

CANCERS RADIO-INDUITS

Étude sur des cellules en culture

Au même titre que d'autres agents physiques ou chimiques, les rayonnements ionisants peuvent induire des cancers. Les recherches sur des cellules en culture, en complément des études cliniques, épidémiologiques et des études in vivo, permettent de préciser comment et à quel niveau un agent est susceptible d'intervenir – directement ou non – dans le processus de cancérogenèse, et donc d'évaluer le risque lié à l'exposition à cet agent.



● ● ● ● ●
 Microscope à fluorescence utilisé au CEA/Fontenay-aux-Roses pour la technique du painting ("peinture") des chromosomes.

A. Gorini/CEA

78

Les enquêtes **épidémiologiques** montrent que certaines substances (tabac, amiante, divers produits chimiques...) ou agents physiques (rayons ultraviolets, **rayonnements ionisants**,...) sont capables d'induire des cancers. Les données sont toutefois le plus souvent incomplètes, en particulier dans le domaine de l'évaluation du risque en fonction de la **dose** ou de la durée d'exposition.

Il est donc nécessaire de recourir à l'expérimentation pour confirmer et compléter les résultats des enquêtes épidémiologiques, en faisant varier les conditions d'exposition aux rayonne-

ments (dose, **débit de dose**...) et en y associant éventuellement d'autres agents, chimiques ou physiques, susceptibles de modifier la réponse afin d'évaluer l'influence des divers facteurs sur l'incidence des cancers. Des expériences peuvent être effectuées **in vivo** sur des animaux exposés à l'agent cancérogène potentiel, en comptabilisant le nombre de cancers survenus. Cependant, ces études sont assez coûteuses et longues, car il est en principe nécessaire de suivre les animaux pendant leur durée de vie, qui est de 2 à 3 ans pour les rongeurs. D'autres expériences sont plus aisément réalisables **in vitro**, sur des **cellules** en

culture. Elles constituent des tests de **transformation cellulaire** (encadré).

L'estimation du risque peut se faire par une approche quantitative directe qui reste toutefois, pour les faibles doses, limitée par des problèmes statistiques, comme l'incidence spontanée, la taille des populations soumises à chaque gamme de dose... Une approche complémentaire, développée en parallèