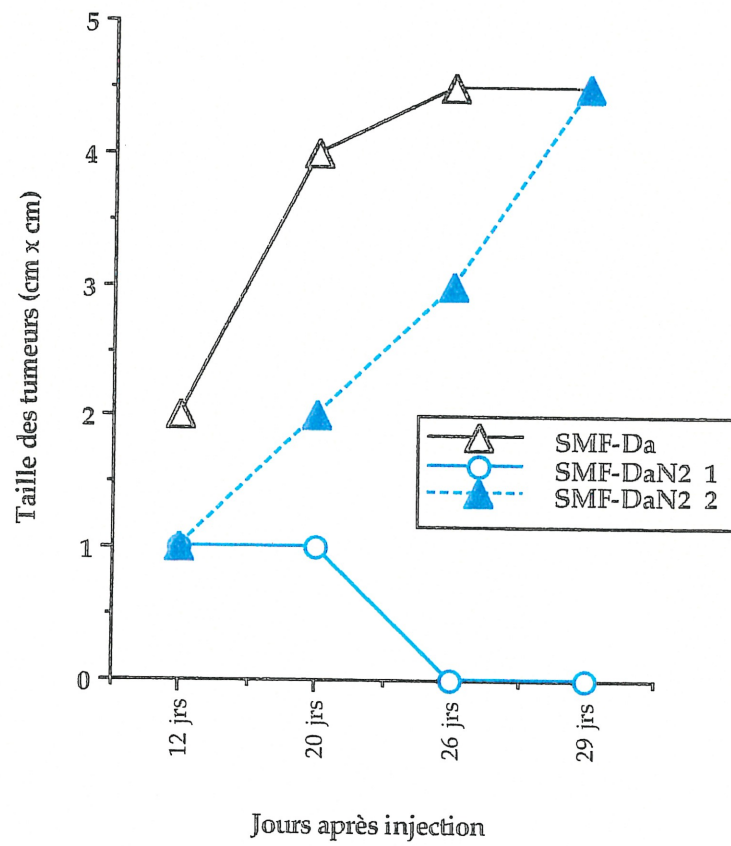
C - Expérience d'injection C

Un total de 14 rats ont été injectés avec des cellules incluant 2 animaux contrôles négatifs qui ont reçu une injection de cellules SMF-Da non mutées. 12 rats ont reçu une injection de 5×10^6 cellules SMF-Da mutées et sélectionnées pour leur forte rétention de Rhodamine 123. Chaque animal (contrôle et test) a reçu 5×10^6 cellules. Les résultats du suivi de la taille tumorale sont présentés à la Figure 7. Deux animaux contrôles ont présenté un développement tumoral identique (Fig. 7, SMF-Da). Ils ont développé, au jour 12 après injection, des tumeurs précoces atteignant un volume assez important qui a nécessité le sacrifice des animaux. À l'examen de ces tumeurs, des signes de régression (infiltrats de lymphocytes et de monocytes) étaient évidents. Un faible degré d'invasion intercellulaire dans les fibres musculaires fut observé pour les cellules d'une des tumeurs mais aucune invasion transcellulaire, métastase ganglionnaire ou pulmonaire n'a été observée pour ces animaux. 5 des 12 rats ayant reçu SMF-DaN2 ont développé des tumeurs précoces vers le jour 12 post-injection. Dans trois de ces rats, des tumeurs étaient palpables pendant moins de trois semaines avant de régresser (Fig. 7, SMF-DaN2; 1), les 2 dernières tumeurs n'ont pas régressé ce qui a nécessité le sacrifice de ces animaux au jour 29 post-injection (Fig. 7, SMF-DaN2; 2). Il n'y avait cependant aucune métastase ganglionnaire ou pulmonaire chez ces animaux mais les cellules d'une des tumeurs montraient un début d'invasion intercellulaire. Les 7 autres rats ayant reçu SMF-DaN2 n'ont pas développé de tumeurs. Des échantillons de chaque population de cellules SMF-DaN2 ont été analysés avant injection

par hybridation sur filtre Southern et les résultats sont illustrés à la Figure 4 (Fig. 4, #7, 8, 9 et 10). La présence d'intégrations virales a été révélée en utilisant la sonde LTR-Moloney.

Figure 7: Expérience de métastase spontanée des SMF-Da chez des rats syngéniques. 14 rats Fischer incluant 2 contrôles négatifs ont été injectés avec des cellules tumorales. La courbe noire (triangles ouverts) représente deux animaux injectés avec SMF-Da (contrôles négatifs). La courbe bleue (cercles ouverts) représente trois animaux injectés avec des cellules SMF-DaN2 sélectionnées pour leur forte rétention de Rhodamine 123 qui ont développé des tumeurs qui ont régressé trois semaines après injection. La courbe bleue (triangles remplis) les animaux injectés avec SMF-DaN2 dont les tumeurs n'ont pas régressé ce qui a nécessité le sacrifice des animaux. Aucun animal a développé des métastases. 7 rats qui n'ont jamais développé de tumeurs ne sont pas indiqués sur la Figure 7.

Figure 7: Tumorigénicité des cellules SMF-Da (groupe contrôle) et SMF-DaN2



4.1.2 - Mutagenèse rétrovirale avec le virus Moloney

Nous avons choisi de muter la lignée cellulaire SMF-Da β -gal pour les prochaines infections afin d'augmenter les chances de repérer *in vivo* des cellules mutantes même en très petits nombres grâce à la présence de l'enzyme β -galactosidase dans cette lignée transfectée. La technique de détection de cellules transfectées avec la β -gal par la méthode X-gal est décrite en détail dans la section 4.2. La lignée transfectée SMF-Da β -gal est comparée à la lignée parentale SMF-Da dans la section 4.2.2 ii ci-dessous. Pour ces expériences, le virus infectieux Moloney (M-MuLV) a été employé. Ce virus est apparenté au virus N2 qui dérive du virus Moloney (voir section 1.2.3 iii). À l'exception de certaines différences d'ordre technique (titration du virus, mesure de l'efficacité de l'infection) l'approche de mutagenèse avec le virus Moloney demeure essentiellement la même qu'avec N2.

i - Production du virus Moloney

La technique de titration du virus Moloney (test XC) est décrite en détail dans la section 3.4.1 ii. Ce test ne peut servir comme test de titration que pour les virus écotropiques à cause de la nature des cellules XC (voir section 3.2.2 ii, Rowe et al. 1970). Chaque lot de production virale a été titré deux fois. Les titres des lots du virus Moloney (de l'ordre de 2 à 3 x 10⁸ pfu par ml de milieu - voir le Tableau 6) sont beaucoup plus élevés que ceux obtenus pour le virus déficient N2.

TABLEAU 6: Titration des productions virales de Moloney par le test XC

Production virale	Dilution du virus	Volume utilisé	# de syncytia	Titre en pfu/ml
140394	1:50,000 ^a	200 µl	992.0	2.5 x 10 ⁸
140394	1:50,000 ^b	200 µl	806.0	2.0 x 10 ⁸

Explications: a: première titration des stocks viraux
 b: deuxième titration des stocks viraux

Tableau 6: Tableau résumant les deux titrations de la production de virus de Moloney par les cellules NIH-3T3-Moloney. La production de ce virus est décrite dans la section 3.4.1. La production de virus a été titrée deux fois et un résultat représentatif de chaque titration est présenté.

ii - Taux des infections par test Rt pour la détection de l'enzyme transcriptase inverse

Puisque le virus Moloney ne contient pas dans son génome le gène de résistance à la néomycine (G418), nous ne pouvions utiliser la G418 ni pour établir le taux d'infection de nos cellules mutées, ni pour sélectionner les cellules infectées. Nous avons donc évalué les surnageants des cellules infectées pour la présence de l'enzyme virale transcriptase inverse; en effet, celle-ci devrait être présente dans le surnageant de culture lorsqu'une population de cellules est infectée par un virus compétent pour la réplication, comme c'est le cas pour le virus de Moloney. Une trousse (Boehringer Mannheim) utilisant la méthode d'Élisa et utilisant l'enzyme

transcriptase inverse a servi à l'établissement d'une courbe standard. Toutes les lignées cellulaires infectées avec les rétrovirus contenaient l'enzyme transcriptase inverse dans les surnageants de culture indiquant la réplication du virus dans les cellules (Figure 8).

Figure 8: Détection de l'activité de la Transcriptase Inverse dans les surnageants de cellules SMF-Da β -galMoloney

En utilisant l'enzyme Transcriptase inverse de HIV-1 fournie par la trousse d'Élisa (Boehringer-Mannheim), une courbe standard a été établie. Nous avons tracé une droite (curve-fitting) et l'avons utilisée pour mesurer les niveaux de l'enzyme transcriptase inverse dans chaque surnageant cellulaire (a, b, c et d sur la ligne droite). Un résultat nettement supérieur à celui obtenu avec le standard sans RT (l'échantillon blanc) est considéré comme indiquant de la présence du virus - sur la figure 8, ce résultat est équivalent à une absorbance de 0.055.

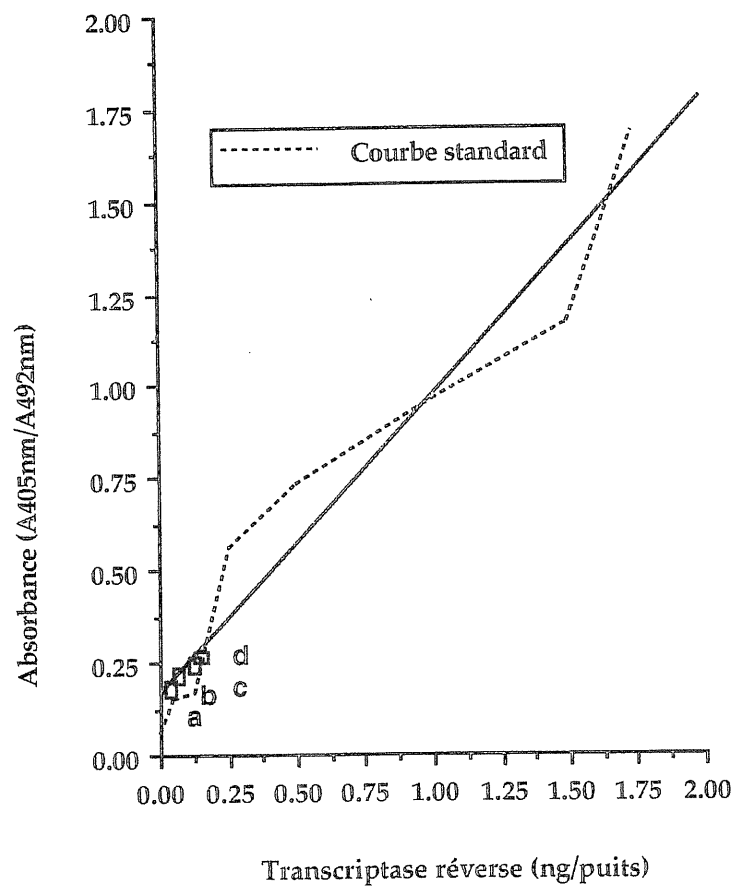
a) Surnageant de cellules non infectées SMF-Da (absorbance de 0.074).

b) Surnageant de cellules non infectées SMF-Ai (absorbance de 0.072).

c) Surnageant de cellules SMF-Da β -gal infectées avec le virus de Moloney (absorbance de 0.148).

d) Surnageant de cellules NIH-3T3 infectées et productrices du virus de Moloney (absorbance de 0.227).

Figure 8: Détection de l'activité de la Transcriptase Réverse dans les surnageants de cellules SMF-Daβ-galMoloney



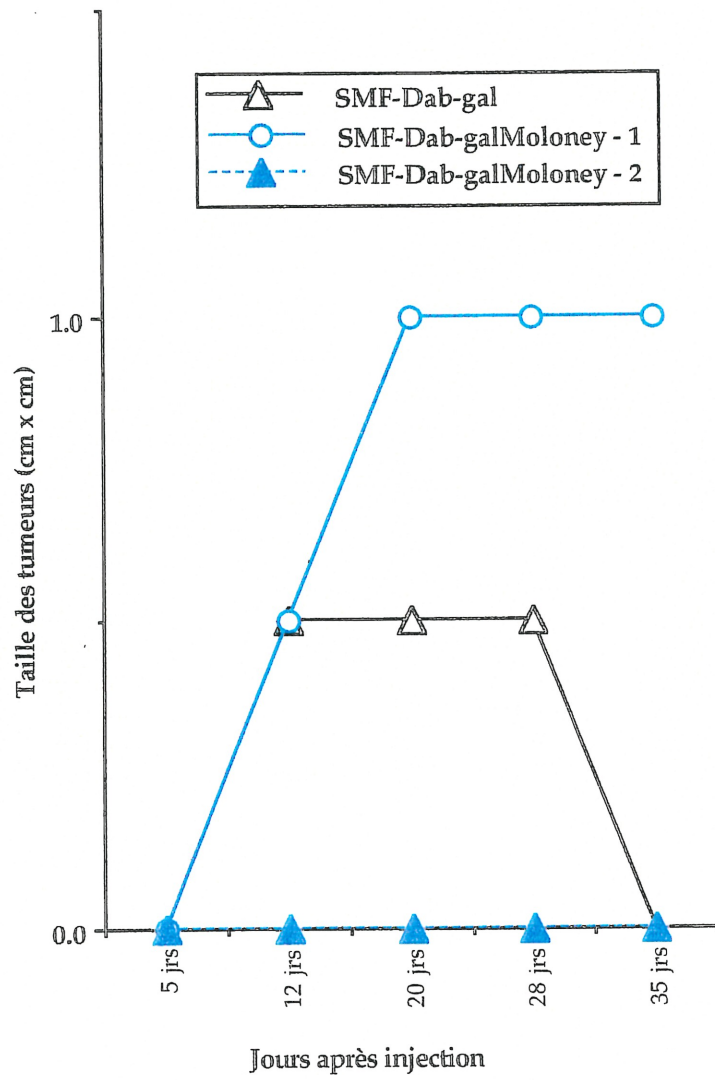
iii - Expériences de métastase spontanée des SMF-Daβ-galMoloney chez des rats syngénétiques

D - Expérience d'injection D

Un total de 18 rats Fischer dont 3 contrôles ont été injectés avec les cellules SMF-Daβ-gal non mutées et 15 animaux avec les cellules infectées SMF-Daβ-galMoloney. Chaque animal (contrôle et test) a reçu 5×10^6 cellules par lignée cellulaire. Les résultats du suivi de la taille tumorale sont résumés dans la Figure 9. Un animal du groupe contrôle a développé une petite tumeur précoce qui a rapidement régressé (Fig. 9, SMF-Daβ-gal). 14/15 des animaux injectés avec les cellules mutées n'ont pas montré de développement tumoral (courbe SMF-Daβ-galMoloney-2). 1 seul animal injecté avec les cellules SMF-Daβ-galMoloney a développé une petite tumeur d'une taille de 1 cm x 1 cm détectable 20 jours après l'injection, mais cette tumeur a persisté (Fig. 9, SMF-Daβ-galMoloney-1). Nous avons effectué une biopsie de la tumeur au jour 35 après injection et les cellules tumorales ont été mises en culture. Les cellules de la tumeur ont été aspirées dans une seringue en insérant une petite aiguille stérile directement dans la tumeur. L'animal est mort subitement 3 jours après la ponction aspiratrice. À l'autopsie aucune métastase n'a pu être détectée chez l'animal. Les surnageant de cellules extraites de la tumeur démontraient une activité de l'enzyme transcriptase inverse indiquant la présence du rétrovirus. Les cellules extraites de la tumeur persistante induite par les SMF-Daβ-galMoloney ont été réinjectées à une autre série d'animaux (expérience de réinjection F).

Figure 9: Expérience de métastase spontanée des SMF-Da β -gal chez des rats syngéniques. 18 rats Fischer incluant 3 contrôles négatifs ont été injectés avec des cellules tumorales. La courbe noire (triangles ouverts) représente l'animal contrôle injecté avec SMF-Da β -gal qui a développé une petite tumeur qui a régressé. Les deux autres rats injectés avec SMF-Da β -gal ne sont pas représentés sur la figure. La courbe bleue (cercles ouverts) représente l'animal injecté avec SMF-Da β -galMoloney qui a développé une petite tumeur dont une biopsie a été faite. Les 14 rats injectés avec SMF-Da β -galMoloney sont représentés par la courbe bleue (triangles fermés).

Figure 9: Tumorigénicité des cellules SMF-Daβ-gal (groupe contrôle) et SMF-Daβ-galMoloney

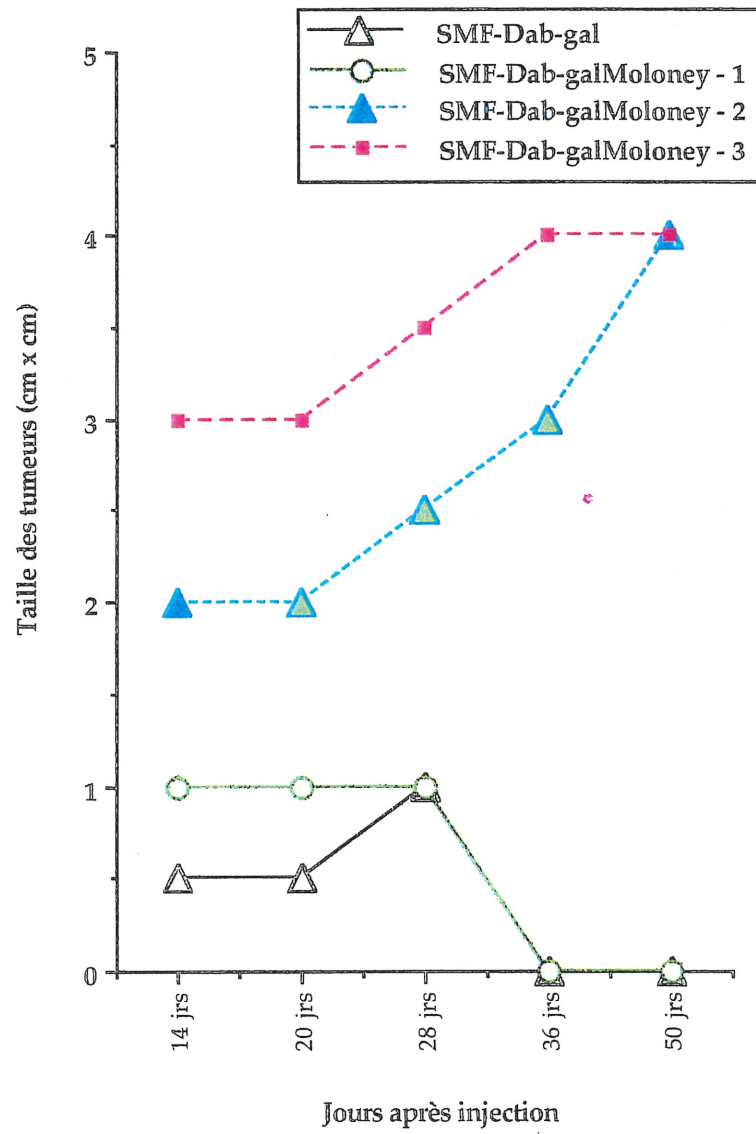


E - Expérience d'injection E

Un total de 31 animaux incluant 3 contrôles ont été injectées avec les cellules SMF-Daβ-gal non infectées et 28 avec les cellules SMF-Daβ-gal infectées. Les résultats du suivi de la taille tumorale sont illustrés à la Figure 10. Les animaux du groupe contrôle ont développé de petites tumeurs précoces au jour 14 après injection mais celles-ci ont régressé (Fig. 10, SMF-Daβ-gal). 11 des 28 animaux injectés avec les cellules SMF-Daβ-galMoloney ont développé de petites tumeurs précoces qui ont régressé au jour 36 après injection (SMF-DaβgalMoloney-1). 2 des 28 animaux ont développé des tumeurs au jour 14 après injection et ces tumeurs ont atteint un volume de 4 x 4 centimètres au moment du sacrifice des animaux au jour 50 (Fig. 10, SMF-DaβgalMoloney-2). Ces tumeurs montraient des zones de nécrose et d'hémorragies mais aucune métastase n'a été détectée aux poumons. Un animal sur 28 a développé une tumeur qui a atteint un volume important nécessitant le sacrifice de cet animal à 50 jours après injection (Fig. 10, SMF-DaβgalMoloney-3). Cette tumeur montrait des signes de nécrose et de régression mais aucune métastase n'a été détectée. Les cellules extraites de la tumeur ont été réinjectées à une autre série d'animaux (expérience de réinjection F). Ces deux derniers résultats (SMF-DaβgalMoloney-2 et -3) représentent la plus longue persistance de tumeurs que nous ayons observée lors de nos expériences de mutagenèse. Enfin, 14 des 28 des animaux injectés avec les cellules mutées n'ont pas développé de tumeurs (résultats non indiqués).

Figure 10: Expérience de métastase spontanée des SMF-Daß-gal non infectées et infectées chez des rats syngénétiques. 31 rats Fischer incluant 3 contrôles négatifs ont été injectés avec des cellules tumorales. La courbe noire (triangles ouverts) représente les animaux contrôles injectés avec SMF-Daß-gal qui ont développés des petites tumeurs qui ont régressé. La courbe verte (cercles ouverts) représente les 11 animaux injectés avec SMF-Daß-galMoloney qui ont développés des petites tumeurs qui ont régressé. La courbe bleue (triangles fermés) représente les 2 rats injectés avec SMF-Daß-galMoloney qui ont développé des tumeurs et qui ont dû être sacrifiés à cause du volume de ces tumeurs. La courbe rouge représente l'animal injecté avec SMF-Daß-gal qui a développé une tumeur non régressive et dont les cellules de cette tumeur ont été réinjectées à une autre série de rats (expérience F). Les 14 rats injectés avec SMF-Daß-galMoloney sont représentés par la courbe bleue (triangles fermés).

Figure 10: Tumorigénicité des cellules SMF-Daβ-gal (groupe contrôle) et SMF-Daβ-galMoloney



F - Expérience de réinjection F

Tel que décrit dans les sections précédentes, les cellules des deux tumeurs qui avaient persisté jusqu'au 50^{ième} jour après l'injection ont été mises en culture au moment du sacrifice. Ces deux tumeurs, provenant l'une de l'expérience D (Fig. 9, SMF-DaßgalMoloney-1), l'autre de l'expérience E (Fig. 10, SMF-DaßgalMoloney-3), ont été maintenues en culture afin de pouvoir les réinjecter à d'autres animaux syngénétiques. Chaque réinjection a été effectuée chez 3 animaux. Les résultats apparaissent à la Figure 11. Pour cette Figure, les cellules de la tumeur de l'expérience D sont appelées "cellules tumeur #1" et celles de la tumeur de l'expérience E sont appelées "cellules tumeur #2". Des tumeurs précoces ont été observées chez 2 des 3 animaux injectés avec les cellules de la tumeur #1, et chez 1 sur 3 des animaux injectés avec les cellules de la tumeur #2 quoique cette petite tumeur précoce ait rapidement régressé par la suite. Une des deux tumeurs induites par les cellules de la tumeur #1 a atteint un volume de 3 cm x 3 cm au jour 48 après injection, et l'animal a dû être sacrifié lorsqu'il a montré de la difficulté à marcher. La tumeur montrait des signes de nécrose et de régression mais il y avait persistance de petites régions viables de croissance cellulaire sans nécrose. Les cellules de cette tumeur ont été mises en culture et l'ADN a été analysé confirmant la présence de provirus de Moloney (Fig. 12). Aucun des animaux ne montrait de métastases aux poumons.

Figure 11: Expérience de métastase spontanée des cellules tumorales extraites de deux tumeurs induites par injection des cellules SMF-Daß-galMoloney. 9 rats Fischer incluant 3 contrôles négatifs (ayant reçu une injection de cellules SMF-Daß-gal) ont été injectés avec des cellules tumorales. La courbe noire (triangles ouverts) représente les animaux contrôles injectés avec SMF-Daß-gal qui n'ont pas développé de tumeurs. La courbe bleue (triangles fermés) représente les résultats chez le rat injecté avec les cellules SMF-Daß-galMoloney extraites de la tumeur de l'expérience d'injection E qui a développé une petite tumeur qui a régressé. L'autre courbe bleue (cercles ouverts) représente les résultats chez le rat injecté avec les cellules extraites de la tumeur de l'expérience D qui a développé des tumeurs non régressantes.

Figure 11: Tumorigénicité des cellules SMF-Da (groupe contrôle) et des cellules provenant de deux tumeurs de SMF-Da β -galMoloney

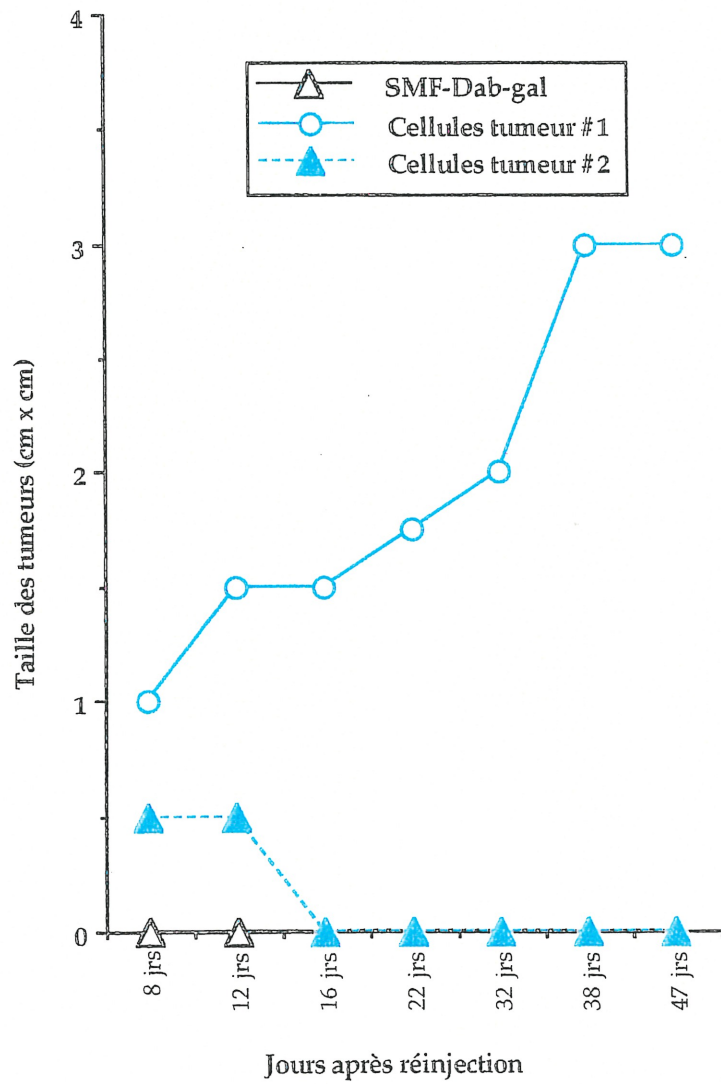
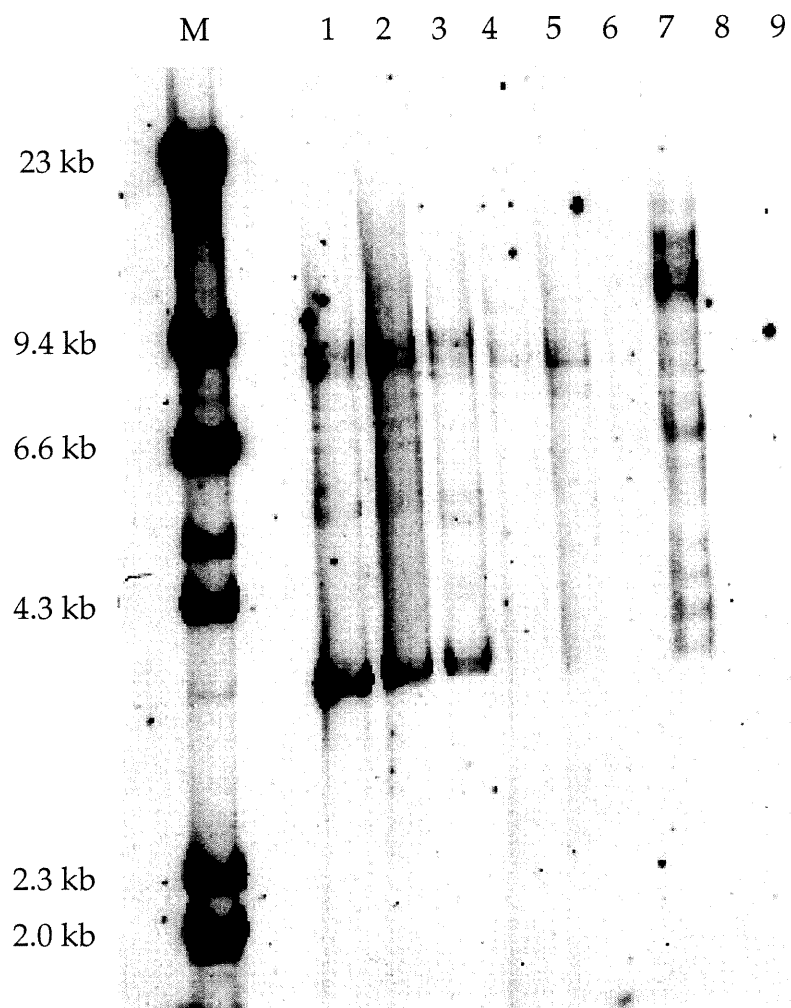


Figure 12: Buvarpage de Southern des cellules extraites d'une tumeur provoquée par injection des SMF-Da β -galMoloney de l'expérience d'injection E

Le marqueur utilisé est le λ DNA/HindIII marqué au dCTP-³²P. Les contrôles négatifs hybridés avec la sonde pRMo-1 sont les ADNs des cellules non mutées SMF-Da et SMF-Da β -gal (#8 et 9). Les contrôles positifs sont les cellules NIH 3T3 productrices du virus de Moloney (#7). Les ADNs testés ont été extraits de la tumeur #2 (de l'expérience E, #1) ainsi que des clones de la tumeur #2 (#2, 3, 4, 5 et 6). Tous démontrent la présence de bandes d'intégrations virales, et le patron de bandes obtenu semble être identique pour tous les clones, suggérant une origine clonale de la tumeur #2. Ce type de résultat a été observé précédemment par d'autres investigateurs utilisant le virus de Moloney (revu par Tschlis 1987). Tous les ADNs ont été digérés avec les enzymes de restriction EcoRI et HindIII tel que décrit dans la section 3.6.2.

Figure 12 : Analyse par buvardage des cellules Da β -galMoloney

4.2 - Techniques complémentaires pour la sélection de mutants

Nous avons greffé à l'approche de mutagenèse rétrovirale deux autres techniques afin d'augmenter les chances d'isoler de rares mutants phénotypiques. La première de ces techniques, la cytométrie en flux, exploite la propriété de rétention différentielle du fluorochrome Rhodamine 123 (Rho 123), par les cellules des deux lignées de notre modèle (SMF-Ai et SMF-Da). La Rho 123 s'accumule préférentiellement dans les cellules de la lignée SMF-Ai tandis que les cellules de la lignée SMF-Da refoulent efficacement le colorant hors de la cellule. La protéine encodée par les gènes *mdr* murin et humain, la P-glycoprotéine (P170), agit à la façon d'une "pompe" refoulante prévenant l'accumulation de la Rho 123 à l'intérieur des cellules SMF-Da. Puisque le site d'accumulation de la Rho 123 à l'intérieur de la cellule est la mitochondrie, on a suggéré que les cellules retenant le colorant présentent des mitochondries anormales, mitochondries qu'on ne retrouve pas dans les cellules normales (Nadakavukaren et al. 1985).

La deuxième technique repose sur la transfection du gène codant pour l'enzyme bactérien β -galactosidase dans les lignées non métastatiques SMF-Da. L'expression de ce gène rend les cellules bleues suite à l'exposition de la cellule au substrat de l'enzyme (le X-gal). Notre hypothèse suppose que les cellules transfectées seront plus faciles à retrouver surtout si elles sont présentes en petit nombre dans les tissus grâce à l'expression de l'enzyme β -gal.

4.2.1 - La rétention du fluorochrome Rhodamine 123 par les lignées cellulaires

i - Rétention différentielle de la Rhodamine 123 dans les lignées cellulaires SMF-Da et SMF-Ai

Les profils de rétention de la Rhodamine 123 des lignées cellulaires SMF-Da et SMF-Ai apparaissent à la Figure 13. Tel qu'illustré, les cellules SMF-Da ne retiennent pas le colorant (Fig. 13, rouge). Au contraire, les cellules SMF-Ai retiennent très fortement la Rhodamine 123 et montrent un profil de rétention du colorant beaucoup plus élevé (Fig. 13, bleu). Lors des expériences de mutagenèse avec le virus N2, nous avons voulu exploiter la rétention différentielle du fluorochrome dans les deux lignées. À l'aide d'un cytomètre de flux, nous avons trié des cellules SMF-DaN2 présentes dans la zone de rétention pour la Rhodamine 123 qu'occupe normalement les cellules SMF-Ai.

Un exemple représentatif du tri d'une population de cellules SMF-DaN2 apparaît à la Figure 14. Le seuil d'intensité de fluorescence a été ajusté à 10^2 (unités relatives), et toutes les cellules qui retenaient la Rhodamine à un niveau supérieur ont été triées (environ 1.3% de la population), mises en culture, et injectées aux animaux (Expériences de mutagenèse B et C).

Figure 13: Comparaison des profils de rétention de la Rhodamine 123 pour les lignées SMF-Da et SMF-Ai

Graphique supérieur: les cellules SMF-Da sont en rouge, les cellules SMF-Ai sont en bleu.

Graphique inférieur: projection orthogonale des mêmes profils présentés cette fois pour mieux illustrer les différences entre les profils de rétention des deux lignées cellulaires.

L'abscisse représente les unités relatives de fluorescence sur échelle log et l'ordonnée le nombre de cellules détectées.

FIGURE 13: Profils de Rétention de la Rhodamine 123 des Lignées SMF-Da et SMF-Ai

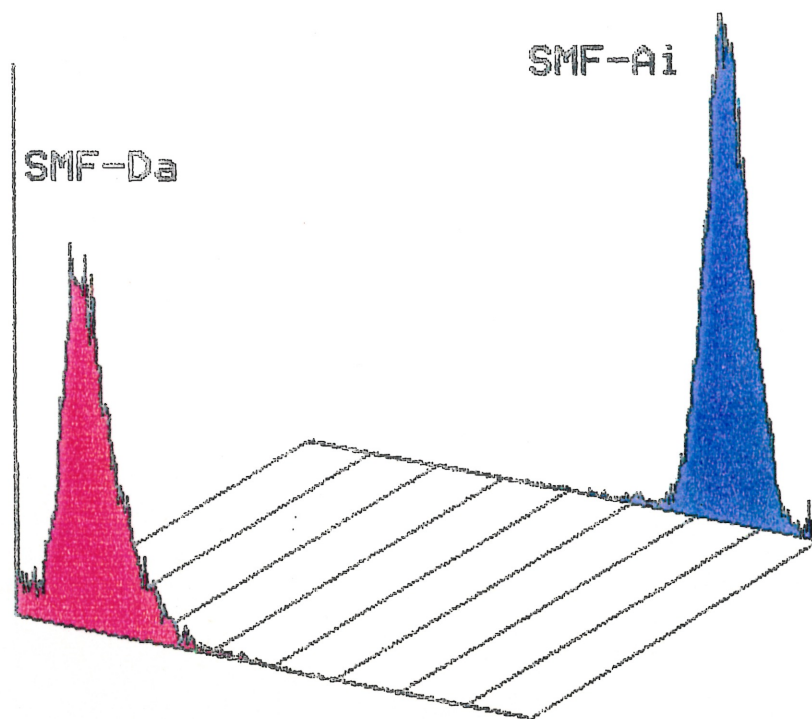
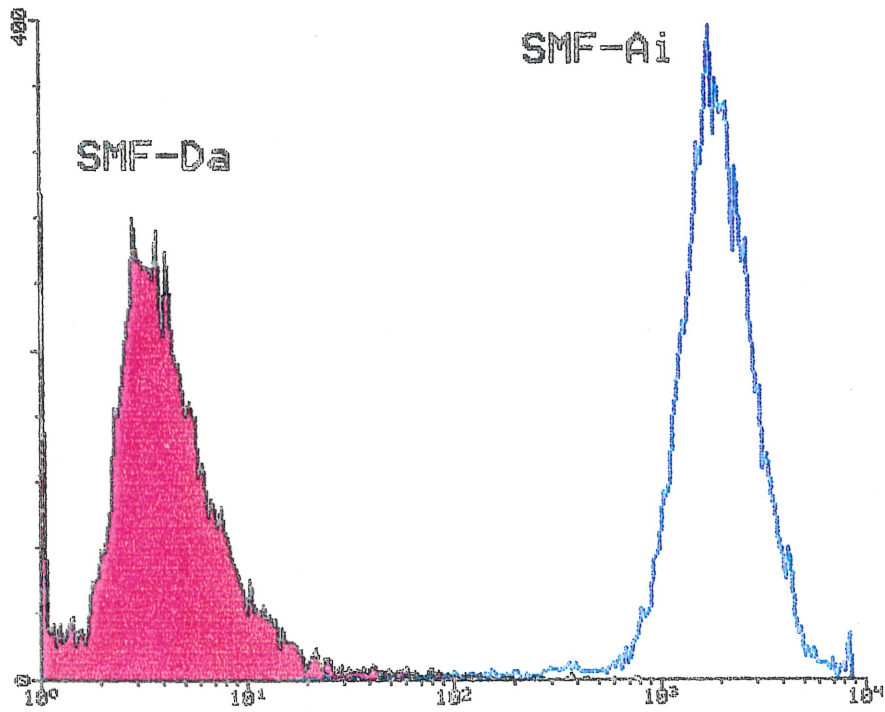
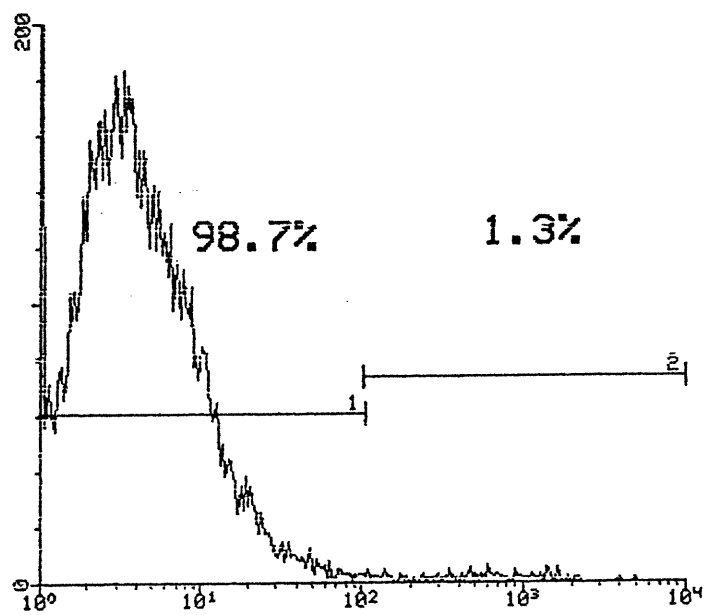


Figure 14: Profil de rétention de la Rhodamine 123 par la lignée SMF-Da lors d'un tri pour isoler les cellules SMF-Da à faible rétention. L'ordonnée représente le nombre de cellules détectées et l'abscisse les unités relatives de fluorescence sur une échelle log.

FIGURE 14: Tri des cellules SMF-DaN2 à forte rétention de la Rhodamine

123



ii - Stabilité du profil de rétention des SMF-Da et SMF-Ai à forte et à faible rétention de la Rhodamine 123

A - Populations et clones de cellules SMF-Da

Nous avons trié des populations de cellules SMF-Da à faible et à forte rétention de Rhodamine 123. Les populations de cellules triées à forte rétention ont été maintenues en culture durant plusieurs mois et la stabilité des profils de rétention évaluée mensuellement pendant 3 à 6 mois. La Figure 15 montre les profils de la rétention pour les populations triées et leurs contrôles respectifs: lignée SMF-Da initiale (rouge) et lignée SMF-Ai à forte rétention (bleu).

Nous avons ensuite établi des clones de cellules appartenant à la population SMF-Da triée à faible et à forte rétention de la Rho 123. Ces clones ont ensuite été testés à intervalles réguliers après le clonage pour contrôler la stabilité de leur profils de rétention. Nous avons observé que tous les clones à faible et à forte rétention de Rho 123 présentaient une grande stabilité de leur profils de rétention (Figure 16A et Figure 16B, respectivement). À la section 4.2.1 ii nous décrivons les résultats d'une expérience d'injection des cellules SMF-Da triées pour la forte rétention de la Rhodamine 123 chez les animaux.

Figure 15: Stabilité du profil de rétention de la Rhodamine 123 pour les populations de cellules SMF-Da triées à forte rétention

Cette figure représente un montage de profils de rétention de 5 populations de cellules différentes.

Profil rouge: SMF-Da non triées

Profil gris: population #1 de SMF-Da triées à forte rétention de la Rho 123

Profil vert: population #2 de SMF-Da triées à forte rétention de la Rho 123

Profil noir: population #3 de SMF-Da triées à forte rétention de la Rho 123

Profil bleu: SMF-Ai non triées

FIGURE 15: Profils de rétention de la Rhodamine par les cellules SMF-Da, SMF-Da triées à forte rétention et SMF-Ai

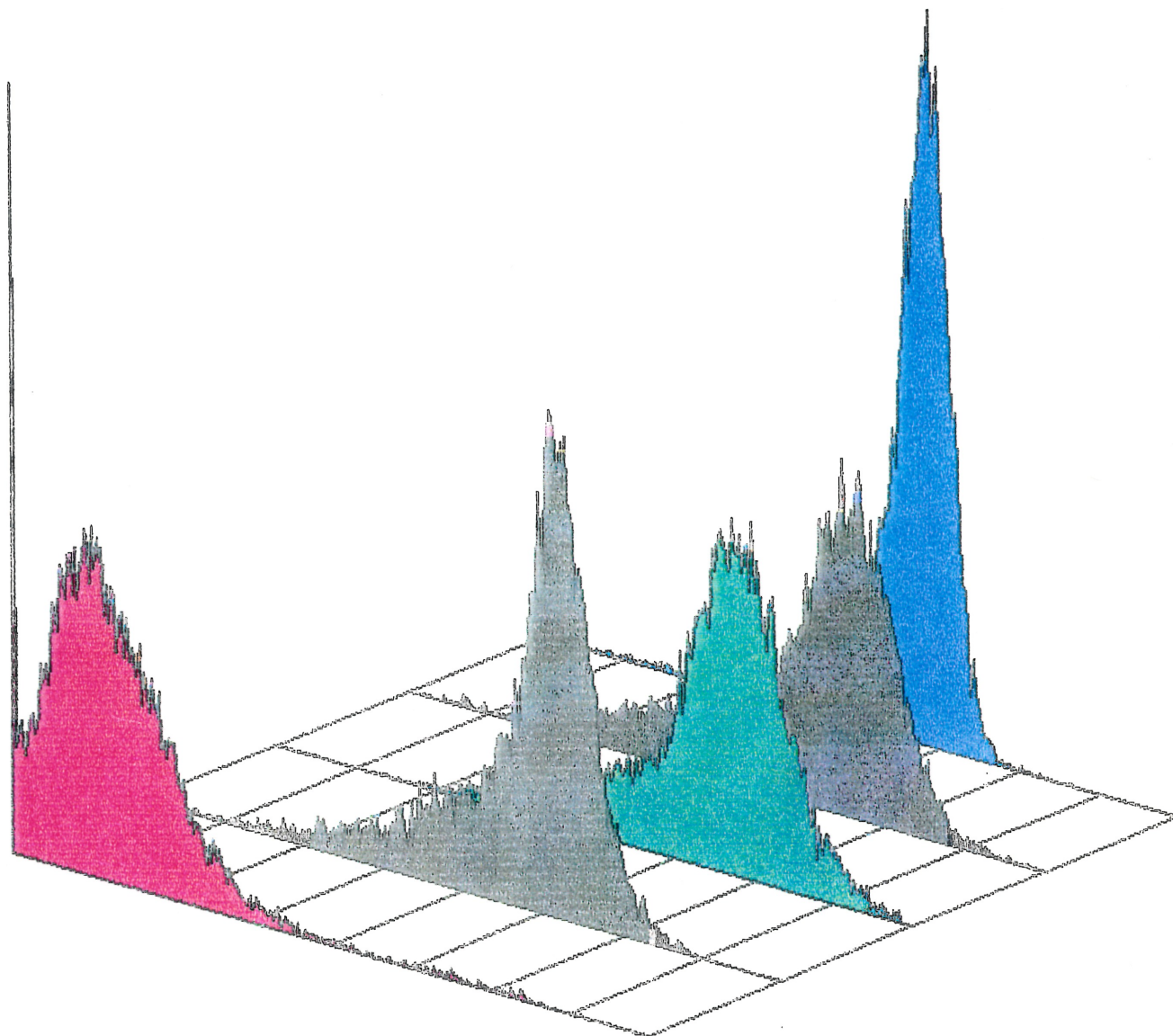


FIGURE 16: Suivi des profils des clones à **(A)** faible et **(B)** forte rétention de SMF-Da

Cette figure représente le suivi des profils de rétention de cellules SMF-Da 3 mois et 4 mois après le tri.

(A): clone SMF-Da trié à faible rétention 3 mois après le tri et le même clone à 4 mois après le tri .

Clone SMF-Da à faible rétention

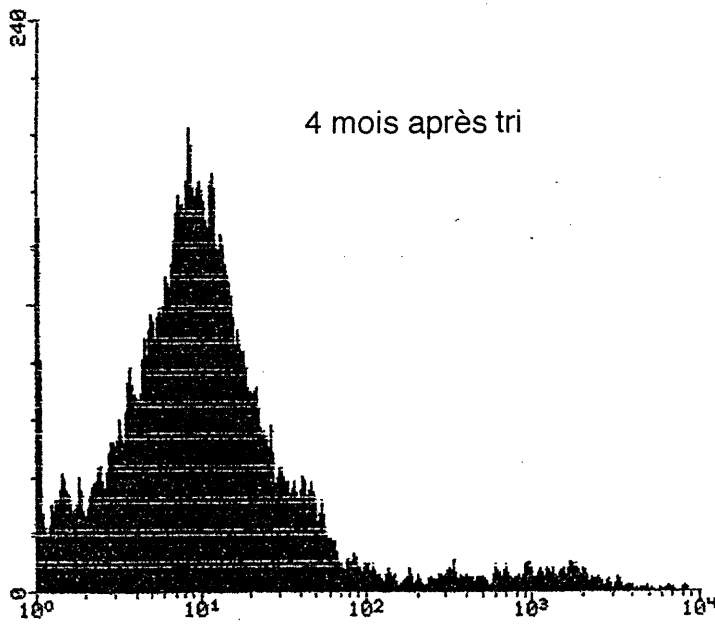
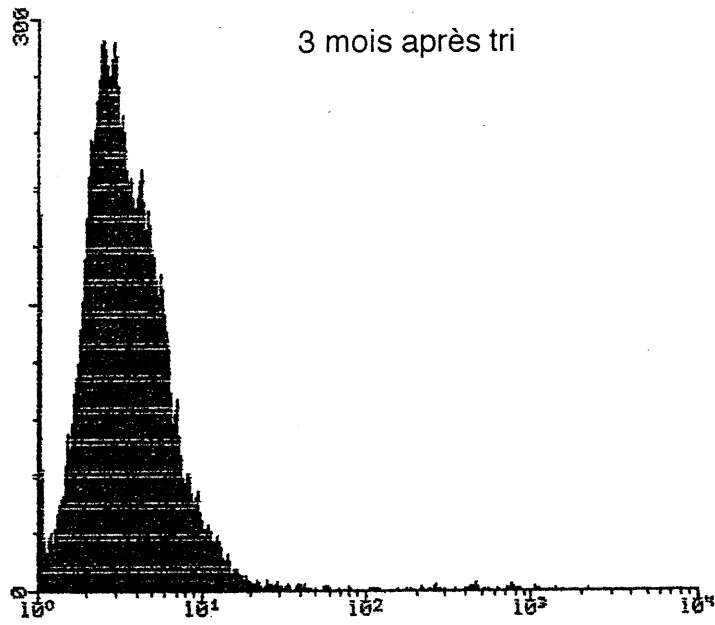
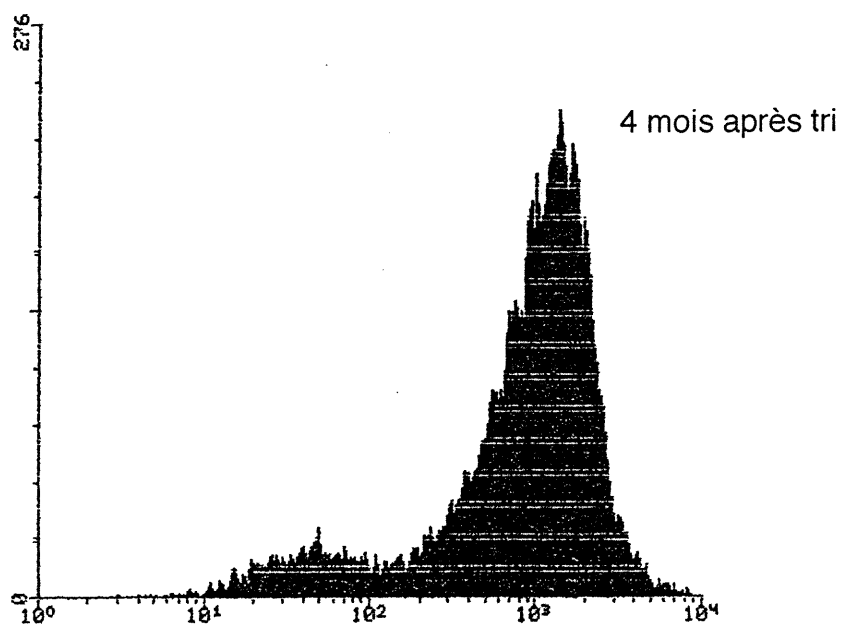
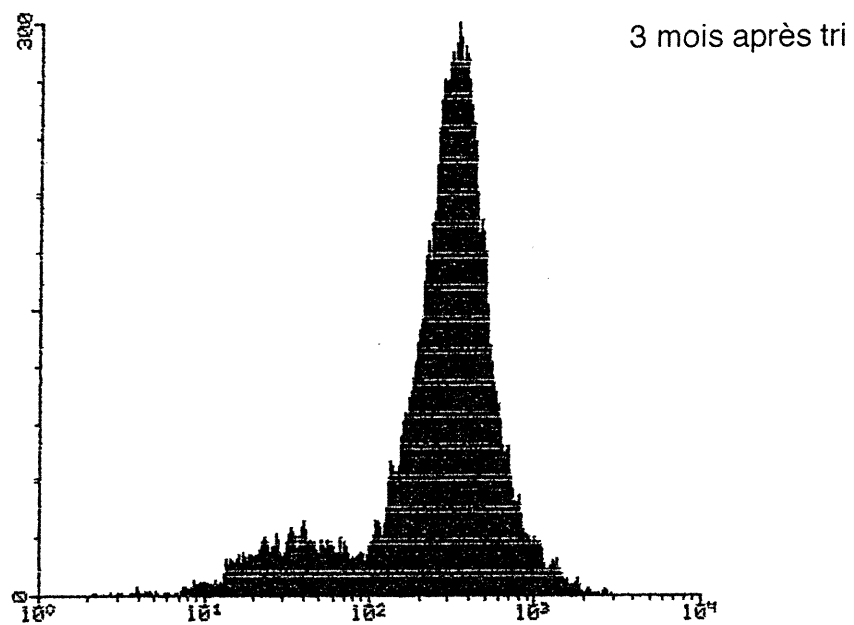


FIGURE 16: Suivi des profils des clones à **(A)** faible et **(B)** forte rétention de SMF-Da

Cette figure représente le suivi des profils de rétention de cellules SMF-Da 3 mois et 4 mois après le tri.

(B): clone SMF-Da trié à forte rétention 3 mois après le tri et le même clone à 4 mois après le tri.

Clone SMF-Da à forte rétention



B - Clones de cellules SMF-Ai

De même, nous avons établi plusieurs clones de la lignée SMF-Ai à partir de cellules triées pour leur rétention différentielle (faible ou forte) de Rho 123. Ces clones ont été maintenus pendant 2 mois et contrôlés pour la stabilité de leur profils de rétention de Rho 123. Aucun des clones à faible rétention ou à forte rétention n'a pu conserver son profil de rétention d'un mois à l'autre. Deux clones représentatifs sont illustrés à la Figure 17. Évidemment, le profil de rétention des SMF-Ai ne se prête guère à un tri pour isoler des populations à rétention différentielle de Rho 123 puisque ces cellules retiennent spontanément le fluorochrome à de hauts niveaux. De plus, les nouveaux clones obtenus sont très instables comme le démontre la variation considérable des profils de rétention. Au contraire, le profil de rétention des SMF-Da a toujours été stable durant le même période.

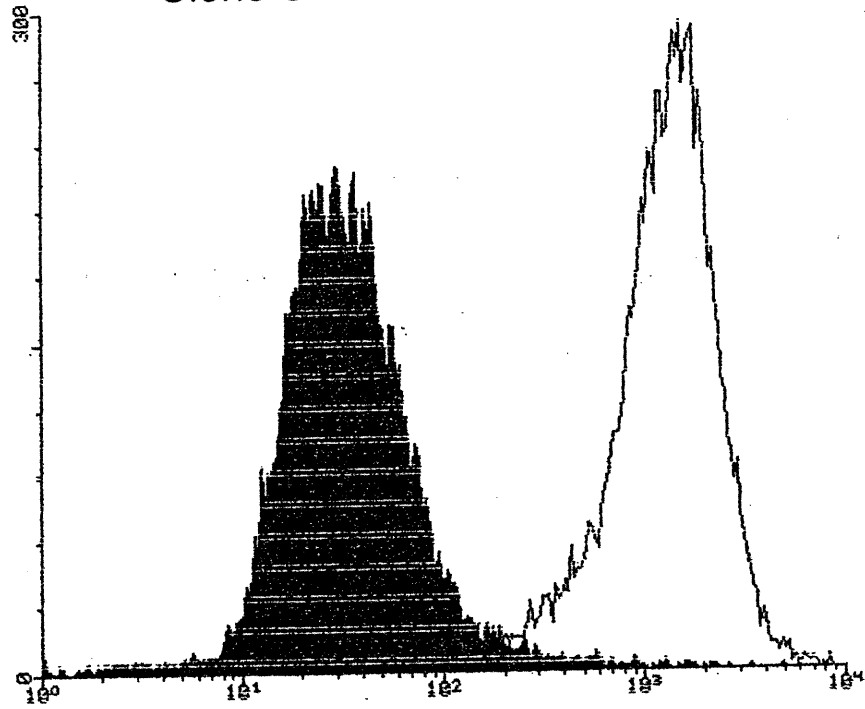
FIGURE 17: Profils des clones à (A) faible et (B) forte rétention de SMF-Ai

Cette figure représente un montage de profils de rétention de 2 populations de cellules SMF-Ai.

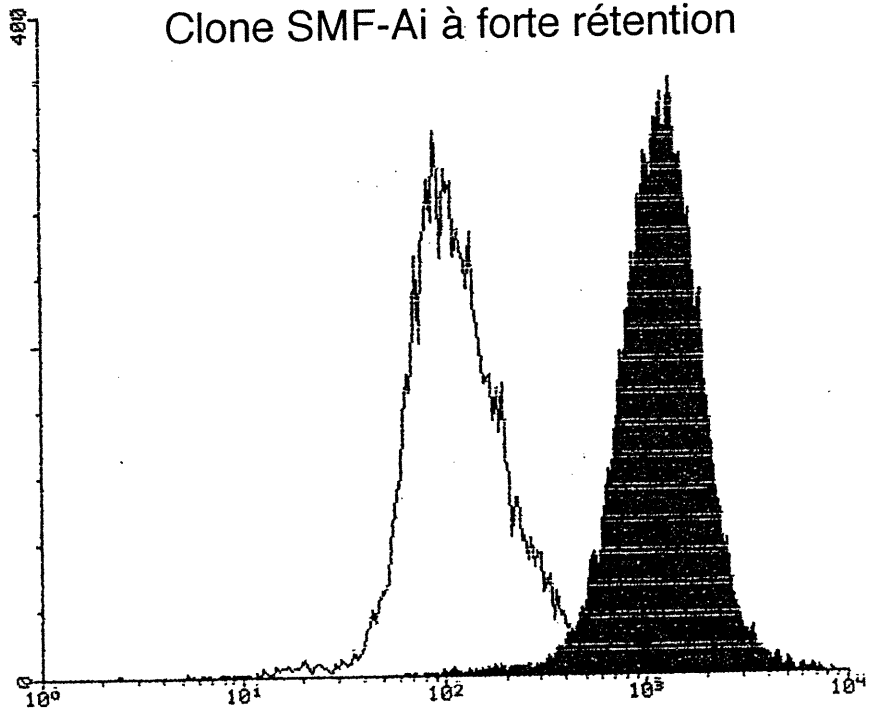
Profil supérieur: juxtaposition d'un clone SMF-Ai trié à faible rétention (profil noir) et le même clone après deux mois de culture (profil blanc).

Profil inférieur: juxtaposition d'un clone SMF-Ai trié à forte rétention (profil blanc) et le même clone après deux mois de culture (profil noir).

Clone SMF-Ai à faible rétention



Clone SMF-Ai à forte rétention

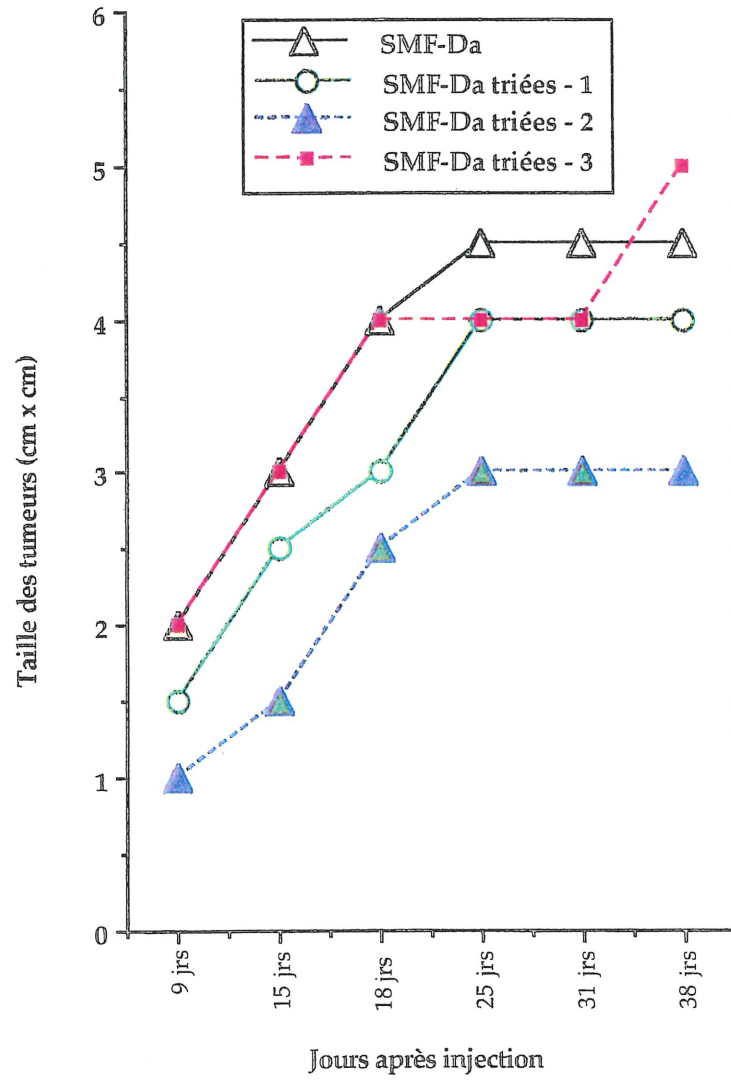


C - Expérience d'injection chez les animaux des populations de cellules SMF-Da triées à forte rétention de la Rhodamine 123

Nous avons réalisé une expérience d'injection de cellules SMF-Da triées à forte rétention de Rho 123. Chacune des 3 populations de SMF-Da à forte rétention a été injectée chez 3 animaux. 3 animaux contrôles ont aussi reçu une injection avec des cellules SMF-Da non triées (contrôle négatif). Tous les animaux ont reçu 5×10^6 cellules. Les résultats du suivi de la taille tumorale apparaissent à la Figure 18. Les 3 animaux contrôles ont développé des tumeurs qui n'ont pas régressé macroscopiquement et ont atteint des volumes de 4.5 cm par 4.5 cm au 25ième jour après l'injection (Fig. 18, SMF-Da). Ceci représente un comportement inattendu pour les SMF-Da. Toutefois, à l'autopsie ces tumeurs présentaient les signes microscopiques habituels de régression. De plus, aucune métastase n'a été détectée. Les 3 populations de cellules SMF-Da triées à forte rétention de Rhodamine 123 ont aussi provoqué la formation de tumeurs. La taille de ces lésions a nécessité le sacrifice de tous les animaux. Malgré ce comportement tumoral, nous n'avons observé aucune métastase. En outre, toutes les tumeurs montraient les signes histologiques attendus de régression.

Figure 18: Expérience de métastase spontanée des cellules tumorales SMF-Da triées à forte rétention de la Rhodamine 123. 12 rats Fischer incluant 3 contrôles négatifs (courbe noire triangles ouverts) qui ont reçu une injection de cellules SMF-Da non sélectionnées pour une forte rétention de Rho 123 ont été injectés avec des cellules tumorales. La courbe bleue (triangles fermés), la courbe verte (cercles ouverts) et la courbe rouge (carrés fermés) représentent les résultats chez des animaux contrôles injectés avec les cellules SMF-Da triées à forte rétention de la Rhodamine 123.

Figure 18: Tumorigénicité des cellules SMF-Da (groupe contrôle) et SMF-Da triées à forte rétention de la Rho123



D - Relation entre l'expression du gène *mdr* par les cellules SMF-Ai, SMF-Da à forte et à faible rétention de la Rho 123 et la rétention du colorant

Nous avons ensuite voulu examiner l'expression du gène *mdr* (multidrug resistance) en relation avec les profils de rétention de la Rhodamine 123 dans les lignées SMF-Da (à faible et forte rétention), et dans les cellules SMF-Ai (forte rétention). Lors d'un premier essai par hybridation Northern l'expression de *mdr* dans les cellules SMF-Ai était faible alors que la rétention du fluorochrome était forte. En revanche, dans le cas des cellules SMF-Da à faible rétention de Rhodamine 123, nous avons pu détecter une forte expression du gène *mdr*. Toutefois, les sous-clones de cellules SMF-Da (faible et forte rétention) étaient instables quand à l'expression du gène *mdr*. Toutefois, puisque les profils de rétention étaient instables nous n'avons pas pu établir de corrélation reproductible entre les niveaux d'expression du gène *mdr* et les profils de rétention des lignées cellulaires.

4.2.2 - Transfection des lignées SMF-Da et SMF-Ai avec β -gal

i - Résultats des transfections

Le comportement des diverses lignées cellulaires du modèle suite à la transfection variait considérablement. En effet, une seule tentative de transfection fut suffisante pour obtenir des clones de cellules exprimant de façon simultanée la β -galactosidase et la résistance à la néomycine pour la lignée non métastatique SMF-Da. De plus, la lignée transfectée a démontré une grande stabilité du phénotype (plus de 6 mois de culture ininterrompue) pour l'expression des deux gènes transfectés. Par contre, trois tentatives de transfection ont été nécessaires pour obtenir de rares clones de cellules SMF-Ai co-exprimant les deux gènes. De plus, la majorité des cellules d'un clone de SMF-Ai β -gal ayant montré une stabilité dans la co-expression des deux gènes a subitement perdu l'expression de la β -gal en dépit du fait que les cellules aient conservé la résistance à la néomycine. Deux cycles de sous-clonage de ce clone initial ont été requis pour permettre la réexpression des deux gènes dans 100% des cellules. De même, des sous-clonages à répétition furent nécessaires pour obtenir des clones de cellules RMS-Be-9 β -gal exprimant de façon stable les deux gènes transfectés. La Figure 19 illustre les lignées parentales SMF-Da, SMF-Ai et les lignées transfectées SMF-Da β -gal et SMF-Ai β -gal. La Figure 20 illustre la lignée transfectée RMS-Be-9 β -gal.

Figure 19: Microphotographies des lignées cellulaires parentales et transfectées exposées au X-gal pendant 4 heures à 37°C. 37.5X

(A) Cellules non métastatiques SMF-Da parentales et (C) Cellules métastatiques SMF-Ai parentales. Aucune activité β -gal n'est présente dans les cellules non transfectées.

(B) Cellules non métastatiques transfectées SMF-Da β -gal montrant une forte activité enzymatique de la β -gal. (D) Cellules métastatiques transfectées SMF-Ai β -gal. L'intensité de la coloration est légèrement diminuée par rapport aux cellules SMF-Da β -gal. Ceci s'explique par la taille moins importante du cytoplasme des cellules SMF-Ai β -gal et de l'accumulation réduite du chromogène. Le produit clivé du X-gal (bleu azur intense) est visible tant à l'intérieur des cellules que dans l'espace extracellulaire.

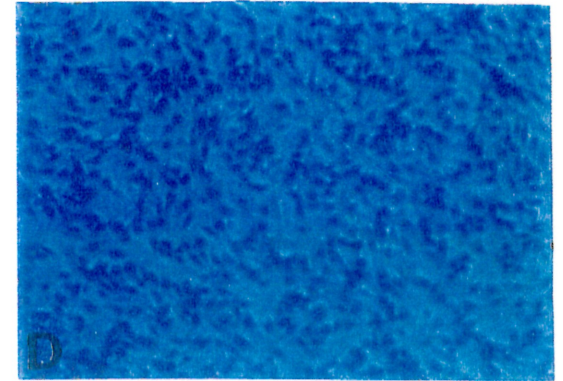
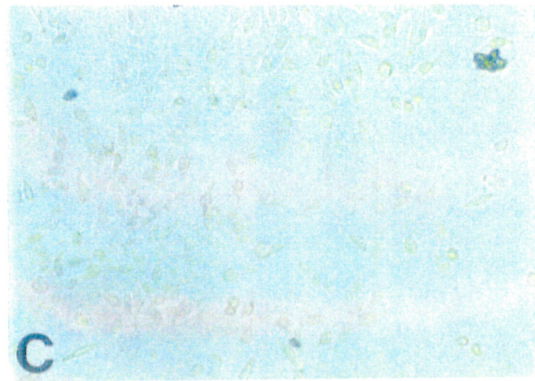
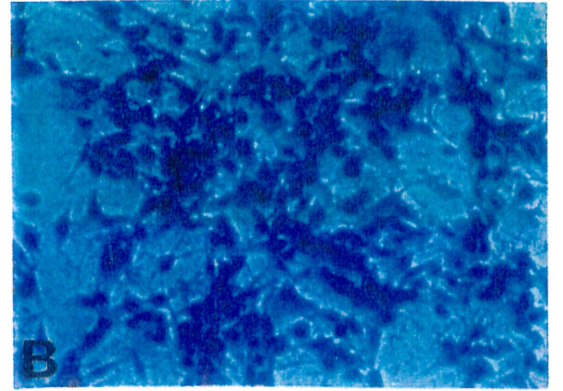
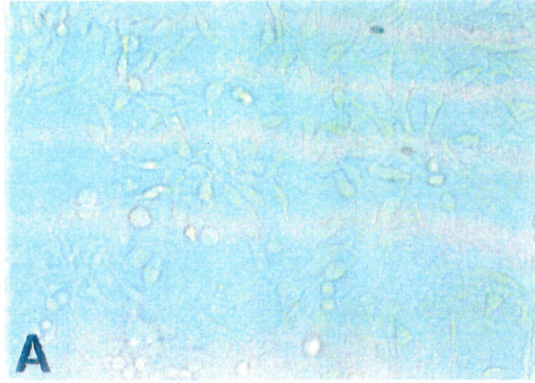


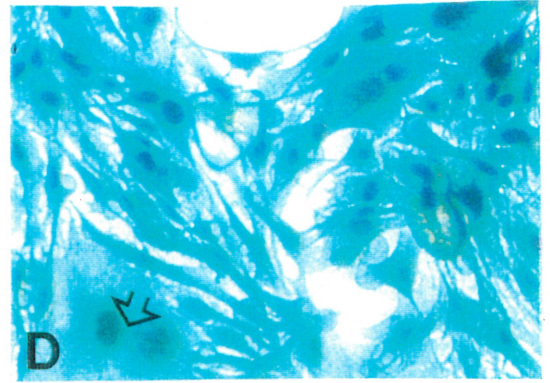
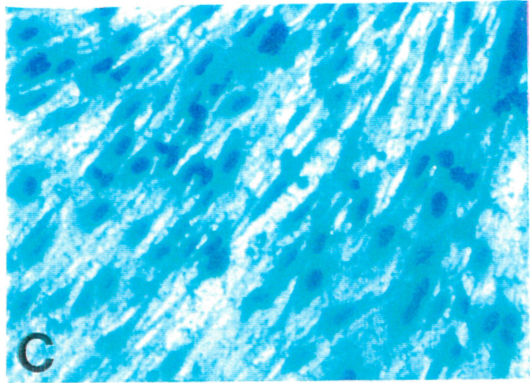
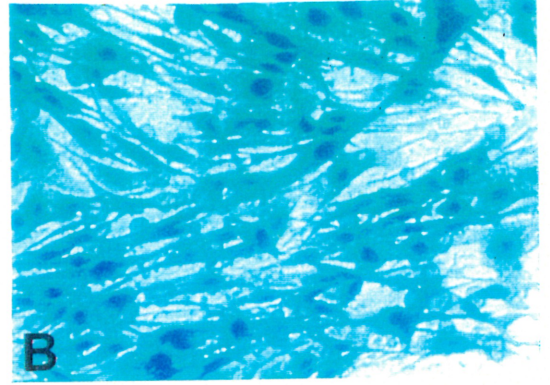
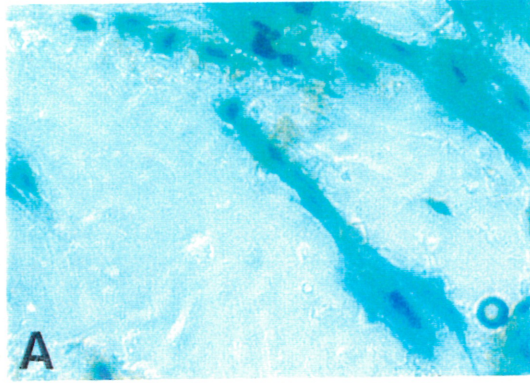
Figure 20: Microphotographies de la lignée transfectée parentale de RMS-Be-9 β -gal et deux sous-clones stables. 37.5X

(A) Cellules de la population transfectée avant sous-clonage: beaucoup de cellules résistantes aux effets de la G418 ont perdu l'expression de l'enzyme β -gal et demeurent incolores suite à l'exposition au X-gal.

(B) Cellules du sous-clone #4 de la lignée RMS-Be-9 β -gal montrant le produit X-gal clivé dans le noyau de la cellule.

(C) Cellules du sous-clone #19 de la lignée RMS-Be-9 β -gal montrant le produit X-gal clivé dans le noyau et dans l'espace extracellulaire.

(D) Cellules du sous-clone #19 montrant des fusions cellulaires (syncytia) caractéristiques de la lignée non transfectée (fusions indiquées par la flèche).



Grâce au sous-clonage, les lignées cellulaires transfectées ont montré une expression stable de l'enzyme β -galactosidase pendant plusieurs mois en culture. Toutes les lignées ont été photographiées après incubation de 4 heures à 37°C en présence de X-gal. Le X-gal extracellulaire clivé est visible entre les cellules de la lignée SMF-Da β -gal à la Figure 19B. Ce phénomène de diffusion a été décrit par d'autres groupes qui utilisaient des cellules transfectées avec le gène *lacZ* (Sanes et al. 1986). Nous n'avons pas observé de changements dans la cinétique de prolifération des lignées transfectées par rapport aux lignées parentales contrairement à d'autres études (Krüger et al. 1994b, Kobayashi et al. 1997). Les cellules de la lignée RMS-Be-9 β -gal apparaissent à la Figure 20. Deux clones stables ont été obtenus suite à la transfection et plusieurs processus de clonage par dilution limite. 100% des cellules des deux clones ont maintenu l'expression de l'enzyme transfectée pendant les 3 mois où elles ont été maintenues en culture.

ii - Caractérisation *in vitro* et *in vivo* des lignées transfectées

Nous avons entrepris la caractérisation partielle des lignées transfectées après une vingtaine de passages *in vitro* afin de confirmer qu'elles avaient conservé les propriétés des lignées parentales dont les caractéristiques biopathologiques ont été mentionnées ci-dessus (Babal et Royal 1994). Par des méthodes immunohistochimiques, nous avons évalué dans les lignées la présence de marqueurs spécifiques de la différenciation myogénique (desmine, vimentine, alpha-actine du muscle lisse et alpha-actine sarcomérique), l'expression des antigènes de classe 1 du complexe

majeur d'histocompatibilité (CMH). Nous avons aussi évalué le potentiel tumorigène et métastatique *in vivo* selon les méthodes usuelles (Babaï et Royal 1994, Herrera-Gayol et al. 1995). L'expression spécifique de la desmine par la lignée SMF-Da indique que cette lignée est plus différenciée que la lignée SMF-Ai (Babaï et Royal 1994, Herrera-Gayol et al. 1995). L'expression de la desmine et de la vimentine n'a été détecté que chez les cellules SMF-Da et le clone transfecté SMF-Da β -gal. Ni les cellules SMF-Ai parentales ni les SMF-Ai β -gal n'exprimaient la desmine quoiqu'elles exprimaient toutes deux la vimentine. Dans le cas des actines, la présence de quelques rares cellules exprimant l'alpha-actine du muscle lisse et l'alpha actine sarcomérique a pu être notée chez les cellules transfectées des deux lignées. Le Tableau 7 résume les observations essentielles recueillies suite à l'évaluation morphologique et fonctionnelle des lignées.

TABLEAU 7: Caractéristiques des lignées parentales et transfectées

	SMF-Da	SMF-Da β -gal	SMF-Ai	SMF-Ai β -gal
Tumorigenicité- rats syngéniques	20-30%	20-30%	100%	100%
Latence tumorale	7-10 jrs	7-10 jrs	4-7 jrs	4-7 jrs
Régression tumorale	100%	100%	0%	0%
Métastase - rats syngéniques	0%	0%	100%	100%
Expression de la vimentine	4+ ¹	4+	4+	4+
Expression de la desmine	4+	4+	-- ³	-- ³
Expression de α -actine sr ²	-- ³	* ⁴	-- ³	* ⁴
Expression de α -actine ml ⁵	-- ³	* ⁴	-- ³	* ⁴
Activité de l'enzyme β -gal (pH 7.3)	0%	95-100%	0%	95-100%

Explications:1: 4+ indique que 75-100% des cellules étaient positives (Babaï et Royal 1994)

2: sr = sarcomérique

3: -- indique une absence de coloration

4: * indique la présence de quelques rares cellules positives

5: ml = muscle lisse

À l'exception de l'activité β -galactosidasiq ue retrouvée uniquement dans les cellules transfectées, les lignées transfectées conservaie nt toutes les attributs des lignées parentales à l'exception de l'expression aberrante des alpha-actines par quelques rares cellules transfectées.

4.3 - Cinétique métastatique *in vivo* des clones cellulaires transfectées

On a rapporté l'association de l'expression de la β -galactosidase avec la sénescence chez certains types cellulaires humains (Dimri et al. 1995). Deux stratégies ont donc été employées pour exclure toute possibilité de

confusion entre l'activité β -gal du gène transfecté et celle présente dans les lysosomes des macrophages (Chen et al. 1994), et dans certains types de cellules nerveuses (Hatton et Lin 1992). Premièrement, le pH neutre de notre tampon X-gal ne favorise pas l'activité de l'enzyme endogène qui, si il est présent, est actif à un pH acide (Sanes et al. 1986). Deuxièmement, grâce au signal de localisation nucléaire présent dans notre vecteur β -gal, les cellules transfectées montrent une localisation caractéristique du substrat chromogène dans le noyau et beaucoup moins dans le cytoplasme. Le ciblage nucléaire est particulièrement visible pour les cellules de la lignée transfectée RMS-Be-9 β -gal (voir en particulier à la Figure 20C et D).

i - Formation de tumeurs orthotopiques chez les rats injectées dans le muscle avec les lignées cellulaires transfectées SMF-Da β -gal et SMF-Ai β -gal

Pour les animaux injectées avec les cellules SMF-Da, seuls quelques uns d'entre eux ont montré un développement tumoral manifesté par une tuméfaction localisée. Le temps de latence tumorale allait de 7 à 10 jours après l'injection; certaines de ces tumeurs croissaient pendant encore 5 à 7 jours pour régresser complètement au jour 28 post-injection. Les cellules de la lignée transfectée SMF-Da β -gal ont affiché un comportement similaire (Tableau 7). Lors de l'examen macroscopique, les tumeurs régressives montraient des régions fortement hétérogènes, certaines totalement nécrotiques, d'autres hémorragiques. La présence de lymphocytes et de macrophages dans le stroma tumoral témoignait de la réaction inflammatoire associée aux tumeurs en régression (Babaï et al

1986, Babai et Royal 1994). Aucun nodule métastatique pulmonaire, ganglionnaire ou autre n'a jamais été observé ni pour la lignée non métastatique parentale ni pour la lignée non métastatique transfectée (Tableau 7).

En revanche, l'injection de cellules de la lignée métastatique SMF-Ai ont provoqué la formation rapide et uniforme de tumeurs chez 100% des animaux avec des temps de latence courts (4 à 7 jours après injection) (Tableau 7). Lors de l'examen macroscopique, ces tumeurs étaient plus homogènes que celles induites par les cellules SMF-Da, démontrant des foyers de nécrose centrale uniquement pour les tumeurs plus grosses mais sans aucun foyer hémorragique, et avec très peu de réaction inflammatoire. D'autres investigateurs ont observé que l'introduction de gènes exogènes, par exemple celui de l'enzyme β -gal, pouvait altérer la surface des cellules transfectées et augmenter l'expression de molécules immunogéniques à la membrane cellulaire (Raz et al. 1996). De fait, nous avons détecté à la périphérie des tumeurs induites par la lignée SMF-Ai β -gal des cellules mononucléées, mais malgré cette réaction inflammatoire, la latence des tumeurs induites par la lignée métastatique transfectée n'a pas été modifiée par rapport à celle des tumeurs induites par la lignée parentale SMF-Ai, où la réaction inflammatoire est absente. Une dissémination métastatique sous forme de nodules aux ganglions iliaques et aux poumons était présente chez tous les animaux testés (12 rats); les cellules SMF-Ai β -gal ont infiltré les ganglions, remplaçant totalement le tissu lymphoïde au jour 35 post-injection, et le tissu pulmonaire au jour 60 post-injection. La propagation tumorale à distance a provoqué la mort de l'animal par insuffisance respiratoire. Les résultats observés pour les

lignées métastatiques parentales et transfectées indiquent que les tumeurs induites par la lignée SMF-Ai β -gal présentent les mêmes caractéristiques que celles formées par la lignée parentale SMF-Ai à l'exception d'une discrète réaction inflammatoire présente dans les tumeurs formées par SMF-Ai β -gal. Les lignées cellulaires transfectées sont donc en tous points comparables aux lignées cellulaires parentales et ce, pour l'ensemble des paramètres examinées *in vitro* et *in vivo*. Evidemment, seules les lignées transfectées expriment l'enzyme β -galactosidase.

ii - Détection des cellules transfectées dans les tumeurs orthotopiques formées par les cellules SMF-Da β -gal et SMF-Ai β -gal

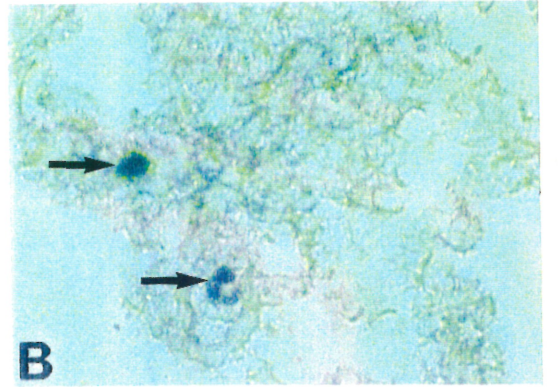
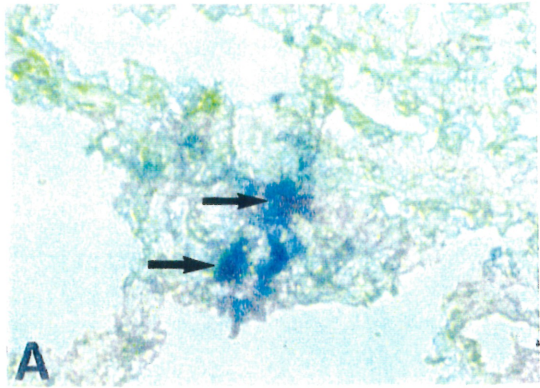
Le maintien de la tumorigénicité dans les lignées transfectées tout comme dans les lignées parentales était un contrôle essentiel du processus de transfection. En effet, il était essentiel que l'introduction du gène exogène β -gal n'altère pas le comportement tumorigène des cellules. Il était également important que les cellules inductrices de tumeurs conservent l'expression de l'enzyme β -gal lors de la croissance *in vivo*. L'expression de β -gal fut initialement détectée en exposant des tumeurs entières (formées à la suite de l'injection des cellules tumorales dans la patte postérieure) à une solution de X-gal. Nous avons dû affronter un problème d'ordre technique avec l'utilisation de tumeurs entières; en effet, le centre des tumeurs de grande taille demeurait souvent incolore, probablement en raison d'une pénétration insuffisante du substrat à l'intérieur de la tumeur. Nous avons donc entrepris de traiter par cryocoupe toutes les tumeurs que nous avons ultérieurement exposé au X-gal. La Figure 21 illustre les deux lignées transfectées photographiées à

partir de coupes congelées de tumeurs. Le microenvironnement de la tumeur n'affecte en rien l'expression de l'enzyme transfecté et le X-gal clivé demeure visible même à l'intérieur des cellules transfectées (voir à la Figure 21B). La contre-coloration de la coupe au HPS ne diminue pas non plus l'intensité du marquage et permet d'identifier les divers types cellulaires en relation avec les cellules qui expriment la β -gal (Figure 21A).

Figure 21: Microphotographies de coupes congelées de tumeurs excisées, congelées en azote et exposé au X-gal. 25X

(A) Tumeur formée par les cellules de la lignée transfectée SMF-Da β -gal. Le muscle normal ne réagit pas avec le X-gal et conserve une coloration rose (grosse flèche). Les petites cellules non colorées au X-gal sont des lymphocytes appartenant à la réaction inflammatoire (petite flèche).

(B) Tumeur formée par les cellules de la lignée transfectée SMF-Ai β -gal. Cette coupe provient du centre de la tumeur, et démontre l'intérêt des cryocoupes pour la détection des cellules marquées.



iii - Détection des cellules transfectées dans les poumons de rats injectés par la voie intramusculaire

Plusieurs études ont su tirer profit de la facilité à marquer les cellules tumorales avec le gène *lacZ* (Krüger et al. 1994b, Lin et al. 1990a). De façon générale, on utilise ces cellules pour suivre l'évolution du processus métastatique dans les organes cibles. Considérant qu'il était vraisemblable de retrouver les cellules de la lignée SMF-Ai β -gal dans les poumons suite à l'injection orthotopique, nous avons voulu déterminer le moment d'apparition des premiers implants des transfectants dans cet organe-cible. Par contre, la lignée SMF-Da β -gal n'est pas métastatique puisqu'elle ne donne pas naissance à des métastases persistantes dans les poumons comme le fait la lignée SMF-Ai β -gal. Nous avons néanmoins voulu confirmer l'absence de métastase pulmonaire chez les animaux injectés avec les cellules SMF-Da β -gal.

L'essai biologique de détection a été pratiqué à différents moments suivant l'injection orthotopique afin d'établir la cinétique d'apparition et de disparition des cellules transfectées dans les poumons. Après l'injection, les animaux ont été sacrifiés et les tumeurs, les ganglions (dans le cas d'animaux injectés avec les lignées SMF-Ai et SMF-Ai β -gal) et les poumons furent congelés immédiatement après l'excision. Des coupes congelées furent pratiquées et testées avec X-gal. Le Tableau 8 présente les résultats de l'analyse histochimique de ces tissus. Des rats non injectés ont servi de contrôles pour tous les tissus en cause pour établir si il y avait ou non une activité de l'enzyme endogène.

TABLEAU 8: Activité β -gal par essai X-gal à différents temps post-injection

	Tum/Mus ¹	Poumons	Tum/Mus	Poumons	Tum/Mus	Poumons
	16 jrs pi ²	16 jrs pi	21 jrs pi	21 jrs pi	35 jrs pi	35 jrs pi
SMF-Da	N ³	N	N	N	N	N
SMF-Da β -gal	N	+ (1/1rat)	+ (3/3 rats) ⁵	+ (3/3 rats)	N	N
SMF-Ai	ND ⁴	N	N	N	N	N
SMF-Ai β -gal	N	ND	+ (3/3 rats)	+ (3/3 rats)	+ (2/2 rats)	+ (2/2 rats)

Explications: 1: Tum = tumeur, Mus = muscle
 2: pi = post-injection
 3: N = aucune cellule transfectée détectée
 4: ND = non déterminé
 5: Rares cellules isolées dans le cas de SMF-Da β -gal

Tel que nous l'attendions, la lignée métastatique transfectée SMF-Ai β -gal fut détectée dans les poumons aux jours 21 et 35 suivant l'injection. La présence d'un petit nombre de cellules fut détectée partout dans les poumons. Le nombre de cellules est demeuré constant, à l'exception de quelques petits amas de cellules visibles au jour 35 mais non observés au jour 21. Cette observation est intéressante, compte tenu que 14 jours séparent ces deux intervalles sans évidence d'une croissance importante. La lignée SMF-Ai β -gal fut détectée dans les ganglions iliaques, le premier des deux organes-cibles majeurs rencontrés par cette lignée ainsi que dans la lignée parentale SMF-Ai, au jour 35 après injection (2 sur 2 des rats testés). À ce stade, tout le ganglion était remplacé par des cellules tumorales.

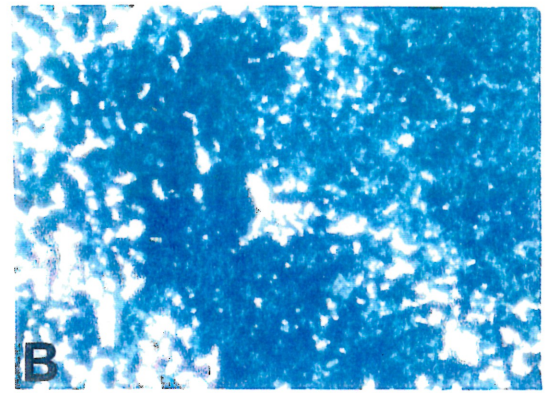
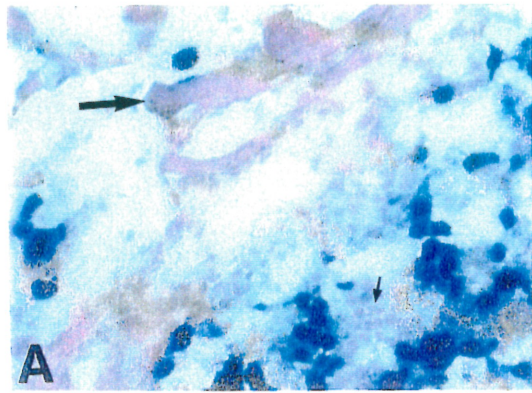
Les cellules de la lignée SMF-Da β -gal transfectée ont été détectées dans les poumons 16 jours (1 sur 1 rat) et 21 jours (3 sur 3 rats) après injection sous forme de rares amas bleu foncé isolés (Tableau 8). Aucune cellule n'a pu être détectée 35 jours après l'injection chez les 3 animaux testés. La présence dans les poumons de cellules non métastatiques transfectées était soupçonné être confiné au compartiment intravasculaire. Par contre, la localisation exacte des cellules ne pouvait être déterminée sans perfusion préalable des poumons au PBS laquelle aurait permis de mieux visualiser l'architecture (alvéolaire et vasculaire) du tissu pulmonaire et de son réseau vasculaire. La Figure 22 illustre des résultats représentatifs d'essais de détection X-gal sur des coupes congelées de poumons d'animaux injectés avec la lignée SMF-Ai β -gal ou SMF-Da β -gal. Ces résultats sont résumés dans le Tableau 8. Les cellules positives pour l'expression de la β -galactosidase sont facilement identifiées par leur coloration bleue foncé avec en arrière-plan le tissu pulmonaire incolore. Tel qu'il est démontré sur la coupe d'un animal injecté avec des cellules SMF-Da β -gal, les cellules révélées au X-gal (Figure 22) permettent de détecter de petits amas ou de rares cellules, la limite de détection se situant à l'échelon cellulaire. De plus, jumelé avec les détails histologiques révélés par la coloration HPS sur des coupes sériées (non illustrées), l'information fourni par l'analyse au X-gal permet de vérifier à quel type cellulaire appartiennent les cellules exprimant l'enzyme β -gal.

Figure 22: Microphotographies des coupes congelées exposées au X-gal pendant 4 heures à 37°C de poumons excisés 21 jours après injection par voie intramusculaire des animaux. 37.5X

A) Animal injecté avec les cellules de la lignée SMF-Da β -gal (cellules transfectées colorées en bleu et indiquées par des flèches)

B) Animal injecté avec les cellules de la lignée SMF-Ai β -gal (cellules transfectées colorées en bleu et indiquées par des flèches)

Les cellules transfectées sont facilement identifiables. Elles forment de petits amas bleus, et dans le cas de SMF-Da β -gal de petites grappes de cellules.



iv - Cinétique des cellules transfectées après injection intravasculaire dans la veine jugulaire

La survie des cellules tumorales dans la circulation a fait l'objet de nombreuses études (Fidler 1970, Fidler et al. 1977, Hart et al. 1981, Weiss et al. 1992). De ces travaux, on retient principalement que la destruction des cellules tumorales dans la circulation est responsable de l'inefficacité relative du processus métastatique. Lorsque nous avons identifié des cellules de la lignée non métastatique SMF-Da β -gal dans le tissu pulmonaire après injection intramusculaire, nous avons voulu les localiser de façon plus précise et déterminer si elles avaient ou non extravasé. Nous avons donc entrepris une série d'essais de métastase expérimentale, où les cellules des lignées parentales et des lignées transfectées furent injectées directement dans la veine jugulaire. Une injection intraveineuse a pour effet de court-circuiter les étapes initiales de la formation d'une tumeur, (l'invasion locale et l'intravasation), et cible de façon spécifique les poumons par les voies circulatoires. À des intervalles de temps déterminés post-injection, les rats furent sacrifiés et les poumons immédiatement perfusés au PBS via la trachée, congelés dans l'azote liquide et préparés pour l'histologie. Nous avons choisi 1 heure post-injection comme point de départ puisqu'il est bien établi que les cellules tumorales débutent le processus d'extravasation aussi tôt que 10 minutes après l'injection dans la circulation (Lin et al. 1990b). Nous pouvions donc nous attendre à retrouver des cellules tumorales dans les tissus. Les résultats des essais de détection au X-gal sont résumés dans le Tableau 9.

TABLEAU 9: Activité β -gal dans les poumons par essai X-gal à différents temps post-injection

	1 Hre	6 Hres	12 Hres	24 Hres	7 Jrs	14 Jrs	21 Jrs
SMF-Da	N ¹	N	N	N	N	N	N
SMF-Da β -gal	+ (5 rats)	+ (5 rats)	+ (5 rats)	+ (5 rats)	+ (5 rats) ²	+(1/4 rats) ²	+(1/4 rats) ²
SMF-Ai	N	N	N	N	N	N	ND ³
SMF-Ai β -gal	+ (5 rats)	+ (5 rats)	+ (5 rats)	+ (5 rats)	+ (2 rats)	+ (2 rats)	ND
RMS-Be β -gal	+ (3 rats)	+ (3 rats)	+ (3 rats)	N	N	N	N

Explication: 1: N = aucune cellule transfectée détectée

2: Cellules rares isolées ont été détectées

3: ND = non déterminé (les rats sont morts ou devaient être sacrifiés)

Afin de déterminer la présence de cellules tumorales dans les poumons, ceux-ci furent perfusés afin de mieux visualiser les capillaires et les alvéoles pulmonaires. Des cellules des trois lignées transfectées ont pu être détectées tôt après injection (1 heure): dans le cas des cellules non métastatiques SMF-Da β -gal, une persistance dans la microcirculation de ces cellules a été observée jusqu'au 21ème jour après injection. Cependant, seulement 1 des 4 rats testés au jours 14 et 21 post-injection montraient la présence de cellules SMF-Da β -gal persistantes. Les cellules de la lignée non métastatique et non régressive RMS-Be-9 β -gal furent détectées précocement suivant l'injection, mais elles ont disparu complètement 24 heures après l'injection. Leur disparition a été plus rapidement observée par rapport à celle des cellules SMF-Da β -gal. Des cellules de la lignée métastatique SMF-Ai β -gal, par contre, augmentaient en nombre, extravasaient, pénétrant le tissu pulmonaire et causant la mort des

animaux par dissémination tumorale. Aucune réaction X-gal n'a été observée dans les poumons d'animaux contrôles injectés avec les lignées parentales. Nous n'avons pu examiner les poumons des rats injectés avec la lignée SMF-Ai à 21 jours post-injection puisque ceux-ci n'ont pas survécu plus de 17 jours. Des observations détaillées ont été recueillies et sont résumées dans le Tableau 10 (ci-dessous) et présentées en photo micrographiques dans la Figure 23.

TABLEAU 10: Décomptes cellulaires par unité d'aire de tissu pulmonaire perfusé au PBS chez des animaux injectés par voie intraveineuse

	1 Hre	6 Hres	12 Hres	24 Hres	7 Jrs	14 Jrs	21 Jrs
SMF-Da	PC ²	PC	PC	PC	-- ³	-- ³	-- ³
SMF-Daβ-gal	12.31 +/-	0.77 +/-	0.61 +/-	0.04 +/-	2+ ⁴	1+ ⁵	1+ ⁵
	2.22 ⁸	0.58	0.53	0.11			
SMF-Ai	PC	PC	PC	PC	PC	PC	PD ¹
SMF-Aiβ-gal	4.14 +/-	0.28 +/-	0.19 +/-	0.78 +/-	3+ ⁶	4+ ⁷	PD
	3.07	0.20	0.28	0.35			
RMS-Beβ-gal	3.99 +/-	0.56 +/-	0.12 +/-	0.01 +/-	-- ⁹	-- ⁹	-- ⁹
	3.87	0.42	0.18	0.04			

Explications: 1: PD = pas déterminé (les rats sont morts ou devaient être sacrifiés)
 2: PC = pas comptable. Un décompte précis impossible par HPS
 3: Analyse des coupes HPS n'a pas révélé la présence de cellules tumorales
 4: 2+: plusieurs amas de 10-20 cellules dans 4 lobes
 5: 1+: un seul amas de cellules dans 4 lobes
 6: 3+: 20-30% du tissu était remplacé par des foyers tumoraux
 7: 4+: remplacement total des tissus par la croissance tumorale
 8: +/- = valeur moyenne + ou - l'erreur standard
 9: Aucune cellule transfectée (3 rats testés par groupe)

Premièrement, un grand nombre de cellules des lignées métastatiques et non métastatiques gagnent les poumons 1 heure post-injection (Figure 23A et 23B). En effet, les coupes sont parsemées de cellules bleues distribuées de façon aléatoire et ce pour les trois types cellulaires transfectées. Plusieurs petits amas de 10 à 20 cellules ont été observés sur chaque coupe de poumons injectés avec la lignée SMF-Da β -gal. Les cellules RMS-Be-9 β -gal ne formaient pas d'amas mais conservaient plutôt une distribution sous forme de cellules isolées. Les cellules marquées avec la β -gal sont facilement identifiées grâce à leur coloration bleue, et ce beaucoup plus facilement qu'avec la coloration à l'HPS surtout pour les petites cellules de SMF-Ai ou les rares cellules SMF-Da présentes dans les poumons.

Deuxièmement, pour les lignées métastatiques comme pour les lignées non métastatiques, un phénomène de dégagement est observée entre 1 heure et 24 heures post-injection où la vaste majorité des cellules disparaissent des poumons (Figures 23C et 23D). Qui plus est, il y avait moins de cellules de la lignée SMF-Ai β -gal que de cellules SMF-Da β -gal sur les coupes effectuées 1 heure post-injection (Tableau 10). Une diminution progressive du nombre de cellules par unité de surface pulmonaire à 6 et à 12 heures post-injection a été observée, pour atteindre un niveau de base 24 heures post-injection. Troisièmement, la persistance des cellules de la lignée SMF-Da β -gal fut détectée chez des animaux 7, 14 et 21 jours après injection (Figures 23E, 23G et 23I). Cependant, à 14 et à 21 jours les cellules n'étaient détectées que chez 1 animal parmi les 4 qui furent injectés, leur localisation étant strictement limitée à l'espace intravasculaire (Figure 24A); de plus, la présence de noyaux picnotiques

(Figure 24C,) suggère la nécrose de ces cellules. Aucune trace d'extravasation ne fut observée pour les cellules non métastatiques transfectées.

Pour les cellules de la lignée transfectée SMF-Ai β -gal, des signes d'extravasation apparaissent entre 24 heures et 7 jours après injection (Figure 24B,). La croissance des cellules était très rapide compte tenu qu'elles avaient presque disparu à 24 heures post-injection, pour ensuite commencer à infiltrer le tissu pulmonaire au jour 7 post-injection. À ce moment, la localisation extravasculaire des cellules était déjà plus importante que la localisation intravasculaire mais on observait aussi de la croissance cellulaire intravasculaire (Figure 24B). Entre 7 et 14 jours post-injection les cellules SMF-Ai β -gal ont entrepris une expansion très rapide et les coupes des poumons à 14 jours post-injection étaient presque totalement envahies par des nodules tumoraux couvrant la surface du lobe (Figure 23H et Figure 24D), et augmentant à la fois la présence des cellules tumorales et la taille des poumons. Ces animaux ont dû être sacrifiés à 17 jours post-injection (Figure 23J) comparativement à 16 jours post-injection pour les animaux injectés avec la lignée parentale SMF-Ai.

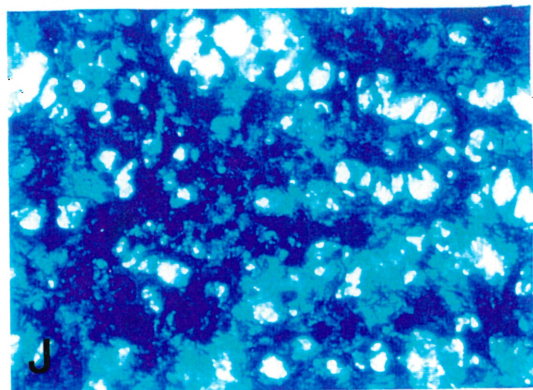
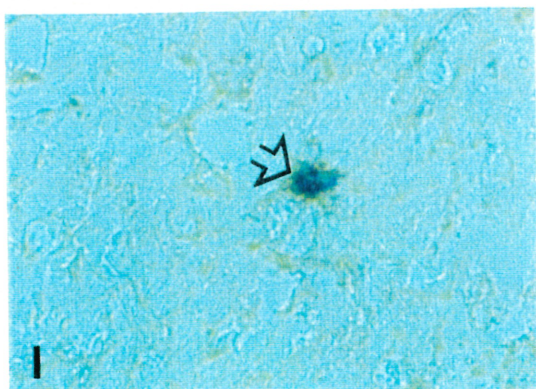
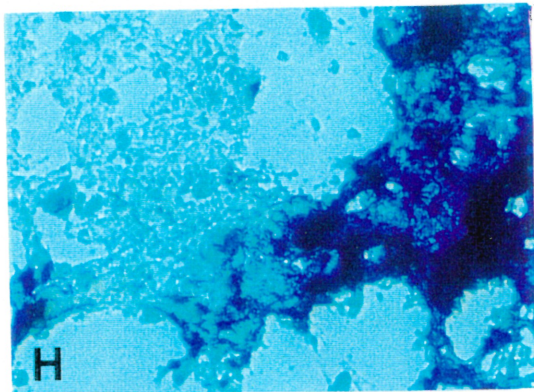
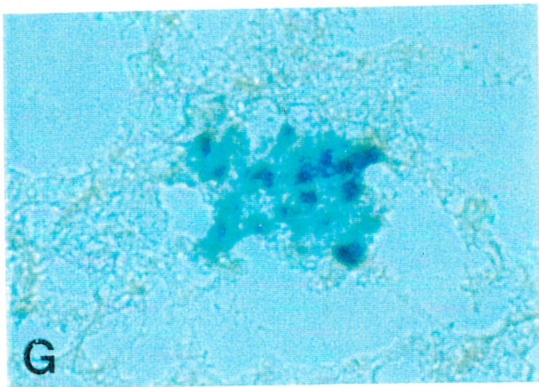
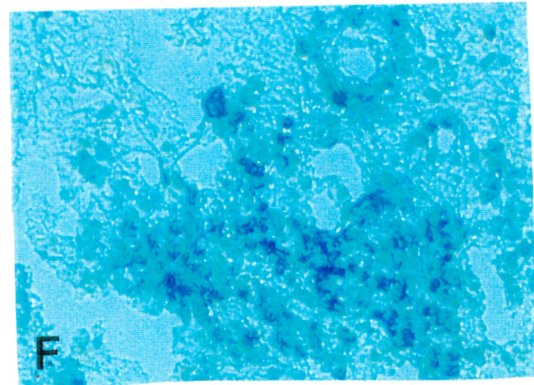
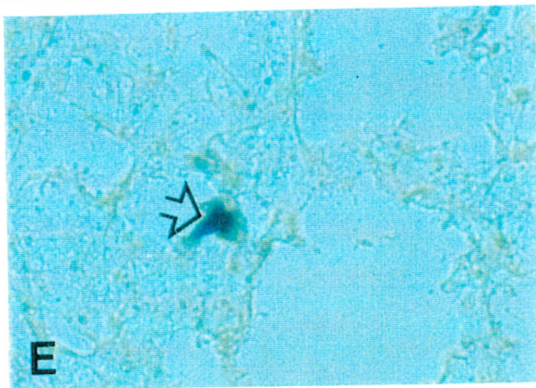
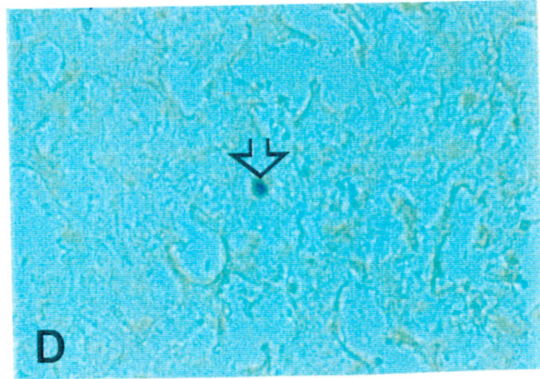
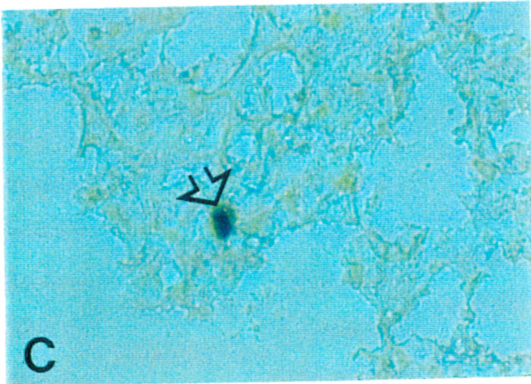
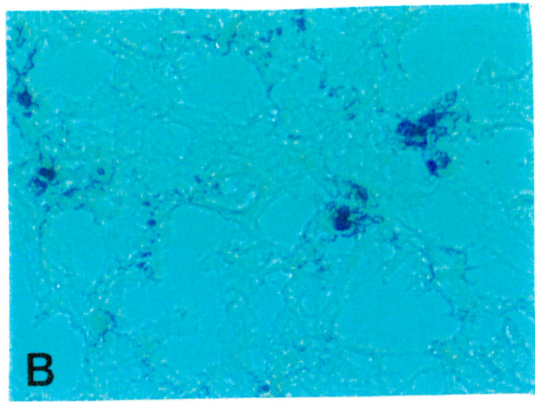
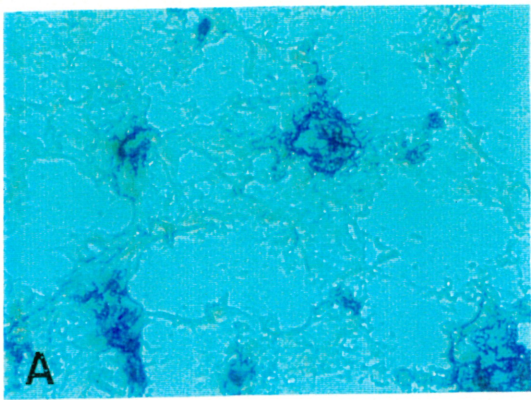
Dans le cas des cellules SMF-Ai β -gal, les décomptes cellulaires étaient plus bas que pour ceux observés pour les cellules SMF-Da β -gal (Tableau 10). On ne peut affirmer si les cellules se sont arrêtées dans les poumons ou si elles n'ont pas réagi avec le X-gal. Pour les deux lignées transfectées, le nombre de cellules a diminué brutalement 24 heures post-injection, mais entre 1 et 7 jours après l'injection la croissance cellulaire est demeurée stable pour la lignée métastatique (Tableau 10). Il fut considérablement

plus difficile de localiser les cellules parentales, particulièrement les petites cellules de la lignée SMF-Ai. À une heure après injection intraveineuse il a été impossible d'obtenir des décomptes cellulaires précis en se servant des coupes conventionnelles colorées à l'HPS; ceci illustre l'avantage d'utiliser des cellules marquées au β -gal au lieu des colorations usuelles surtout dans le contexte de la détection de rares cellules non métastatiques. De plus, les cellules SMF-Da furent impossible à identifier de façon non équivoque à 7, 14 et 21 jours après injection en utilisant la méthode HPS, tandis que les cellules transfectées SMF-Da β -gal, malgré leur petit nombre, ont pu être détectées aisément à chacun de ces temps (Figure 23).

Figure 23: Microphotographies de coupes congelées de poumons excisés provenant d'animaux injectés par la voie intraveineuse. Toutes les coupes ont été fixées et exposées au X-gal pendant 4 heures à 37°C. 37.5X

(A) Arrêt des cellules de la lignée non métastatique SMF-Da β -gal à 1 heure post-injection. (C) Dégagement (réduction du nombre) des cellules SMF-Da β -gal à 24 heures post-injection. La flèche indique une cellule tumorale transfectée. Persistance de petits amas de cellules transfectées SMF-Da β -gal à (E) 7 jours post-injection (cellules tumorales indiquées par une flèche), (G) 14 jours post-injection et (I) à 21 jours post-injection. La flèche indique une cellule tumorale.

(B) Arrêt des cellules de la lignée métastatique SMF-Ai β -gal à 1 heure post-injection. (D) Dégagement des cellules SMF-Ai β -gal à 24 heures post-injection. La flèche indique une cellule tumorale. (F) Prolifération intravasculaire et extravasculaire des cellules de la lignée métastatique SMF-Ai β -gal à 7 jours post-injection, à (H) 14 jours post-injection et à (J) 17 jours post-injection.



Lorsqu'elles furent injectées, les cellules de la lignée RMS-Be-9 ont formé des tumeurs non régressives. En parallèle avec les injections intraveineuses, nous avons injecté les cellules transfectées de la lignée RMSBe-9 β -gal par voie intramusculaire chez 3 animaux. De façon remarquable, seulement 1 des 3 animaux a développé une tumeur au site d'injection, et cette tumeur ne fut apparente que 3 mois après injection des cellules. Après 3 mois, l'animal fut sacrifié et la tumeur excisée. Une métastase a été observé aux poumons mais dans aucun ganglion. À l'examen histologique de la tumeur, il y avait des signes d'invasion tumorale entre les fibres musculaires mais aucune d'invasion transcellulaire ou translaminaire, comme dans le cas des tumeurs induites par les cellules non transfectées RMS-Be-9. La tumeur présentait des régions nécrotiques et hémorragiques accompagnées d'un infiltrat de cellules mononucléées en périphérie, ainsi qu'une capsule intacte collagénisée (non rompue par les cellules tumorales). Donc, le comportement invasif de la lignée transfectée était altéré par rapport à celui observé chez la lignée parentale non transfectée. Étant donné que le caractère des tumeurs induites par les cellules de la lignée RMS-Be-9 est invasif et non régressif, il pourrait s'agir d'un effet induit par la transfection ayant pour résultat de rendre les cellules non tumorigènes chez 2 des 3 animaux injectés, et métastatique chez le troisième animal. Une autre possibilité est que les cellules étaient non viables après leur court séjour dans la circulation, et qu'un seul clone de cellules a pu survivre pour former la tumeur présente chez un animal.

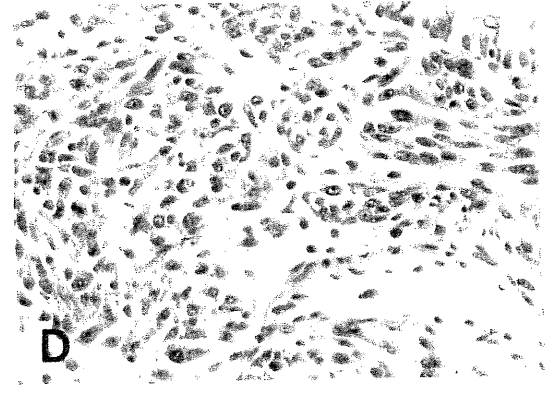
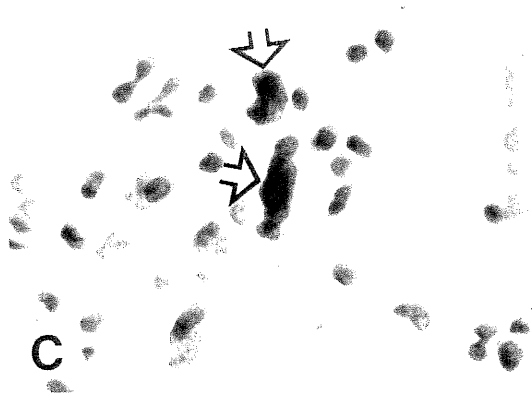
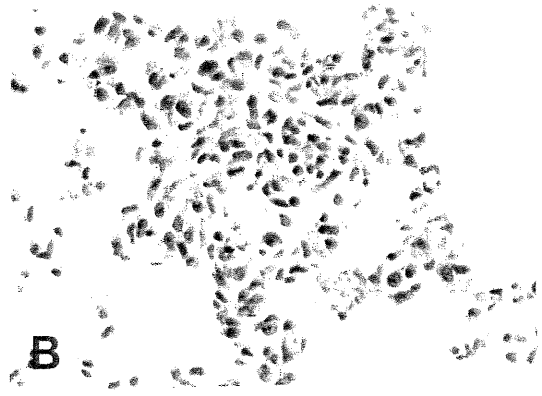
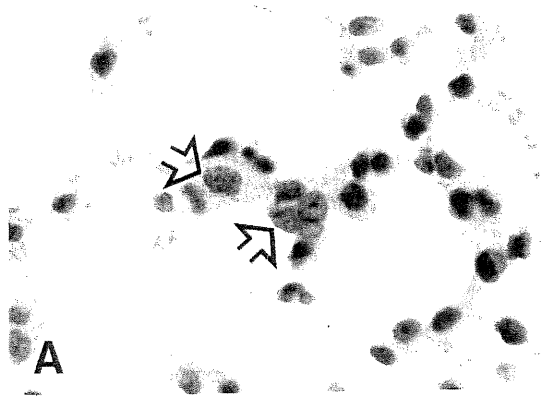
Figure 24: Microphotographies de coupes enrobées en paraffine de poumons, colorées à l'HPS.

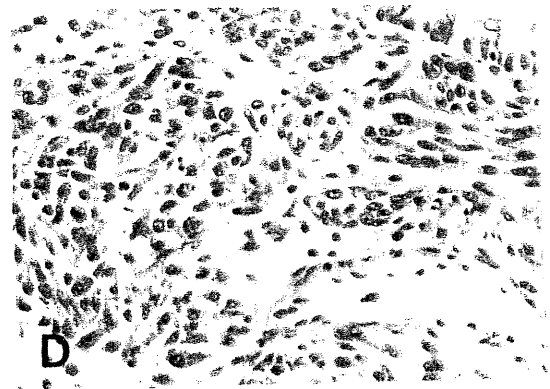
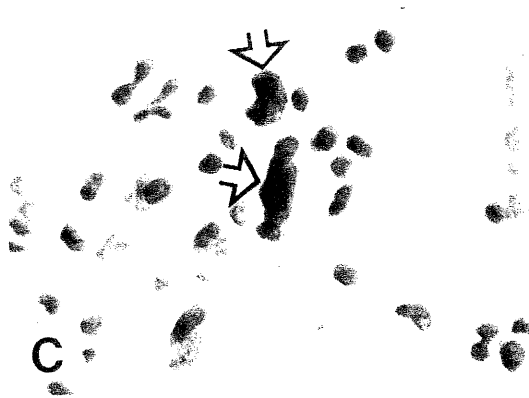
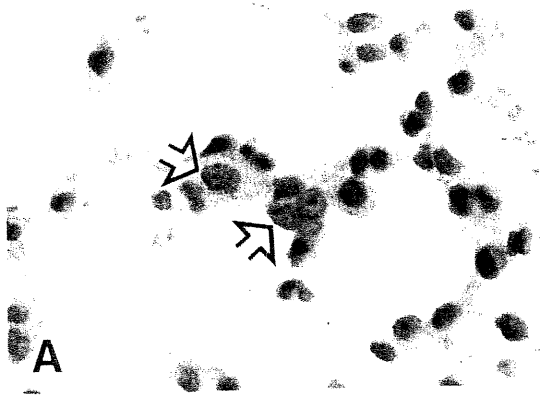
(A) animal sacrifié 7 jours après injection intraveineuse de cellules SMF-Da β -gal, montrant des cellules tumorales (flèche) dans l'espace intravasculaire. 63X.

(B) animal sacrifié 7 jours après injection intraveineuse des cellules SMF-Ai β -gal, montrant la prolifération intravasculaire et extravasculaire des cellules tumorales (T). 25X.

(C) animal sacrifié 14 jours après injection intraveineuse des cellules SMF-Da β -gal, montrant des cellules aux noyaux picnotiques (flèches) suggérant de la mort cellulaire. 63X.

(D) animal sacrifié 14 jours après injection intraveineuse des cellules SMF-Ai β -gal, montrant la croissance extravasculaire des cellules tumorales dans les tissus pulmonaires. 25X.





CHAPITRE 5: DISCUSSION ET CONCLUSIONS

DISCUSSION

La mutagenèse rétrovirale

L'objectif de nos travaux était de créer des mutants dans des lignées cellulaires dérivées d'un modèle de rhabdomyosarcome de rat ayant un potentiel métastatique défini et différenciellement exprimé. Nous souhaitons ensuite utiliser ces lignées cellulaires mutantes pour faciliter l'identification des gènes impliqués dans le processus de la métastase. Dans le but d'obtenir des mutants métastatiques, nous avons utilisé la technique de mutagenèse rétrovirale couplée à des marqueurs de sélection pour en faciliter l'identification et la caractérisation ultérieure. Nous avons infecté les cellules tumorales non métastatiques dérivant d'une lignée de rhabdomyosarcome métastatique de rat (Babaï et Royal 1994) dans un premier temps avec le vecteur rétroviral N2, et avons pu confirmer la présence des intégrations multiples du provirus dans les cellules infectées grâce à la technique de Southern.

Rétention différentielle de la Rhodamine 123

S'appuyant sur l'observation originale d'une rétention différentielle de la Rhodamine 123 que nous avons constaté dans nos lignées cellulaires, nous avons jumelé à l'infection rétrovirale avec N2 une approche complémentaire capable de servir d'outil de sélection de mutants possibles

dans les populations SMF-DaN2. Les cellules SMF-DaN2 ont été triées par cytométrie en flux et les cellules qui retenaient la Rhodamine dans la région du profil de rétention caractéristique des SMF-Ai métastatiques ont été sélectionnées, mises en culture et testées pour leur comportement *in vivo*.

Nous avons pu démontrer la stabilité du phénotype de forte rétention de la Rhodamine 123 par les cellules SMF-Da durant plusieurs mois. Une expérience d'injection préliminaire a démontré une augmentation de la tumorigénicité chez les cellules non mutées SMF-Da triées pour leur forte rétention de la Rhodamine 123. Tous les animaux injectés avec les cellules SMF-Da à forte rétention ont développé des tumeurs qui ont rapidement atteint des volumes nécessitant le sacrifice des animaux. Toutefois, à l'autopsie, ces tumeurs montraient des signes de régression similaire à ceux observés dans la lignée parentale SMF-Da. De plus, aucune métastase n'a été observée. Malgré l'absence de métastase il faut néanmoins souligner la croissance tumorale accélérée de la population triée. Il est donc possible que le phénotype de forte rétention de la Rhodamine 123 manifesté par ces cellules SMF-Da soit relié à l'apparition d'une croissance tumorale plus rapide. Cependant, une relation entre la rétention de la Rhodamine 123 et le comportement métastatique des cellules du modèle n'a pu être établie puisque les cellules SMF-Da à forte rétention n'ont jamais formé de métastases.

Infection avec N2 et sélection des SMF-DaN2 à forte rétention de la Rho 123

Nous avons donc infecté les cellules SMF-Da avec le virus N2, nous les avons sélectionnées pour un profil de rétention élevée de la rhodamine 123 et les avons injectées par voie orthotopique chez l'animal syngénique. Malgré de multiples intégrations virales dans les cellules SMF-DaN2 et le développement de tumeurs précoces chez quelques animaux, nous n'avons pas observé de changement appréciable dans le comportement tumorigène des cellules infectées par rapport aux cellules contrôles sauf pour deux animaux injectées avec les cellules SMF-DaN2 qui ont développé des tumeurs non régressives au jour 29 après l'injection. Dans aucun cas nous n'avons observé de métastases ganglionnaires ou pulmonaires.

Sous-clones et stabilité du phénotype de rétention

Afin de mieux étudier la stabilité du phénomène de rétention différentielle de la Rhodamine 123 chez les deux lignées cellulaires de notre modèle, nous avons d'abord établi une série de clones par triage avec un cytomètre de flux à partir de populations non sélectionnées de cellules SMF-Da et SMF-Ai. Nous avons ensuite testé chacun de ces clones pour sa rétention de la Rhodamine 123. Il est intéressant de signaler que des clones à faible et à forte rétention de Rho 123 furent facilement obtenus des cellules SMF-Da; de plus, ces profils de rétention sont demeurés stables pendant plusieurs mois. Dans le cas des cellules SMF-Ai, aucun clone stable à

faible rétention n'a pu être obtenu. Chez les clones des cellules SMF-Ai, le phénotype de rétention s'est avéré instable et non reproductible. Il en était de même pour la mesure des niveaux d'expression du gène *mdr*, codant pour la P-glycoprotéine, transporteur de la Rhodamine 123. Cette analyse n'a donc pas permis de tirer de conclusions au sujet de la relation entre l'expression de ce gène et le phénotype de rétention de la Rhodamine 123 dans les cellules SMF-Ai. Il est possible qu'une expression instable du gène *mdr*, tel que suggéré par les fluctuations dans les niveaux d'accumulation de la Rhodamine chez les cellules SMF-Ai, reflète l'instabilité inhérente à cette lignée cellulaire et son comportement biologique plus agressif. On retrouve plus souvent la présence de l'ARN du gène *mdr* dans les cellules tumorales des métastases, par définition plus agressives, que dans les tumeurs primaires; par ailleurs, même si on a suggéré l'association entre l'expression du gène *mdr* et la progression tumorale (revu par Jardillier et al. 1994) nos travaux ne permettent pas de le confirmer. Nous avons obtenu des résultats opposés pour la lignée métastatique SMF-Ai, qui n'exprimait pas d'ARN du gène *mdr* tandis que les cellules SMF-Da à faible rétention montraient, au contraire, une forte expression de ce gène.

Mutagenèse des SMF-Da β -gal avec le virus de Moloney

Dans une seconde série d'expériences de mutagenèse dirigée nous avons utilisé le virus de la leucémie murine de Moloney. Nous avons détecté la présence de provirus dans l'ADN des populations infectées ainsi que dans les cellules de tumeurs persistantes chez 2 animaux. La présence du virus dans les cellules infectées fut aussi confirmée par la détection de l'activité

de l'enzyme virale transcriptase inverse dans les surnageants de cultures de cellules infectées.

Transfection des lignées cellulaires avec β -galactosidase

Nous avons enfin tenté d'infecter des cellules non métastatiques de la lignée SMF-Da β -gal; celle-ci a été préalablement transfectée avec le gène codant l'enzyme β -galactosidase et le gène de résistance à la néomycine (gène néo). Le comportement des cellules transfectées de la lignée non métastatique et de la lignée métastatique (SMF-Ai β -gal) a été étudié *in vitro* et *in vivo*. Nos résultats indiquent qu'aucun changement significatif n'est survenu dans les cellules suite à la co-transfection. La présence de l'enzyme β -gal dans les cellules SMF-Da β -gal nous a tout de même permis d'exploiter le test histochimique employant X-gal comme substrat de l'enzyme β -gal. L'utilisation des cellules SMF-Da transfectées avec le gène β -gal a permis d'identifier le site probable marquant l'arrêt de progression des cellules SMF-Da dans la cascade métastatique. Ces cellules ont aussi facilité l'étude de la propagation des cellules marquées chez des animaux syngéniques.

Il est bien établi que la mutagenèse insertionnelle rétrovirale joue un rôle important dans l'oncogenèse animale (Tsichlis et al. 1994, Tsichlis et Lazo 1995). Une série d'oncogènes potentiels a été identifiée grâce à cette approche, et certains de ces nouveaux oncogènes ont vu leur rôle confirmé pour le développement et la croissance des cellules (revu par Jonkers et Berns 1996). La stratégie utilisée pour l'identification de nouveaux gènes par mutagenèse insertionnelle est basée sur l'observation de la nature

clonale des sites d'intégration provirale dans les tumeurs induites par les rétrovirus transformants lents comparé à la nature polyclonale des tissus normaux infectés (Berns 1988). La présence d'intégrations virales dans des tissus normaux implique que l'acquisition d'ADN proviral est insuffisante pour provoquer la transformation tumorigène. De plus, une susceptibilité à la croissance virale *in vivo* n'est pas suffisante pour l'induction tumorale (Tschlis et Lazo 1995) tel que démontré par des expériences d'inoculation de souriceaux avec le virus de Moloney. Les souriceaux infectés ont montré une virémie prononcée sans pour autant développer des tumeurs. Enfin, le système immunitaire peut aussi limiter le développement tumoral, tel que l'ont montré Nazarov et ses collaborateurs (Nazarov et al. 1994). Dans leurs expériences différentes souches de souris ont été infectées avec le virus de la leucémie murine de Moloney; certaines souches étaient hautement susceptibles à la réplication rétrovirale et à l'induction tumorale, une autre des souches ne supportait pas la réplication du virus et enfin d'autres souches testées supportaient la réplication rétrovirale sans pour autant permettre le développement de tumeurs. Ces auteurs ont suggéré que la progression tumorale dans ce dernier groupe d'animaux était limitée par le système immunitaire des animaux car un développement tumoral complet fut observé lorsque les mêmes cellules infectées furent injectées à des animaux immunosupprimés.

Les insertions provirales provoquent des mutations dans l'ADN de la cellule infectée. Le risque de mutagenèse devrait augmenter en parallèle avec le nombre d'insertions (Powell et al. 1999). Si ces mutations se produisent dans des sites de prédisposition à la croissance tumorale, alors

la cellule proliférera de façon clonale (Berns 1988). Dans ce contexte les rétrovirus peuvent se comporter comme agents mutagènes (Varmus et al. 1981). Si par contre les mutations résultant de l'intégration rétrovirale se produisent dans les régions silencieuses alors le phénotype recherché demeurera inexprimé. Ceci a été démontré récemment par le groupe de Cole (Sheppard et al. 1998) utilisant un modèle de souris transgénique. Dans cette étude, un nombre plus faible de tumeurs est apparu chez les souris transgéniques suite à l'infection rétrovirale malgré la présence d'un gène *myc* dérégulé constitutivement exprimé. Ces résultats illustrent encore une fois la nécessité de multiples mutations pour le développement du phénotype transformé.

Nous avons ensuite procédé à une infection des cellules SMF-Da β -gal dans l'espoir que la grande sensibilité du test X-gal permettrait de retrouver des cellules mutantes métastatiques. Lors de la première expérience (expérience D), aucun animal contrôle (injecté avec les cellules SMF-Da β -gal) n'a développé des tumeurs mais un animal injecté avec les cellules SMF-Da β -gal Moloney a développé une tumeur ayant persisté plus de 30 jours après l'injection. À 35 jours post-injection, une biopsie a été faite de cette tumeur et des cellules tumorales ont été mises en culture. Lors de l'analyse des surnageants de culture de ces cellules tumorales, une forte activité de l'enzyme transcriptase inverse a été détectée, indiquant la présence du rétrovirus dans ces cellules. Malheureusement, l'animal est mort subitement 3 jours après la biopsie, soit 38 jours après l'injection des cellules. À l'autopsie, aucune métastase n'a pu être détectée. Avec les cellules de la lignée métastatique SMF-Ai β -gal, nous avons observé les

premiers signes de métastase aux poumons 21 jours après injection intramusculaire.

Les cellules tumorales prélevées de cette tumeur persistante ont induit des tumeurs chez une deuxième série d'animaux injectés. Trois des 3 rats injectés ont développé des tumeurs précoces au site d'injection des cellules, et une de ces tumeurs a persisté jusqu'au 48^{ième} jour après l'injection, ce qui a nécessité le sacrifice de l'animal, le volume tumoral ayant excédé 3 x 3 centimètres. Il n'y avait aucun signe de métastase chez cet animal bien que des signes histologiques de régression avec foyers hémorragiques et nécrotiques parcouraient la tumeur. Il semble que le comportement biologique de la population cellulaire constituant cette tumeur ait subi un léger changement de tumorigénicité, mais que néanmoins ces cellules n'aient pas acquis un potentiel métastatique.

Dans la deuxième expérience d'injection (expérience E), trois animaux ont développé des tumeurs persistantes qui ont atteint des volumes nécessitant le sacrifice de ces animaux à 50 jours post-injection; ceci représente la plus longue persistance de tumeurs que nous ayons observée chez ces rats. Une de ces trois tumeurs a été excisée, les cellules mises en culture et analysées pour la présence de provirus. L'analyse de l'ADN par buvardage Southern des cellules tumorales a démontré la présence d'intégrations virales. La présence de fragments communs homologues à la sonde pRMO-1 dans la tumeur et dans des clones dérivés, suggère une origine monoclonale pour cette tumeur. Néanmoins, aucun de ces trois animaux n'a montré de métastases à l'autopsie. Les cellules tumorales ont été analysées pour la présence de virus et réinjectées à une série de 3

animaux (expérience de réinjection). Deux des 3 animaux ont développé des tumeurs précoces mais celles-ci ont rapidement régressé. Le comportement tumorigène de cette population de cellules tumorales ne semble donc pas avoir été modifié par l'infection rétrovirale malgré la persistance de la tumeur originale au 50^{ième} jour post-injection.

La présence de bandes d'intégrations virales pour toutes les populations de cellules que nous avons infectées avec les rétrovirus N2 ou Moloney, et la détection de l'enzyme virale transcriptase inverse chez les cellules infectées par le virus Moloney indiquent que l'approche méthodologique de la mutagenèse insertionnelle était valable. Toutefois, nous devons conclure que le modèle de rhabdomyosarcome ne représentait pas un modèle adéquate pour l'identification de gènes utilisant l'approche de mutagenèse rétrovirale et l'induction des clones métastatiques, dans les conditions expérimentales utilisées.

Le groupe de Tschlis (Tschlis et al. 1994) a rapporté que même une petite augmentation du taux de croissance d'une des deux populations de cellules qui composaient une culture pouvait résulter en un changement rapide dans la composition globale de la culture. Or, le microenvironnement d'une tumeur à composition hétérogène peut influencer la croissance d'un sous-clone tumoral par rapport aux autres clones. Ce phénomène a été observé dans des lymphomes à cellules T induits chez le rat par le rétrovirus de Moloney (Mo-MLV); dans ce cas, l'intégration rétrovirale a permis l'identification du locus *Mlvi-5*, qui à l'état active semble contribuer à l'induction de ces néoplasmes à l'état activé. De plus, un réarrangement de ce locus dans une lignée

lymphomateuse avait pour conséquence une sélection négative pour la croissance des cellules infectées dans un organe cible (la rate). Les sous-clones de cellules ayant intégré le virus au locus *Mlvi-5* disparaissaient de la rate lors de passages successifs chez les animaux; les cellules retrouvées dans la rate ne montraient pas de réarrangement de ce locus, celui-ci ayant été vraisemblablement perdu (Tsichlis et al. 1994). Donc, l'intégration du provirus du rétrovirus de Moloney avait, dans ce cas, un effet inhibiteur sur la croissance des cellules infectées au site métastatique normalement colonisé par ces cellules. Ces observations suggèrent que l'intégration d'un rétrovirus même dans un locus impliqué dans la tumorigenèse n'a pas nécessairement pour effet de rehausser le comportement tumorigène ou métastatique d'une cellule infectée.

Utilisant un modèle de souris transgénique, une étude récente de Davies et al. (1999) a conclu que la dérégulation du proto-oncogène *c-myb*, lors de l'intégration rétrovirale était insuffisante pour provoquer la formation de tumeurs. Dans le but d'identifier les mutations cellulaires impliquées dans la tumorigenèse chez la souris, ces auteurs ont infecté des animaux avec le rétrovirus de Moloney. Seules les souris transgéniques exprimant la protéine *v-Myb* dans leurs cellules T développaient des lymphomes de cellules T suite à l'infection. L'étude a conclu que le gène dérégulé par l'infection rétrovirale, *c-myb*, ne pouvait provoquer des lymphomes qu'en coopérant avec l'oncogène *v-Myb* déjà présent dans les souris transgéniques (Davies et al. 1999).

Quelques aspects de la technique de mutagenèse rétrovirale méritent d'être revus. D'abord, le tissu ou la cellule cible pour l'infection doivent

permettre la réplication du rétrovirus. La capacité d'un rétrovirus à se propager dans un type cellulaire donné repose sur la spécificité tissulaire des séquences contenues dans les LTRs du virus, et par les déterminants présents à la surface de l'enveloppe virale. Ensuite, la région où se trouvent des proto-oncogènes susceptibles d'être activés par insertion rétrovirale doit être accessible à l'infection. Des données récentes sur les régions du génome accessibles aux intégrations provirales indiquent que ce sont les régions du génome hypersensibles à la DNase qui sont les plus souvent en cause (Scherdin et al. 1990). Les régions hypersensibles à la DNase sont des régions actives pour la transcription du génome. La mutagenèse rétrovirale peut donc révéler des gènes qui contribuent à l'une ou l'autre des étapes du processus tumorigène à condition que le site d'intégration puisse conférer un avantage prolifératif à la cellule (Berns 1988). Les insertions provirales ne causent pas des délétions majeures ni des mutations ponctuelles donc cette approche ne peut pas révéler un gène dont le gain de fonction ou l'inactivation dépend de ce genre de mutation (Berns et al. 1999). Enfin, l'insertion provirale ne se manifeste que si les gènes impliqués subissent un gain de fonction en conférant un avantage prolifératif à la cellule (Berns 1988). Plusieurs observations suggèrent que les mutations insertionnelles sont exclusivement de nature hétérozygote (Tsichlis et Lazo 1995); bien que le gène suppresseur des tumeur p53 ont pu être ciblé par mutagenèse insertionnelle, cette observation se limite exclusivement aux cellules qui ne présentaient au départ qu'un allèle du gène p53 (van Lohuizen et Berns 1990). Ceci implique que seul un faible pourcentage d'oncogènes possibles peuvent être identifiés par la technique de mutagenèse rétrovirale.

En somme, nous avons infecté des cellules de rhabdomyosarcome et avons démontré l'efficacité de l'infection en identifiant le provirus dans le génome des cellules sous forme de bandes d'intégration provirale et en détectant l'enzyme virale transcriptase inverse dans les surnageants des cellules infectées par le virus Moloney. Donc, l'approche méthodologique que nous avons utilisé permettait l'infection. Cependant, nous avons observé qu'un léger changement dans le comportement *in vivo* des cellules mutées et malheureusement aucune modification du phénotype métastatique. Ces résultats négatifs se traduisent par un effet viral sur la prolifération et la tumorigénicité des cellules SMF-Da en absence d'effet sur la capacité invasive ou métastatique des cellules. On peut supposer que les voies de signalisation qui contrôlent la tumorigénicité d'une part et l'invasivité et la métastase de l'autre sont distinctes.

Le développement par étapes du cancer reflète l'acquisition séquentielle de mutations activant des proto-oncogènes, inactivant des gènes suppresseurs de tumeurs ou agissant sur d'autres catégories de gènes. Dans le cas des néoplasies du système hématopoïétique induites chez la souris infectée par les rétrovirus, le processus d'induction tumorale est sous le contrôle de multiples locus génétiques; certains de ceux-ci affectent la réplication virale; d'autres, la réaction immunitaire de l'hôte (Tsichlis et Lazo 1995). Notons dans cette catégorie les gènes du CMH, particulièrement ceux de la classe 1, qui sont impliqués dans les réactions immunitaires dirigée contre les cellules infectées par le virus de Moloney (Mo-MLV). Il est possible que la présence du virus de Moloney dans les cellules SMF-Daβ-gal, exprimant déjà les molécules du CMH classe 1, ait pu augmenter la réaction immunitaire dirigée contre les cellules infectées.

Nous avons observé la présence d'une réaction immunitaire associée aux tumeurs induites par les cellules de la lignée transfectée SMF-Ai β -gal, et nous soupçonnons que ces cellules expriment à leur surface des épitopes peptidiques résultant du processus de transfection, phénomène déjà signalé par le groupe de Raz (Raz et al. 1996).

Quoiqu'un grand nombre de sites communs d'insertions provirales ait été identifié dans les leucémies et lymphomes murins, il existe aussi des sites d'insertion pour les tumeurs solides. Par exemple, l'étude des tumeurs mammaires murines induites par MMTV a révélé l'existence de deux familles de gènes (*int/Wnt* et *Fgf*) pour le développement de ces tumeurs. Notons cependant que le système MMTV fait intervenir le développement initial de nodules hyperplasiques pré-néoplasiques (Jonkers et Berns 1996) au sein desquels se développent subséquemment des tumeurs mammaires hormono-dépendantes qui régressent lorsque le stimulus hormonal est retiré (van Lohuizen et Berns 1990). De plus, ces tumeurs se développent en général à la suite de plusieurs grossesses, suggérant que l'activation rétrovirale des gènes *int* est nécessaire mais non suffisante pour provoquer le développement tumoral (van Lohuizen et Berns 1990). De fait, des expériences de mutagenèse de souris transgéniques *Wnt-1* par le virus MMTV ont démontré que *Wnt-1* contribue à la tumorigenèse mais n'induit pas le phénotype tumoral complet (Shackleford et al. 1993). L'approche utilisant la mutagenèse rétrovirale des souris transgéniques possède plusieurs avantages: le développement tumoral est accéléré par la présence du transgène et l'identification de nouveaux gènes qui coopèrent avec le transgène lors de la tumorigenèse s'en trouve facilitée (Shackleford et al. 1993). Le système d'adénocarcinomes mammaires induits par

MMTV implique donc la participation de plusieurs facteurs incluant le contrôle hormonal et l'hyperprolifération des cellules cibles.

Il est possible que le développement des tumeurs malignes du système hématopoïétique, en raison de la plus grande mobilité physiologique des cellules sanguines, nécessite moins d'étapes que celui des tumeurs solides induites par MMTV et, par conséquent, se prête davantage à cette d'approche pour l'identification de gènes (Jonkers et al. 1999). Néanmoins, nous devons souligner qu'il doit exister un nombre minimal d'étapes devant être franchies par les cellules incluant entre autres une augmentation de la capacité proliférative et un blocage de la différenciation (Jonkers et Berns 1996).

Aucune étude à ce jour n'a rapporté l'utilisation de rhabdomyosarcomes comme cellules cibles pour l'approche de la mutagenèse rétrovirale. Nos résultats décrivent pour la première fois cette approche pour l'identification des gènes de la métastase dans les rhabdomyosarcomes murins. Compte tenu du nombre de gènes et molécules impliqués dans le processus métastatique, nous pouvons supposer que les cellules SMF-Da sont incapables de compléter les étapes de la métastase malgré la présence démontrée dans leur génomes de rétrovirus. Le processus de la métastase est complexe et comprend plusieurs étapes, chacune associée à l'expression anormale de molécules. Les cellules SMF-Da de notre modèle sont incapables de former des métastases à cause de leur incapacité de franchir les étapes précoces de la cascade métastatique (sécrétion d'enzymes lytiques, invasion etc). Quoique la présence de rétrovirus chez les cellules SMF-Daβ-gal ait pu provoquer un changement dans le

comportement tumorigène des cellules infectées, nous n'avons jamais pu observer la formation de métastases.

Il a été démontré que l'acquisition par les cellules cancéreuses de mutations génétiques successive est reliée à l'apparition d'un phénotype de plus en plus agressif et de moins en moins différencié. Les intégrations virales tardives semblent aussi jouer un rôle dans la progression tumorale et plusieurs sites d'intégrations virales sont associés à des phénotypes plus agressifs. Selon leur origine tissulaire les néoplasmes semblent être associées à des changements spécifiques des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs (Lane 1994). Or, la présence de gènes suppresseurs fonctionnels a été suggérée comme facteur inhibiteur de la tumorigénicité lors d'expériences de fusions cellulaires (revu par Mitchell 1991). De plus, on a suggéré (Mitchell 1991) que le programme de différenciation cellulaire "pré-programmé" lors du développement cellulaire pouvait être dominant par rapport au phénotype transformé, tel que démontré par la perte du phénotype tumoral lors de la fusion de cellules tumorales avec des cellules normales. La présence, dans les cellules normales, d'allèles suppresseurs entraînent la perte de tumorigénicité.

Des études utilisant plusieurs modèles distincts ont montré une association entre la réduction des niveaux d'expression du gène *nm23* et la métastase, d'où l'appellation de «gène suppresseur de la métastase» (revu par Freije et al. 1996). Il a été démontré récemment dans le laboratoire du Dr. Babaï (Beauger 1996) que l'expression de la forme β du gène *nm23* était inversement proportionnelle au stade de différenciation des cellules; son

expression était associée à la perte du potentiel invasif des cellules de la lignée SMF-Da. Il demeure donc possible que l'approche de mutagenèse rétrovirale soit insuffisante pour vaincre à la fois la différenciation cellulaire et la présence de gènes suppresseurs de la métastase et entraîner chez les cellules SMF-Da et SMF-Da β -gal différenciées un comportement métastatique.

Cinétique métastatique *in vivo* des clones cellulaires transfectés

En transfectant l'enzyme bactérien β -galactosidase, nous avons développé un outil grâce auquel nous avons pu étudier les événements précoces du processus métastatique dans le modèle de rhabdomyosarcome de rat. Cette approche a été utilisée par d'autres groupes pour étudier la migration des cellules métastatiques (Lin et al. 1990a et 1990b, Krüger et al. 1994a, 1994b, Paulus et al. 1996 et Garcia-Cabrera et al. 1996), mais les modèles décrits se limitaient uniquement à l'étude de lignées cellulaires métastatiques. Après avoir validé notre système en vérifiant les caractéristiques *in vitro* telles l'expression de marqueurs de différenciation myogénique avant et après transfection de la β -gal, et l'avoir comparé aux cellules parentales non transfectées, nous avons pu étudier le comportement des deux types cellulaires exprimant l'enzyme β -galactosidase (SMF-Da β -gal et SMF-Ai β -gal) après injection chez le rat. Les lignées transfectées ont maintenu le même comportement que les cellules parentales contrôles en ce qui concerne la formation des tumeurs et le phénotype métastatique, et ce malgré la présence d'une réaction inflammatoire associée aux tumeurs formées par la lignée SMF-Ai β -gal. Les cellules transfectées n'étaient pas affectées par le microenvironnement

tissulaire en ce qui a trait à leur capacité d'exprimer l'enzyme exogène puisque nous l'avons facilement détectée dans les tumeurs orthotopiques développées au site d'injection.

Tel que mentionné, nous avons noté la présence d'une réaction inflammatoire associée aux tumeurs formées par les cellules SMF-Ai β -gal, probablement en raison d'épitopes antigéniques apparaissant à la surface des cellules transfectées. Les nouveaux déterminants antigéniques ont probablement contribué à provoquer des réactions immunitaires cellulaires et humorales (Krüger et al. 1994a, Raz et al. 1996). Les cellules de la lignée parentale SMF-Ai n'expriment ni les molécules du CMH-1 (Herrera-Gayol et al. 1995), ni la β_2 -microglobuline (Daigneault et al. 1995), une petite protéine impliquée dans l'expression des chaînes lourdes de la classe 1. De plus, les tumeurs provoquées par l'injection des cellules de la lignée SMF-Ai ne sont pas rejetées. Nous soupçonnons donc que l'expression de β -gal suite au processus de transfection ait été responsable de la réaction inflammatoire observée dans les tumeurs induites par les cellules SMF-Ai β -gal. Toutefois, la tumorigenicité et la latence de ces tumeurs sont demeurées inchangées par rapport à celle des tumeurs induites par injection des cellules SMF-Ai comme le rapporte le groupe de Krüger (Krüger et al. 1994a).

Un de nos objectifs d'étude était de pouvoir facilement et rapidement repérer un très petit nombre de cellules après injection chez l'animal. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'il était possible de détecter les cellules de la lignée métastatique SMF-Ai β -gal dans les poumons des animaux en employant le test X-gal. Mais nous avons été fort surpris de

retrouver aussi les cellules de la lignée non métastatique SMF-Daβ-gal chez des animaux 16 jours (1 sur 3 rats) et 21 jours (3 sur 3 rats) suivant l'injection intramusculaire de ces cellules. Au jour 35 post-injection, aucune trace des cellules non métastatiques n'a été retrouvée. De plus, jamais nous n'avons observé de métastases. Une explication vraisemblable pour rendre compte de ces observations est que des cellules de la tumeur primaire auraient pu être déversées dans la circulation par un processus appelé "intravasation passive" et se retrouver aux poumons (Sugino et al. 1993). Ce concept implique que les cellules endothéliales des vaisseaux néoformés dans les tumeurs pourraient jouer un rôle dans le passage des cellules tumorales dans la circulation (Sugino et al. 1993). La présence dans les tumeurs induites par les cellules non métastatiques d'un réseau vasculaire fragile pourrait favoriser la dissémination des cellules tumorales en leur fournissant une porte d'entrée dans la circulation (Melnyk et al. 1996). Par contre, d'autres auteurs soutiennent que la présence de vaisseaux tumoraux n'est pas suffisante en soi pour le développement de métastases (Fox et al. 1997). Une étude clinique portant sur le cancer du sein n'a pu établir de corrélation significative entre l'angiogenèse dans la tumeur primaire et la présence de micrométastases dans la moelle osseuse. Selon cette étude, la présence de vaisseaux tumoraux est insuffisante pour permettre la formation de métastases car les cellules doivent impérativement franchir la matrice extracellulaire tumorale et interagir avec les néovaisseaux pour accéder à la circulation.

Des expériences de transfection de gènes impliqués dans l'angiogenèse (le VEGF ou facteur de croissance des cellules endothéliales) dans des lignées

cellulaires de tumeurs mammaires ont démontré que la vascularisation tumorale pouvait être augmentée suite à cette transfection, mais que la métastase (nombre de tumeurs secondaires formées) demeurerait inchangée (Zhang et al. 1995). De plus, puisque l'angiogenèse tumorale ne semble pas associée à l'invasion vasculaire (Fox et al. 1997) on peut en déduire que des facteurs distincts doivent coopérer pour la formation des métastases. La présence des cellules SMF-Da β -gal dans les poumons après injection dans la patte postérieure tendent à supporter la conclusion que la présence de vaisseaux tumoraux est insuffisante pour la formation de métastases par les cellules tumorales pénétrant les néovaisseaux tumoraux. En effet, nous n'avons pas observé la formation de métastases malgré la présence de rares cellules (cellules isolées et/ou en petits amas) tumorales à un site secondaire.

Une autre possibilité est que ces cellules furent déversées dans la circulation lors de l'injection et qu'elles ont survécu pendant plusieurs jours avant ou après leur arrêt dans la microcirculation pulmonaire. Étant donné que les cellules des lignées SMF-Da et SMF-Da β -gal expriment à leur surface des antigènes d'histocompatibilité de classe 1 (Babaï et Royal 1994, Herrera-Gayol et al. 1995), il est difficile d'envisager que ces cellules aient pu échapper à la surveillance immunitaire de l'animal et survivre intactes pendant 21 jours. Par contre, nous n'avons pas d'évidence d'activité proliférative pour les cellules SMF-Da β -gal détectées à 14 et à 21 jours après injection. D'autres études utilisant d'autres types de tumeurs ont montré que des cellules potentiellement métastatiques pouvaient survivre dans la circulation sans pour autant établir des colonies métastatiques permanentes dans les organes cibles (Koop et al. 1995,

Krüger et al. 1994b). Tous les facteurs impliqués dans l'incapacité des cellules des lignées SMF-Da et SMF-Da β -gal à former des métastases n'ont pas encore été élucidés mais on sait que ces lignées sont incapables de traverser des membranes basales reconstituées (Matrigel). On sait aussi que lorsqu'elles sont injectées chez les souris nues, elles forment des tumeurs qui ne métastasent pas, indiquant que le rejet immunologique n'est pas le seul facteur impliqué dans l'incapacité de ces cellules à former des métastases (Babaï et Royal 1994). Cette dernière observation suggère que le pouvoir tumorigène et métastatique des cellules sont des propriétés distinctes chez les cellules tumorales de notre modèle. D'autres mécanismes doivent contribuer à expliquer pourquoi les cellules non métastatiques de notre modèle ne parviennent pas à former des métastases.

Considérant que la localisation des cellules SMF-Da β -gal suivant l'injection intramusculaire était limitée à l'espace intravasculaire des poumons, nous avons voulu confirmer cette observation; une série d'expériences d'injection des cellules directement dans la circulation a donc été entreprise. Une injection dans la veine jugulaire provoque un arrêt rapide des cellules dans la microcirculation des poumons. Par cette technique nous avons pu confirmer que les cellules SMF-Da parentales ainsi que les cellules transfectées SMF-Da β -gal retrouvées dans les poumons à plusieurs temps post-injection étaient strictement confinées au compartiment intravasculaire tel que confirmé par des coupes de tissus enrobées en paraffine et colorées à l'HPS. On a recueilli des évidences suggérant qu'il y a prolifération cellulaire des SMF-Da β -gal au jour 7 post-injection puisque l'on a retrouvé de petits amas d'environ 10 cellules

(comme d'autres auteurs l'ont constaté - Kobayashi et al. 1997) qui n'étaient pas là aux temps plus précoces. Une étude récente (Al-Mehdi et al. 2000) confirmant cette idée suggère que ce n'est qu'après l'apparition de microcolonies franches de cellules tumorales que l'on peut confirmer la présence de métastases étant donné que leur étude a montré que les cellules tumorales ne formaient de colonies qu'à partir de 48 heures après injection. Toutefois, nous n'avons pas pu confirmer l'hypothèse de prolifération car nous ne disposions pas de coupes correspondantes colorées à l'HPS, qui auraient pu démontrer la présence ou l'absence de mitoses dans les cellules tumorales. L'absence de mitoses aurait pu suggérer la possibilité que l'amas de cellules observé était en fait un agrégat de cellules ayant survécu dans le milieu hostile de la circulation pour s'arrêter dans les poumons. Malgré cette possibilité de prolifération intravasculaire, nous n'avons jamais observé la formation de métastases.

Nous avons pu détecter des cellules immobilisées dans les capillaires pulmonaires jusqu'au jour 21 après injection intraveineuse comme nous l'avions fait pour les cellules injectées par la voie intramusculaire, mais nous n'avons pas pu examiner les poumons à plus long terme afin de déterminer le moment précis où les cellules disparaissaient complètement des poumons. Un phénomène clinique appelé «quiescence» des cellules tumorales a été invoqué et pourrait expliquer la réapparition de cellules cancéreuses même des années après le traitement du patient pour la tumeur primaire. Le phénomène de «quiescence» pourrait représenter un équilibre entre la prolifération et l'apoptose des cellules d'une microtumeur et serait relié au statut angiogénique des cellules de la tumeur (revu par Holmgren et al. 1995). Lorsque la micrométastase

développe un phénotype angiogénique et établit un réseau vasculaire, le processus apoptotique est diminué et il y a croissance tumorale (Fox et al. 1997).

Des travaux antérieurs (Fidler 1970) utilisant des cellules de mélanome B16 injectées par voie intraveineuse en direction des poumons ont montré que très peu (1%) de cellules gagnant la circulation peuvent y survivre plus de 24 heures, quoiqu'une étude plus récente (Koop et al. 1995) entreprise avec la technique de vidéomicroscopie *in vivo* a pu démontrer la survie de plus de 80% des cellules de mélanome B16F10 dans les sinusoides hépatiques (Morris et al. 1993) ou dans la microcirculation de la membrane chorioallantoïdienne embryonnaire du poulet (Koop et al. 1995) pour une période d'observation de 24 heures. Selon cette dernière étude, après injection, la majorité des cellules s'était extravasée, suggérant que l'étape critique dans le processus métastatique de ce modèle de mélanome se situe à un stade plus tardif dans la cascade métastatique, plus spécifiquement à l'étape de prolifération post-extravasation plutôt que lors des étapes préalables de survie dans la circulation ou lors de l'extravasation (Koop et al. 1995). Selon ces auteurs, cette observation suggère que seule une fraction des cellules survivant les étapes initiales de la cascade métastatique peuvent établir des métastases franches et persistantes. Cependant, les études utilisant le foie comme organe-cible de la métastase comme celles de Chambers (Chambers et al. 1995, Morris et al. 1993) doivent être interprétées avec précaution, puisque la structure de l'endothélium des capillaires hépatiques (sinusoïdes discontinues) est différente de celle que l'on retrouve dans les poumons, qui est plutôt du type capillaire avec endothélium continu (Wheater et al. 1979). Ce type de

capillaire est entouré par une membrane basale continue qui doit être digérée par des enzymes lytiques avant que les cellules tumorales puissent s'extravaser.

Le modèle utilisé par le groupe de Chambers lors de l'étude de vidéomicroscopie *in vivo* (VMIV) était basé sur le modèle de métastase hépatique, mais jusqu'à présent aucune étude du type VMIV n'a été rapportée pour le poumons. Il faut mentionner que les travaux initiaux de Fidler (Fidler 1970) sur la survie cellulaire tumorale dans la circulation utilisaient des populations de cellules de mélanome B16 qui n'étaient ni clonées, ni sélectionnées *in vivo* chez des souris, contrairement aux études VMIV qui utilisaient des cellules B16F10 sélectionnées pour leur caractère métastatique (Koop et al. 1995). La possibilité que le caractère plus agressif des cellules B16F10 et la structure endothéliale des sinusoides hépatiques favorisent l'extravasation plus importante des cellules tumorales doit être soulevée.

Nos résultats utilisant des lignées non métastatiques et métastatiques ne soutiennent donc pas la notion que la majorité des cellules tumorales parviennent à extravaser mais ne colonisent pas l'organe cible (poumons) pour donner naissance à des foyers tumoraux secondaires. Nous avons plutôt observé une élimination rapide des deux types cellulaires (une lignée métastatique et deux lignées non métastatiques) entre 1 et 24 heures post-injection, ce qui correspond à l'étape intravasculaire pour les trois lignées cellulaires que nous avons testées. Après cette période d'élimination, les cellules métastatiques SMF-Ai β -gal montrent une prolifération continue accompagnée d'extravasation, tandis que très peu

de cellules des lignées SMF-Da β -gal et RMS-Be-9 β -gal persistaient pour éventuellement disparaître. Le groupe de Tatematsu a démontré dans un modèle d'adénocarcinome prostatique la disparition dans les poumons de plus que 99% des cellules tumorales marquées avec la β -gal et injectées par la voie intraveineuse entre 2 et 3 jours suivant l'injection (Kobayashi et al. 1996). Plus récemment Al-Mehdi et al. (2000) ont proposé leur modèle de métastase pulmonaire qui n'inclut pas d'étape d'extravasation des cellules tumorales, contrairement aux modèles plus classiques. Selon les résultats de ce groupe, l'extravasation des cellules métastatiques serait rare, la majorité des cellules tumorales disparaissaient des vaisseaux rapidement et le développement de tumeurs secondaires s'effectuait à l'intérieur des vaisseaux sanguins. Les colonies micrométastatiques précoces se trouvaient entièrement dans les vaisseaux et y restaient jusqu'au moment où les métastases atteignaient un volume suffisant pour détruire les parois vasculaires (Al-Mehdi et al. 2000). Ces résultats seraient en accord avec nos observations pour les lignées cellulaires de notre modèle mais vont à l'encontre des résultats VMIV évoqués plus haut et qui indiquent une survie de la majorité des cellules dans la microcirculation de la membrane chorioallantoïdienne embryonnaire entre 24 et 31 heures après injection (Chambers et al. 1995).

Une observation encore inexpiquée concerne la disparition rapide dans les poumons des cellules de la lignée invasive et non métastasiante RMS-Be-9 β -gal. Ces cellules ne sont pas métastatiques et disparaissent rapidement du tissu pulmonaire après une injection intraveineuse, évoquant la possibilité d'un changement cellulaire survenu lors de la transfection. Quoiqu'au moment de l'injection les cellules transfectées

exprimaient à 100% l'enzyme β -gal comme l'a montré le test X-gal *in vitro*, l'instabilité génétique des cellules tumorales a pu contribuer à la perte de l'expression de l'activité enzymatique une fois les cellules en circulation. Donc, les cellules n'auraient pas disparu du tissu pulmonaire mais leur détection aurait été impossible en raison de la disparition de l'expression de l'enzyme β -galactosidase.

Cette hypothèse semble supportée par le fait que la tumeur formée chez un des trois animaux injectés dans la patte postérieure avec les cellules RMS-Be-9 β -gal ne montrait pas d'activité β -gal sur les coupes congelées de cette tumeur exposées au X-gal. Pour expliquer la disparition des cellules des poumons on pourrait invoquer un changement *in vivo* dans les cellules RMS-Be-9 β -gal accompagné d'une perte d'expression de l'enzyme transfectée. Une autre possibilité pour expliquer la perte d'activité β -gal des cellules de la tumeur implique la croissance d'un clone de cellules ayant perdu l'expression de β -gal après l'élimination par l'animal des cellules exprimant une activité β -gal. Cette hypothèse, bien qu'elle puisse expliquer la latence très longue de la tumeur, suscite d'autres questions qui restent sans réponse pour le moment, notamment, comment les cellules d'une population homogène quant à leur expression *in vitro* de l'enzyme β -gal auraient-elles pu perdre cette expression après injection chez l'animal? Soulignons cependant les observations analogues de Kobayashi et al. (1996) qui ont constaté une réduction importante de l'activité de la β -gal transfectée chez les cellules tumorales après injection sous-cutanée mais non intraveineuse.

Notre modèle de cellules tumorales marquées par la β -galactosidase présente plusieurs avantages. L'introduction du gène dans les cellules est une opération aisée et n'affecte pas les caractéristiques des lignées cellulaires du modèle. Nous avons pu détecter de rares cellules de la lignée non métastatique dans le tissu pulmonaire, apportant une information originale que ne permettait pas l'examen histopathologique traditionnel des tissus. En ce qui concerne la détection de rares cellules dans des coupes tissulaires, surtout lorsqu'elles sont de petite taille comme c'est le cas pour les cellules SMF-Ai, nos résultats démontrent un net avantage des techniques de marquages moléculaires par rapport aux méthodes conventionnelles d'investigation.

Perspectives futures

Malgré la possibilité que les cellules transfectées avec β -gal expriment des épitopes antigéniques à la surface cellulaire, comme le suggère la réaction inflammatoire observée à la périphérie des tumeurs induites par injection des cellules de la lignée SMF-Ai β -gal, la réaction immunitaire ne semble pas suffisante pour freiner la croissance tumorale. En effet, le processus métastatique des cellules transfectées se poursuit de façon identique chez les cellules parentales SMF-Ai. Par contre, le comportement tumorigène des cellules RMS-Be-9 β -gal selon notre étude préliminaire est fort différent de celui de la lignée parentale RMS-Be-9, et il serait intéressant d'injecter cette lignée transfectée à des souris nues pour évaluer l'importance du facteur de rejet immunologique et établir si ces cellules ont perdu leur capacité de former des tumeurs suite à la transfection. Si c'est le cas, la perte de tumorigénicité est-elle due à l'expression d'épitopes à la surface

des cellules transfectées, plutôt qu'à un autre changement induit par le processus de transfection?

Nos études utilisant le modèle de lignées cellulaires de rhabdomyosarcome marquées avec l'enzyme β -galactosidase nous ont permis non seulement de localiser des cellules de la lignée non métastatique SMF-Da dans les poumons après une injection orthotopique, mais aussi elles ont permis de détecter la présence de cellules de la lignée métastatique SMF-Ai dans les ganglions iliaques et les poumons beaucoup plus facilement qu'en utilisant les colorations usuelles.

Nous avons observé au cours du processus métastatique des cellules SMF-Ai β -gal très peu de croissance tumorale dans les poumons entre 21 et 35 jours après injection orthotopique de cette lignée. Il a été suggéré par Lin et al. (1990) que le transit aux poumons est nécessaire mais insuffisant pour la formation de foyers métastatiques et que d'autres altérations des cellules métastatiques sont requises. Grâce à la lignée marquée SMF-Ai β -gal, nous disposons maintenant d'un outil puissant pour étudier le rôle de certains gènes dans l'établissement de foyers métastatiques. D'autres étapes de la métastase, notamment le processus d'établissement des vaisseaux dans les micrométastases (angiogenèse) pourraient être évaluées grâce à la facilité de détecter des cellules isolées marquées par la β -gal. Ceci serait particulièrement intéressant pour l'étude des cellules SMF-Ai β -gal dans les poumons. L'utilisation de la lignée métastatique SMF-Ai β -gal pourrait apporter des nouvelles informations concernant les rôles de gènes associés au processus de la métastase des rhabdomyosarcomes à des stades différents du processus.

CONCLUSIONS

En utilisant l'approche de mutagenèse insertionnelle rétrovirale, nous avons voulu obtenir des mutants de la lignée non métastatique SMF-Da pour faciliter l'investigation de gènes impliqués ou associés au processus métastatique dans un modèle de rhabdomyosarcome de rat. Ce modèle est composé d'une lignée cellulaire fortement métastatique, SMF-Ai et de la lignée non métastatique, SMF-Da. Dans un premier temps, nous avons infecté les cellules SMF-Da avec le vecteur rétroviral défectif, N2, basé sur le virus de leucémie murine de Moloney. Dans un deuxième temps nous avons infecté les cellules SMF-Da transfectées avec le gène codant pour l'enzyme β -galactosidase avec le rétrovirus de leucémie murine de Moloney.

Nous avons jumelé à l'approche de mutagenèse rétrovirale deux outils complémentaires, soit la rétention différentielle de la Rhodamine 123 par les lignées cellulaires du modèle, et le marquage par transfection des lignées non métastatique SMF-Da et métastatique SMF-Ai avec l'enzyme β -galactosidase. Nous avons établi que les cellules non métastatiques SMF-Da de notre modèle ne renaient pas la Rho 123, tandis que les cellules métastatiques SMF-Ai au contraire l'accumulaient à de hauts niveaux. De plus, des sous-clones de la lignée SMF-Da sélectionnés pour leur plus forte rétention du colorant ont montré des différences dans leur comportement tumorigène, suggérant la possibilité d'un lien entre le comportement *in vivo* des lignées de notre modèle et la rétention de la Rhodamine 123. Par contre, aucune relation entre la rétention du colorant

par les cellules non métastatiques et leurs potentiels invasif et métastatique n'a pu être démontrée.

La technique de mutagenèse rétrovirale a été utilisée pour l'identification d'un grand nombre de gènes nouveaux, la majorité de ceux-ci étant impliqués dans des lymphomes de cellules T de rat et des leucémies murines. Nous croyons que la mobilité accrue des cellules hématopoïétiques et leur invasivité naturelle a pu contribuer au succès de l'approche par mutagenèse dans ce type cellulaire.

Des études du pouvoir oncogénique du virus de tumeur mammaire murine (MMTV) ont révélé un mécanisme de coopération entre deux gènes pour le développement des adénocarcinomes mammaires murins. En bref, ceci implique que l'activation d'un gène cellulaire par insertion rétrovirale, quoique nécessaire, n'est pas suffisante pour la tumorigenèse et que d'autres événements sont requis. Dans le cas de la tumorigenèse par MMTV, la contribution du contrôle de la prolifération cellulaire par les hormones semble cruciale.

D'après nous il n'y a aucune étude publiée rapportant l'utilisation de l'approche de mutagenèse rétrovirale chez les rhabdomyosarcomes. Nos résultats indiquent que l'intégration du provirus dans l'ADN des cellules infectées est insuffisante pour provoquer l'apparition du phénotype métastatique. Nous avons confirmé la présence de bandes d'intégrations virales dans l'ADN des cellules infectées avec les rétrovirus N2 et le virus de leucémie murine de Moloney. Dans ce dernier cas, l'activité de l'enzyme virale transcriptase inverse a aussi été détectée dans les

surnageants des cellules SMF-Da β -gal infectées, confirmant l'efficacité de l'infection. Cependant, un phénotype métastatique n'a jamais pu être observée chez les cellules infectées. Nous concluons que le modèle de rhabdomyosarcome n'est pas une cible adéquate pour l'identification de gènes impliqués dans la métastase par l'approche de la mutagenèse rétrovirale.

Le deuxième volet de notre travail consista en la transfection des cellules de notre modèle avec l'enzyme β -galactosidase. Nous avons obtenu facilement des transfectants stables de la lignée parentale SMF-Da; par contre l'obtention de clones stables exprimant la β -gal a été beaucoup plus difficile pour les cellules de la lignée métastatique SMF-Ai et pour celles de la lignée invasive mais non métastatique RMS-Be-9 β -gal, nécessitant des sous-clonages à répétition pour chacune de ces deux lignées afin d'obtenir des clones qui exprimaient de façon uniforme (toutes les cellules d'un même clone) l'enzyme transfectée. Dans le contexte de la relation existant entre la progression tumorale et l'instabilité génomique, nous suggérons que l'instabilité génomique de ces lignées, surtout pour celle de la lignée métastatique et agressive SMF-Ai, ait pu contribuer à la perte d'expression de l'enzyme transfectée, reflétant ainsi l'instabilité génomique de ces cellules.

Enfin, le travail portant sur la cinétique de la propagation des lignées cellulaires transfectées et parentales de notre modèle nous a permis de poursuivre l'étude de leur comportement *in vivo*. Quoique d'autres travaux utilisant les cellules tumorales marquées à la β -gal aient été publiés, les cellules étudiées étaient généralement métastatiques et le

marquage des cellules-ci permettait le suivi des cellules depuis le moment de l'injection jusqu'à la formation de métastases dans les organes cibles pour l'établissement des foyers métastatiques. Notre travail avec la lignée SMF-Da β -gal nous a permis de confirmer l'incapacité de ces cellules à former des métastases après injection orthotopique. Nous croyons que ce comportement est dû à l'incapacité de ces cellules à franchir les étapes précoces du processus, comme l'invasion de la membrane basale. En effet, suite à l'injection intraveineuse, les cellules ne forment pas de métastases. Il semble que les cellules non métastatiques SMF-Da β -gal ne parviennent pas non plus à extravaser après leur injection directement dans la circulation. En revanche, les cellules métastatiques SMF-Ai β -gal débutent leur extravasation entre 24 heures et 7 jours suivant l'injection. Ce résultat s'oppose donc aux travaux du groupe de Chambers, qui a montré que les cellules faiblement métastatiques de mélanome pouvaient extravaser aussi bien que les cellules métastatiques, et que le défaut dans la capacité des cellules faiblement métastatiques à former des métastases se situait plutôt à l'étape de la croissance dans l'organe cible après l'extravasation.

Il est très important de souligner que les conclusions des travaux du groupe de Chambers reposent sur un modèle où le foie est l'organe cible pour la formation de métastases. Ceci ne doit pas être considéré comme étant la norme pour le processus de la métastase. Signalons que la structure de la microcirculation hépatique est dépourvue de membrane basale et donc fondamentalement différente de celle des poumons, qui au contraire possède une membrane basale de type continu. De plus, le type de cellules utilisées a sans doute une importance capitale. Les cellules de la lignée B16F10 ont subi de multiples passages pour sélectionner les

cellules les plus métastatiques et ne se comparent en rien avec les lignées non sélectionnées de Fidler. De plus, dans ce cas particulier l'organe cible de la métastase était le poumons. À notre avis les conclusions dérivées des travaux utilisant le modèle hépatique ne devraient pas être généralisées puisque l'étape d'extravasation dans ce modèle ne reflète pas adéquatement le comportement des cellules dans les poumons. Récemment, le groupe de Muschel (Al-Mehdi et al. 2000) a proposé un nouveau modèle de métastase pulmonaire selon lequel la formation de métastases serait initiée par le contact entre les cellules tumorales et l'endothélium vasculaire, suivi par la prolifération des cellules tumorales intravasculaires et non extravasées. Lors des étapes précoces, ce modèle propose que la prolifération des cellules tumorales entièrement intravasculaires serait donc à l'origine des colonies micrométastatiques. De plus, suite à l'injection dans la circulation des cellules tumorales, ces auteurs ont observé une disparition rapide des cellules tumorales des poumons comparable à celle que nous avons noté, soutenant ainsi nos résultats.

Nous avons ensuite observé que la vaste majorité des cellules des lignées non métastatiques et métastatiques disparaissaient des poumons entre 1 heure et 6 heures après l'injection. Cette observation soutient les travaux de Fidler (1970) qui a montré que la majorité des cellules tumorales ne pouvaient survivre dans la circulation plus de 24 heures après injection. Le groupe de Culp a aussi montré que la majorité des cellules tumorales de vessie injectées par voie intraveineuse disparaissait des poumons 24 heures après injection. Tous ces résultats s'opposent aux travaux du groupe de Chambers mais, là encore, la situation dans les poumons (nos

études ainsi que celles de Fidler et Culp) ne peut être comparée à celle qui se déroule dans le foie.

En conclusion, si notre modèle de lignées cellulaires de rhabdomyosarcome de rat n'a pas permis de faire l'identification de gènes impliqués dans le processus de la métastase en utilisant l'approche de la mutagenèse rétrovirale, l'introduction du gène β -gal nous a permis de préciser l'étape limitante pour la formation des métastases dans ce modèle du rhabdomyosarcome. Nous avons pu démontrer que l'extravasation des cellules métastatiques n'est pas une caractéristique universelle du processus de la métastase et qu'il existe des différences entre la métastase hépatique et pulmonaire.

BIBLIOGRAPHIE

Aboud M et Y Hassan. Accumulation and break-down of RNA-deficient intracellular virus particles in interferon-treated NIH 3T3 cells chronically producing Moloney murine leukemia virus. *Journal of Virology*, pp 489-495, February 1983.

Alessandro R et EC Kohn. Molecular genetics of cancer. Tumor invasion and angiogenesis. *Cancer* 76, pp 1874-1877, 1995.

Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A et RJ Muschel. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nature Medicine* 6, pp 100-102, 2000.

Aoudjit F, Potworowski EF et Y St-Pierre. The metastatic characteristics of murine lymphoma cell lines *in vivo* are manifested after target organ invasion. *Blood* 91, pp 623-629, 1998.

Armentano D, Yu SF, Kantoff PW, Von Ruden T, French Anderson W et E Gilboa. Effect of internal viral sequences on the utility of retroviral vectors. *Journal of Virology* pp 1647-1650, May 1987.

Babaï F et G Tremblay. Ultrastructural study of liver invasion by Novikoff hepatoma. *Cancer Research* 32, pp 2765-2770, 1972.

Babaï F. Étude ultrastructurale sur la pathogénie de l'invasion du muscle strié par des tumeurs transplantables. *Journal of Ultrastructure Research* 56, pp 287-303, 1976.

Babaï F, Nanci A et F Affoyon. Caractères ultrastructuraux de la régression de l'hépatome de Novikoff transplanté chez des rats immunisés. *Annales de Pathologie* 6, pp 305-312, 1986.

Babaï F, Skalli O, Schurch W, Seemayer TA et G Gabbiani. Ultrastructural, immunohistochemical, biochemical features and expression of α -actin isoforms. *Virchows Archiv B Cell Pathology* 55, pp 263-277, 1988.

Babaï F et A Royal. Rat myoblastic sarcoma cell lines. A model for the study of invasion, metastasis, and myogenic differentiation. *Laboratory Investigation* 70, pp 907-915, 1994.

Bachelor L et H Fan. Isolation of recombinant DNA clones carrying complete integrated proviruses of Moloney murine leukemia virus. *Journal of Virology* pp 181-190, January 1981.

Beauger N. Étude de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, p53 et nm23, dans des rhabdomyosarcomes métastasiants et non métastasiants. Mémoire de maîtrise, Département de pathologie, Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, 1996.

Bear SE, Bellacosa A, Lazo PA, Jenkins NA, Copeland NG, Hanson C, Levan G et PN Tschlis. Provirus insertion in *Tpl-1*, an *Ets-1*-related oncogene, is associated with tumor progression in Moloney murine leukemia virus-induced rat thymic lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 86, pp 7495-7499, October 1989.

Bellahcene A, Merville MP, Gielen J, Lambotte R, Simar L et V Castronovo. La protéine p53, protectrice de l'intégrité du génome: rôle dans la genèse des cancers. *Revue Médicale de Liège* 49, no.5, pp 274-284, 1er mai 1994.

Benchimol S et V Ling. P-glycoprotein and tumor progression. *Journal of the National Cancer Institute* 86, pp 814-815, 1994.

Berns A. Provirus tagging as an instrument to identify oncogenes and to establish synergism between oncogenes. *Archives of Virology* 102, pp 1-18, 1988.

Berns A. Identification and characterization of collaborating oncogenes in compound mutant mice. *Cancer Research (suppl)* 59, pp 1773s-1777s, 1999.

Bevilacqua G, Sobel ME, Liotta LA et P Steeg. Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. *Cancer Research* 49, pp 5185-5190, 1989.

Birnbaum D et O de Lapeyrière. Activation de proto-oncogènes dans les tumeurs solides humaines. *Bulletin du Cancer* 77, pp 857-875, 1990.

Borst P et AH Schinkel. Genetic dissection of the function of mammalian P-glycoproteins. *Trends in Genetics* 13, no.6, June 1997.

Breuer ML, Cuypers HT et A Berns. Evidence for the involvement of *pim-2*, a new common proviral insertion site, in progression of lymphomas. *The EMBO Journal* 8, no.3, pp 743-747, 1989.

Brown PD, Levy AT, Margulies I, Liotta LA et WG Stetler-Stevenson. Independent expression and cellular processing of the 72-kDa type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines. *Cancer Research* 50, pp 6184-6191, 1990.

Cepko CL, Roberts BE et RC Mulligan. Construction and application of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. *Cell* 37, pp 1053-1062, 1984.

Chabert-Gisselbrecht S. Les oncogènes et leur découverte. *La Revue du Praticien* 45, pp 1873-1879, 1995.

Chambers AF et LM Matrisian. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *Journal of the National Cancer Institute* 89, pp 1260-1270, 1997.

Chambers AF, MacDonald IC, Schmidt EE, Koop S, Morris VL, Khokha R et AC Groom. Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy. *Cancer and Metastasis Reviews* 14, pp 279-301, 1995.

Chen E, Piddington R, Decker S, Park J, Yuan Z-A, Abrams W R, Rosembloom J, Feldman G et CW Gibson. Regulation of *Amelogenin* gene expression during tooth development. *Developmental Dynamics* 199, pp 189-198, 1994.

Cheng KC et LA Loeb. Genomic instability and tumor progression: mechanistic considerations. *Advances in Cancer Research* 60, pp 121-156, 1993.

Cuypers HT, Selten G, Quint W, Zijlstra M, Maandag ER, Boelens W, van Wezenbeek P, Melief C et A Berns. Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region. *Cell* 37, pp 141-150, 1984.

Cuypers HTM, Selten GC, Zijlstra M, de Goede RE, Melief CJ et AJ Berns. Tumor progression in Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomas: monitoring clonal selections with viral and cellular probes. *Journal of Virology* 60, pp 230-241, 1986.

Daigneault L, Beaulieu R, Filion M, Gaboury L, Royal A et F Babaï. Cloning and identification of genes differentially expressed in metastatic and non-metastatic rat rhabdomyosarcoma cell lines. *Clinical and Experimental Metastasis* 13, pp 345-356, 1995.

Danen EHJ, Van Muijen GNP, Van de Wiel-Van Kemenade E, Jansen KFJ, Ruiter DJ et CG Figdor. Regulation of integrin-mediated adhesion to laminin and collagen in human melanocytes and in non-metastatic and highly metastatic human melanoma cells. *International Journal of Cancer* 54, pp 315-321, 1993.

Davies J, Badiani P et K Weston. Cooperation of Myb and Myc proteins in T cell lymphomagenesis. *Oncogene* 18, pp 3643-3647, 1999.

Deryugina EI, Luo GX, Reisfeld RA, Bourdon M et A Strongin. Tumor cell invasion through Matrigel is regulated by activated matrix metalloproteinase-2. *Anticancer Research* 17, pp 3201-3210, 1997.

Desplaces A et MF Poupon. Le processus métastatique. *Bulletin du Cancer* 81, pp 751-754, 1994.

de Vries JE, ten Kate J et FT Bosman. p21ras in carcinogenesis. *Pathology Research and Practice* 192, pp 658-668, 1996.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M et J Campisi. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 92, pp 9363-9367, 1995.

Doolittle R. Hunkapiller M, Hood L, Devare S, Robbins K et H Antoniades. Simian sarcoma virus oncogene, *v-sis*, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* 221, pp 275-277, 1983.

Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel A, Manseau EJ, Van de Water L et DR Senger. Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *Journal of Experimental Medicine* 174, pp 1275-1278, 1991.

Effert PJ et TG Strohmeyer. Theories on the metastatic process and possible therapeutic options. *Urological Research* 23, pp 11-19, 1995.

Efferth T, Löhcke H et M Volm. Reciprocal correlation between expression of P-glycoprotein and accumulation of Rhodamine 123 in human tumors. *Anticancer Research* 9, pp 1633-1638, 1989.

Eglitis MA, Kantoff P, Gilboa E et WF Anderson. Gene expression in mice after high-efficiency retroviral-mediated gene transfer. *Science* 230, no.4732, pp 1395-1398, December 20, 1985.

El-Sabban ME et BU Pauli. Adhesion-mediated gap junctional communication between lung-metastatic cancer cells and endothelium. *Invasion Metastasis* 14, pp 164-176, 1994-95.

Ewing J Metastasis; in *Neoplastic diseases*; 3rd ed, chapt.4, 1928.

Fearon ER et B Vogelstein. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, pp 759-767, June 1st, 1990.

Fidler IJ Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor cell emboli labeled with ¹²⁵I-5-iododeoxyuridine. *Journal of the National Cancer Institute* 45, pp 773-782, 1970.

Fidler IJ, Gersten DM et CW Riggs. Relationship of host immune status to tumor cell arrest, distribution, and survival in experimental metastasis. *Cancer* 40, pp 46-55, 1977.

Fidler IJ et JE Talmadge. Evidence that intravenously derived murine pulmonary metastases can originate from the expansion of a single tumour cell. *Cancer Research* 46, pp 5167-5171, 1986.

Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes Memorial award lecture. *Cancer Research* 50, pp 6130-6138, 1990.

Fidler IJ. Cancer metastasis. *British Medical Bulletin* 47, no.1, pp 157-177, 1991.

Fidler IJ et LM Ellis. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 79, pp 185-188, 1994.

Fisher J et SP Goff. Mutational analysis of stem-loops in the RNA packaging signal of the Moloney murine leukemia virus. *Virology* 244, pp 133-145, 1998.

Fisher B et ER Fisher. The interrelationship of hematogenous and lymphatic tumor cell dissemination. *Surgical Gynecology and Obstetrics* 122, pp 791-797, 1966.

Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine* 1, pp 27-31, 1995.

Fox SB, Leek RD, Bliss J, Mansi JL, Gusterson B, Gatter KC et AL Harris. Association of tumor angiogenesis with bone marrow micrometastases in breast cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute* 89, pp 1044-1049, 1997.

Freije JMP, MacDonald NJ et PS Steeg. Differential gene expression in tumor metastasis: Nm23. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 231 (part 2), pp 215-232, 1996.

Friedrich G et P Soriano. Insertional mutagenesis by retroviruses and promoter traps in embryonic stem cells. *Methods in Enzymology* 225, pp 681-701, 1993.

Gao AC, Lou W, Dong JT et JT Isaacs. CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. *Cancer Research* 57, pp 846-849, 1997.

Garcia-Cabrera I, Edvardsen K, Tysnes BB, Read T et R Bjerkvig. The lac-z reporter gene: a tool for *in vitro* studies of malignant glioma cell invasion. *Invasion & Metastasis* 16, pp 107-115, 1996.

Gimbrone MA Jr, Leapman SB, Cotran RS et J Folkman. Tumor dormancy *in vivo* by prevention of neovascularization. *Journal of Experimental Medicine* 136, pp 261-276, 1972.

Goff SP. Genetics of replication of Moloney murine leukemia virus. Dans: *Retroviruses and Disease*, pp. 1-19, édité par Hanafusa, Pinter et Pullman, Academic Press, New York, 1989.

Greene GF, Kitadai Y, Pettaway CA, von Eschenbach AC, Bucana CD et IJ Fidler. Correlation of metastasis-related gene expression with metastatic potential in human prostate carcinoma cells implanted in nude mice using an *in situ* messenger RNA hybridization technique. *American Journal of Pathology* 150, no.5, pp 1571-1582, May 1997.

Gunduz M, Ayhan A, Gullu I, Onerci M, Hosal AS, Gursel B, Hosal IN et D Firat. *nm23* protein expression in larynx cancer and the relationship with metastasis. *European Journal of Cancer* 33, pp 2338-2341, 1997.

Gutman M et IJ Fidler. Biology of human colon cancer metastasis. *World Journal of Surgery* 19, pp 226-234, 1995.

Habets GGM, Scholtes EHM, Zuydgeest D, van der Kammen RA, Stam JC, Berns A et JG Collard. Identification of an invasion-inducing gene, *Tiam-1* that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell* 77, pp 537-549, 1994.

Hall PA et DP Lane. Genetics of growth arrest and cell death: key determinants of tissue homeostasis. *European Journal of Cancer* 30A, no.13, pp 2001-2012, 1994.

Hanahan D et J Folkman. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, pp 353-364, 1996.

Hanania N, Boyano MD, Mangin C et MF Poupon. Oncogene and *MDR1* gene expression in rat rhabdomyosarcoma sublines of different metastatic potential. *Anticancer Research* 11, pp 473-480, 1991.

Hanna Z, Jankowski M, Tremblay P, Jiang X, Milatovich A, Francke U et P Jolicoeur. The *Vin-1* gene, identified by provirus insertional mutagenesis, is the cyclin D2. *Oncogene* 8, pp 1661-1666, 1993.

Hart IR, Goode NT et RE Wilson. Molecular aspects of the metastatic cascade. *Biochimica et Biophysica Acta* 989, pp 65-84, 1989.

Hart IR et D Easty. Identification of genes controlling metastatic behaviour. *British Journal of Cancer* 63, pp 9-12, 1991.

Hart IR, Talmadge JE et IJ Fidler. Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. *Cancer Research* 41, pp 1281-1287, 1981.

Hatton JD et L Lin. Demonstration of specific neuronal cell groups in rat brain by β -galactosidase enzyme histochemistry. *Journal of Neuroscience Methods* 45, pp 147-153, 1992.

Hayward WS, Neel BG et SM Astrin. Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. *Nature* 209, pp 475-480, 1981.

Herrera-Gayol A, Royal A et F Babai. Correlation between cell differentiation stage, types of invasion, and hematogenous metastasis in experimental rhabdomyosarcomas. *Experimental and Molecular Pathology* 63, pp 1-15, 1995.

Hill RP. Metastasis. Dans: *The Basic Science of Oncology*. 2e édition. 1992 par McGraw-Hill Inc. Édité par I.F. Tannock et R.P. Hill.

Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD et SJ Wiegand. Vessel cooption, regression and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284, pp 1994-1998, 1999.

Hollingworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothenberg ML et MJ Merino. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *American Journal of Pathology* 147, pp 33-41, 1995.

Holmgren L. Antiangiogenesis restricted tumor dormancy. *Cancer and Metastasis Reviews* 15, pp 241-245, 1996.

Holmgren L, O'Reilly MS et J Folkman. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Medicine* 1, pp 149-153, 1995.

Honn KV et DG Tang. Adhesion molecules and tumor cell interaction with endothelium and subendothelial matrix. *Cancer and Metastasis Reviews* 11, pp 353-375, 1992.

Humphries MJ, Olden K et KM Yamada. A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science* 233, pp 467-470, 1986.

Janin N. Introduction au processus de la cancérogenèse: les cancers sont des maladies génétiques somatiques. *Revue de Médecine Interne* 15, no.12, pp 821-829, 1994.

Jardillier JC, Colin M, Bobichon H, Akeli MG, Delvincourt C et C Madoulet. Le phénotype de résistance multidrogue: quelques caractéristiques morphologiques et biologiques autres que la pompe à efflux. *Bulletin du Cancer* 81, pp 392-399, 1994.

Jeanteur P, Theillet C et H Pujol. Oncogènes, anti-oncogènes et leurs altérations dans les tumeurs humaines. *La Revue de Médecine Interne* tome XI, pp 216-220, 1990.

Jiang WG, Puntis MCA et MB Hallett. Molecular and cellular basis of cancer invasion and metastasis: implications for treatment. *British Journal of Surgery* 81, pp 1576-1590, 1994.

Jones JL et RA Walker. Control of matrix metalloproteinase activity in cancer. *Journal of Pathology* 183, pp 377-379, 1997.

Jonkers J et A Berns. Retroviral insertional mutagenesis as a strategy to identify cancer genes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1287, pp 29-57, 1996.

Jonkers J, Weening JJ, van der Valk M, Bobeldijk R et A Berns. Overexpression of *Frat1* in transgenic mice leads to glomerulosclerosis and nephrotic syndrome and provides direct evidence for the involvement of *Frat1* in lymphoma progression. *Oncogene* 18, pp 5982-5990, 1999.

Jouanneau J, Bellusci S, Moens G et JP Thiery. Aspect moléculaire de l'invasion et de la métastase. *Pathologie Biologie* 43, pp 181-187, 1995.

Kahn A. Génétique et cancer: progrès et perspectives. *Pathologie Biologie* 43, no.3, pp 139-142, 1995.

Kantor JD, McCornick B, Steeg PS et BR Zetter. Inhibition of cell motility after *nm23* transfection of human and murine tumor cells. *Cancer Research* 53, pp 1971-1973, 1993.

Keller G, Paige C, Gilboa E et EF Wagner. Expression of a foreign gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent haematopoietic precursors. *Nature* 318, pp 149-154, 1985.

Kerbel RS, Waghorne C et B Korczac. Clonal dominance of primary tumors by metastatic cells: genetic analysis and biological implications. *Cancer Surveys* 7, pp 597-629. 1988.

Kerr JFR, Wyllie AH et AR Currie. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26, pp 239-257, 1972.

Kitadai Y, Bucana CD, Ellis LM, Anzai H, Tahara E et IJ Fidler. *In situ* hybridization technique for analysis of metastasis-related genes in human colon carcinoma cells. *American Journal of Pathology* 147, no.5, pp 1238-1247, November 1995.

Kitadai Y, Ellis LM, Tucker SL, Greene GF, Bucana CD, Cleary KR, Takahashi Y, Tahara E et IJ Fidler. Multiparametric *in situ* mRNA hybridization analysis to predict disease recurrence in patients with colon carcinoma. *American Journal of Pathology* 149, no.5, pp 1541-1551, November 1996.

Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 68, pp 820-823, 1971.

Knudson AG. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Research* 45, pp 1437-1443, 1985.

Knudson AG. Mutation and cancer: A personal odyssey. *Advances in Cancer Research* 67, pp 1-23, 1995.

Kobayashi K, Nakanishi H, Inada KI, Fujimitsu Y, Yamachika T, Shirai T et M Tatematsu. Growth characteristics in the initial stage of micrometastasis formation by bacterial *lac-Z* gene tagged rat prostatic adenocarcinoma cells. *Japanese Journal of Cancer Research* 87, pp 1227-1234, 1996.

Kobayashi K, Nakanishi H, Masuda A, Tezuka N, Mutai M et M Tatematsu. Sequential observation of micrometastasis formation by bacterial *lacZ* gene-tagged Lewis lung carcinoma cells. *Cancer Letters* 112, pp 191-198, 1997.

Kogerman P, Sy MS et LA Culp. Counter-selection for over-expressed human CD44s in primary tumors versus lung metastases in a mouse fibrosarcoma model. *Oncogene* 15, pp 1407-1416, 1997.

Kohn EC et LA Liotta. Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. *Cancer Research* 55, pp 1856-1862, May 1, 1995.

Kohn EC. Development and prevention of metastasis. *Anticancer Research* 13, pp 2553-2560, 1993.

Koop S, MacDonald IC, Luzzi K, Schmidt EE, Morris VL, Grattan M, Khokha R, Chambers AF et AC Groom. Fate of melanoma cells entering the microcirculation: over 80% survive and extravasate. *Cancer Research* 55, pp 2520-2523, 1995.

Krüger A, Schirmacher V et P von Hoegen. Scattered micrometastases visualized at the single-cell level: detection and re-isolation of *lacZ*-labeled metastasized lymphoma cells. *International Journal of Cancer* 58, pp 275-284, 1994a.

Krüger A, Umansky V, Rocha M, Hacker HJ, Schirmacher V et P von Hoegen. Pattern and load of spontaneous liver metastasis dependent on host immune status studied with a *lacZ* transduced lymphoma. *Blood* 84, pp 3166-3174, 1994b.

Lane DP. Tumour suppressor genes and p53. Dans: *Viruses and Cancer*, édité par Minson, Neil et McCrae, pp 15-25, Cambridge University Press, 1994.

Laughlin MA et RJ Pomerantz. Overview of retrovirology. Dans: *Retroviral Latency*, pp 1-10. R.G. Landes Company, Georgetown (Texas), 1994.

Lee HY, Clair T, Mulvaney PT, Woodhouse EC, Aznavoorian S, Liotta LS et ML Stracke. Stimulation of tumor cell motility linked to phosphodiesterase catalytic site of autotaxin. *The Journal of Biological Chemistry* 271, pp 24408-24412, 1996.

Lemay G et P Jolicoeur. Rearrangement of a DNA sequence homologous to a cell-virus junction fragment in several Moloney murine leukemia virus-induced rat thymomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 81, pp 38-42, 1984.

Leone A, Flatow U, Richter King C, Sandeen MA, Margulies MK, Liotta LA et PS Steeg. Reduced tumor incidence, metastatic potential, and cytokine responsiveness of *nm23*-transfected melanoma cells. *Cell* 65, pp 25-35, 1991.

Levy JP. Avant-propos. *Revue du Practicien* 45, pp 1865-1866, 1995.

Lin W, Pretlow TP, Pretlow II TG et LA Culp. Bacterial *lacZ* gene as a highly sensitive marker to detect micrometastasis formation during tumor progression. *Cancer Research* 50, pp 808-2817, 1990a.

Lin W, Pretlow TP, Pretlow II TG et LA Culp. Development of micrometastases: earliest events detected with bacterial *lacZ* gene-tagged tumor cells. *Journal of the National Cancer Institute* 82, pp 1497-1503, 1990b.

Liotta LA. Tumor invasion and metastases - role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture. *Cancer Research* 46, pp 1-7, 1986.

Liotta LA, Mandler R, Murano G, Katz DA, Gordon RK, Chiang PK et E Schiffmann. Tumor cell autocrine motility factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 83, pp 3302-3306, 1986b.

Liotta LA et WG Stetler-Stevenson. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Research* 51 (supplement) pp 5054s-5059s, 1991.

MacDonald NJ, De La Rosa A et PS Steeg. The potential roles of *nm23* in cancer metastasis and cellular differentiation. *European Journal of Cancer* 31A, pp 1096-1100, 1995.

Mann R, Mulligan RC et D Baltimore. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* 33, pp 153-159. 1983.

Marin M, Étienne-Julan M, Piechaczyk M et D Noël. L'intégration des rétrovirus: faits et croyances. *Médecine/Sciences* 10, pp 318-324, 1994.

Markowitz DG, Goff SP et A Bank. Safe and efficient ecotropic and amphotropic packaging lines for use in gene transfer experiments. *Transactions of the Association of American Physicians* 101, pp 212-218, 1988a.

Markowitz D, Goff S et A Bank. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* 167, pp 400-406, 1988b.

Markowitz D, Goff S et A Bank. Construction of a safe and efficient retrovirus packaging cell line. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 241, pp 35-40, 1988c.

Markowitz D, Hesdorffer C, Ward M, Goff S et A Bank. Retroviral gene transfer using safe and efficient packaging cell lines. *Annals of the New York Academy of Sciences* 612, pp 407-414, 1990.

Matsumoto K, Ziober BL, Yao CC et RH Kramer. Growth factor regulation of integrin-mediated cell motility. *Cancer and Metastasis Reviews* 14, pp 205-217, 1995.

May P et E May. p53 et cancers. *Pathologie Biologie* 43, no.3, pp 165-173, 1995.

Melnyk O, Shuman MA et K Jin Kim. Vascular endothelial growth factor promotes tumor dissemination by a mechanism distinct from its effect on primary tumor growth. *Cancer Research* 56, pp 921-924, 1996.

Mitchell CD. Recessive oncogenes, antioncogenes and tumour suppression. *British Medical Bulletin* 47, pp 136-156, 1991.

Monier R. La transformation cellulaire. *La Revue du Practicien* 45, pp 1867-1872, 1995.

Morris VL, MacDonald IC, Koop S, Schmidt EE, Chambers AF et AC Groom. Early interactions of cancer cells with the microvasculature in mouse liver and muscle during hematogenous metastasis: videomicroscopic analysis. *Clinical and Experimental Metastasis* 11, pp 377-390, 1993.

Muenchau DD, Freeman SM, Cornetta K, Zwiebel JA et WF Anderson. Analysis of retroviral packaging lines for generation of replication-competent virus. *Virology* 176, pp 262-265, 1990.

Murray C. Tumour dormancy: not so sleepy after all. *Nature Medicine*, 1, pp 117-118, 1995.

Myeroff LL et SD Markowitz. Increased nm23-H1 and nm23-H2 messenger RNA expression and absence of mutations in colon carcinomas of low and high metastatic potential. *Journal of the National Cancer Institute* 85, no.2, pp 147-152, January 20, 1993.

Nabi IR, Watanabe H et A Raz. Identification of B16-F1 melanoma autocrine motility-like factor receptor. *Cancer Research* 50, pp 409-414, 1990.

Nabi IR, Watanabe H et A Raz. Autocrine motility factor and its receptor: Role in locomotion and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* 11, pp 5-20, 1992.

Nadakavukaren KK, Nadakavukaren JJ et LB Chen. Increased Rhodamine 123 uptake by carcinoma cells. *Cancer Research* 45, pp 6093-6099, 1985.

Natarajan D et CA Boulter. Isolation of genomic sequences flanking a retroviral insertion site using a novel PCR-based method. *Gene* 161, pp 195-198, 1995.

Nazarov V, Hilbert D et L Wolff. Susceptibility and resistance to Moloney murine leukemia virus-induced promonocytic leukemia. *Virology* 205, pp 479-485, 1994.

Nusse R et HE Varmus. Many tumors induced by the Mouse Mammary Tumor Virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31, pp 99-109, 1982.

Nusse R, van Ooyen A, Cox D, Fung YKT et H Varmus. Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (*int-1*) on mouse chromosome 15. *Nature* 307, pp 131-136, 1984.

Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackelford G, McMahon A, Moon R et H Varmus. A new nomenclature for *int-1* and related genes: the *Wnt* gene family. *Cell* 64, p 231, 1991.

Oates AJ, Barraclough R et PS Rudland. The role of osteopontin in tumorigenesis and metastasis. *Invasion Metastasis* 17, pp 1-15, 1997.

Olson TM, Hirohata S, Ye J, Leco K, Seldin MF et SS Apte. Cloning of the human tissue inhibitor of metalloproteinase-4 gene (TIMP4) and localization of the TIMP4 and *Timp4* genes to human chromosome 3p25 and mouse chromosome 6, respectively. *Genomics* 51, pp 148-151, 1998.

Ostankovitch M, Choppin J et JG Guillet. Antigénicité des cellules tumorales: cancers et vaccins. *La Revue du Practicien* 45, pp 1921-1926, 1995.

Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1, pp 571-573, 1889.

Palumbo AP, Boccadoro M, Battaglio S, Corradini P, Tsihchlis PN, Huebner K, Pibri A et CM Croce. Human homologue of Moloney leukemia virus integrated-4 locus (*MLVI-4*) located 20 kilobases 3' of the *myc* gene, is rearranged in multiple myeloma. *Cancer Research* 50, pp 6478-6482, 1990.

Paulus W, Baur I, Beutler AS et SA Reeves. Diffuse brain invasion of glioma cells requires $\beta 1$ integrins. *Laboratory Investigation* 75, pp 819-826, 1996.

Peters G, Brookes S, Smith R et C Dickson. Tumorigenesis by Mouse Mammary Tumor Virus: evidence for a common region for provirus integration in mammary tumors. *Cell* 33, pp 369-377, 1983.

Peters G, Lee AE et C Dickson. Concerted activity of 2 potential proto-oncogenes in carcinomas induced by mouse mammary tumour virus. *Nature* 320, pp 628-631, 1986.

Peters G. Oncogenes at viral integration sites. *Cell Growth & Differentiation* 1, pp 503-510, 1990.

Petriz J et J Garcia-Lopez. Flow cytometric analysis of P-glycoprotein function using rhodamine 123. *Leukemia* 11, pp 1124-1130, 1997.

Piedbois P et E Clauser. Pour la pratique. *La Revue du Practicien* 45, pp 1933-1937, 1995.

Pimentel E. *Oncogenes 1*, 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, Florida. 1989.

Poupon MF. De la cellule tumorale à la métastase. *Bulletin du Cancer* 80 (10 Suppl.), pp 5-10, 1993.

Poupon MF. La métastase des cancers. *Bulletin du Cancer* 82, Suppl.2, pp 93s-100s, 1995.

Powell SK, Kaloss M, Burimski I, Weaver L, Long Z, Lyons R, McGarrity GJ et E Otto. In vitro analysis of transforming potential associated with retroviral vector associations. *Human Gene Therapy* 10, pp 2123-2132, 1999.

Pozzatti R, Muschel R, Williams J, Padmanabhan R, Howard B, Liotta L et G Khoury. Primary rat embryo cells transformed by one or two oncogenes show different metastatic potentials. *Science* 232, pp 223-227, 1986.

Price JT, Bonovich MT et E C Kohn. The biochemistry of cancer dissemination. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 32, no.3, pp 175-253, 1997.

Radinsky R, Weisberg HZ, Staroselsky AN et IJ Fidler. Expression level of the *nm23* gene in clonal populations of metastatic murine and human neoplasms. *Cancer Research* 52, pp 5808-5814, 1992.

Raz E, Tighe H, Sato Y, Corr M, Dudler JA, Roman M, Swain SL, Spiegelberg HL et DA Carson. Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 93, pp 5141-5145, May 1996.

Remy L. Données récentes sur les métalloprotéinases, acteurs incontournables de la progression tumorale. *Pathologie et Biologie* 45, pp 759-765, 1997.

Reynolds TY, Rockwell S et M Glazer. Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Research* 56, pp 5754-5757, 1996.

Robbins SL et V Kumar. *Basic Pathology*. 4e edition, W.B. Saunders et Co., pp. 182-234, 1987.

Roelink H, Wagenaar E et H Varmus. Amplification and proviral activation of several *Wnt* genes during progression and clonal activation of mouse mammary tumors. *Oncogene* 7, pp 487-492, 1992.

Rohdewohld H, Weiher H, Reik W, Jaenisch R et M Breindl. Retrovirus integration and chromatin structure: Moloney murine leukemia proviral integration sites map near DNase I-hypersensitive sites. *Journal of Virology*, pp.336-343, Feb. 1987.

Rowe WP, Pugh WE et JW Hartley. Plaque assay techniques for murine leukemia viruses. *Virology* 42, pp 1136-1139, 1970.

Sanes JR, Rubenstein JLR et J-F Nicolas. Use of a recombinant Retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO* 5, no.12, pp 3133-3142, 1986.

Santoni-Rugiu E et JA Silverman. Functional characterization of the rat *mdr1b* encoded P-glycoprotein: not all inducing agents are substrates. *Carcinogenesis* 18, no.11, pp2255-2263, 1997.

Scarpa M, Cournoyer D, Muzny DM, Moore KA, Belmont JW et CT Caskey. Characterization of recombinant helper retroviruses from Moloney-based vectors in ecotropic and amphotropic packaging cell lines. *Virology* 180, pp 849-852, 1991.

Scherdin U, Rhodes K et M Breindl. Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration. *Journal of Virology* 64, pp 907-912, Feb. 1990.

Schwartz ML. Signaling by integrins: implications for tumorigenesis. *Cancer Research* 53, pp 1503-1506, 1993.

Schwartzberg P, Colicelli J et SP Goff. Construction and analysis of deletion mutations in the *pol* gene of Moloney Murine Leukemia Virus: a new viral function required for productive infection. *Cell* 37, pp 1043-1052, 1984.

Scotlandi K, Serra M, Nicoletti G, Vaccari M, Manara MC, Nini G, Landuzzi L, Colacci A, Bacci G, Bertoni F, Picci P, Campanacci M et N Baldini. Multidrug resistance and malignancy in human osteosarcoma. *Cancer Research* 56, pp 2434-2439, May 1996.

Shackleford GM et HE Varmus. Construction of a clonable, infectious, and tumorigenic mouse mammary tumour virus provirus and a derivative genetic vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 85, pp 9655-9659, December 1988.

Shackleford GM, MacArthur CA, Kwan HC et HE Varmus. Mouse mammary tumor virus infection accelerates mammary carcinogenesis in *Wnt-1* transgenic mice by insertional activation of *int-2/Fgf-3* and *hst/Fgf-4*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 90, pp 740-744, 1993.

Sheppard RD, Samant SA, Rosenberg M, Silver LM et MD Cole. Transgenic N-myc mouse model for indolent B cell lymphoma: tumor characterization and analysis of genetic alterations in spontaneous and retrovirally accelerated tumors. *Oncogene* 17, pp 2073-2085, 1998.

Silverman JA, Raunio H, Gant TW et SS Thorgeirsson. Cloning and characterization of a member of the rat multidrug resistance (*mdr*) gene family. *Gene* 106, pp 229-236, 1991.

Simard D et IR Nabi. Inverse relation of autocrine motility factor receptor and E-cadherin expression following MDCK epithelial cell transformation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 219, pp 122-127, 1996.

Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA et ME Sobel. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *Journal of the National Cancer Institute* 80, pp 200-204, 1988.

Steel CM Identification and characterisation of cancer genes. *British Medical Bulletin* 50, no.3, pp 536-559, 1994.

Stehelin D, Guntaka RV, Varmus HE, et JM Bishop JM. Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses. *Journal of Molecular Biology* 101, pp 349-365, 1976.

Sugino T, Kawaguchi T et T Suzuki. Sequential process of blood-borne lung metastases of spontaneous mammary carcinoma in C3H mice. *International Journal of Cancer* 55, pp 141-147, 1993.

Takahara Y, Hamada K et DE Housman. A new retrovirus packaging cell for transfer constructed from amplified long terminal repeat-free chimeric proviral genes. *Journal of Virology*, pp 3725-3732, June 1992.

Tang DG et KV Honn. Adhesion molecules and tumor metastasis: an update. *Invasion Metastasis* 14, pp 109-122, 1994-95.

Thiery JP et X Sastre-Garau. Processus métastatique. *La Revue du Practicien* 45, pp 1909-1919, 1995.

Thomas G. Identification des oncogènes et des anti-oncogènes. *Pathologie Biologie* 43, pp 143-149, 1995.

Thomas L. CD44, récepteur cellulaire à l'acide hyaluronique. Acteur de l'invasion néoplasique et de la dissémination métastatique. *Bulletin du Cancer* 80, pp 833-844, 1993.

Thorlacius H, Prieto J, Raud J, Gautam N, Patarroyo M, Hedqvist P et L Lindbom. Tumor cell arrest in the microcirculation: lack of evidence for a leukocyte-like rolling adhesive interaction with the vascular endothelium in vivo. *Clinical Immunology and Immunopathology* 83, pp 68-76, 1997.

Tremblay PJ, Kozak CA et P Jolicoeur. Identification of a novel gene, *Vin-1*, in Murine Leukemia Virus-induced T-cell leukemias by provirus insertional mutagenesis. *Journal of Virology* 66, pp 1344-1353, 1992.

Tsichlis PN, Gunter Strauss P et LF Hu. A common region for proviral DNA integraton in MoMuLV-induced rat thymic lymphomas. *Nature* 302, pp 445-449, 1983.

Tsichlis PN. Oncogenesis by Moloney Murine Leukemia Virus. *Anticancer Research* 7, pp 171-180, 1987.

Tsichlis PN, Makris A, Patriotis C, Gilks CB, Bellacosa A et SE Bear. Progression of retrovirus induced rodent T cell lymphomas, and regulation of T cell growth: an insertional mutagenesis based genetic strategy. Dans: *Viruses and Cancer*, édité par Minson, Neil et McCrae, pp 247-264, Cambridge University Press, 1994.

Tsichlis PN et PA Lazo. Virus-host interaction and pathogenesis of murine and human oncogenic retroviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 171, pp 95-171, 1995.

Turley EA. Molecular mechanisms of cell motility. *Cancer and Metastasis Reviews* 11, pp 1-3, 1992.

Tuszynski GP Wang TN et D Berger. Adhesive proteins and the hematogenous spread of cancer. *Acta Haematologica* 97, pp 29-39, 1997.

Underwood JCE. Tumours: benign and malignant. Dans: *General and Systematic Pathology*, édité par JCE Underwood. pp 238-240. Churchill Livingstone 1992.

van der Blik AM, Kooiman PM, Schneider C et P Borst. Sequence of *mdr3* cDNA encoding a human P-glycoprotein. *Gene* 71, pp 401-411, 1988.

van Lohuizen M et A Berns. Tumorigenesis by slow-transforming retroviruses - an update. *Biochimica et Biophysica Acta* 1032, pp 213-235, 1990.

Varmus HE, Quintrell N et S Ortiz. Retroviruses as mutagens: insertion and excision of a nontransforming provirus alter expression of a resident transforming provirus. *Cell* 25, pp 23-36, 1981.

Verheul HMW, Hoekman K, Luykx-de Bakker S, Eekman CA, Folman CC, Broxterman HJ et HM Pinedo. Platelet: transporter of vascular endothelial growth factor. *Clinical Cancer Research* 3, pp 2187-2190, 1997.

Vijaya S, Steffen DL, Kozak C et HL Robinson. *Dsi-1*, a region with frequent proviral insertions in Moloney Murine Leukemia Virus-induced rat thymomas. *Journal of Virology* 61, pp 1164-1170, 1987.

Villemur R, Monczak Y, Rassart E, Kozak C et P Jolicoeur. Identification of a new common provirus integration site in gross passage. A murine leukemia virus-induced mouse thymoma DNA. *Molecular and Cellular Biology* 7, no.1, pp 512-522, January 1987.

Waltz DA, Natkin LR, Fujita RM, Wei Y et HA Chapman. Plasmin and plasminogen activator inhibitor type I promote cellular motility by regulating the interaction between the urokinase receptor and vitronectin. *Journal of Clinical Investigation* 100, pp 58-67, 1997.

Waterfield M, Scrace G, Whittle N, Stroobant P, Johnsson A, Wasteson A, Westermark B, Heldin CH, Huang JS et TF Deuel. Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28sis of simian sarcoma virus. *Nature* 304, pp 35-39, 1983.

Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Alfred EN, Moore DH, Meli S et G Gasparini. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early stage breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 84, pp 1875-1887, 1992.

Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Research* 49, pp 3713-3721, July 15, 1989.

Weinberg RA. The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 758, pp 331-338, June 30, 1995.

Weiss L, Nannmark U, Johansson BR et U Bagge. Lethal deformation of cancer cells in the microcirculation: a potential rate regulator of hematogenous metastasis. *International Journal of Cancer* 50, pp 103-107, 1992.

Weiss L. Cell adhesion molecules: a critical examination of their role in metastasis. *Invasion Metastasis* 14, pp 192-197, 1994-95.

Wheater PR, Burkitt HG et VG Daniels. Dans: *Functional histology. A text and colour atlas.* Churchill Livingstone 1979.

Wilson CL, Heppner KJ, Labosky PA, Hogan BL et LM Matrisian. Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 94, pp 1402-1407, 1997.

Woodhouse EC, Chuaqui RF et LA Liotta. General mechanisms of metastasis. *Cancer* 80, pp 1529-1537, 1997.

Yeatman TJ, UpdykeTV, Kaetzel MA, Dedman JR et GL Nicolson. Expression of annexins on the surfaces of non-metastatic and metastatic human and rodent tumor cells. *Clinical and Experimental Metastasis* 11, pp 37-44, 1993.

You J, Miele ME, Dong C et DR Welch. Suppression of human melanoma metastasis by introduction of chromosome 6 may be partially due to inhibition of motility, but not to inhibition of invasion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 208, pp 476-484, 1995.

Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. Annual Revue of Medicine 49, pp 407-424. 1998.

Zhang HT, Craft P, Scott PA, Ziche M, Weich HA, Harris AL et R Bicknell. Enhancement of tumor growth and vascular density by transfection of vascular endothelial cell growth factor into MCF-7 human breast carcinoma cells. Journal of the National Cancer Institute 87, pp 213-219, 1995.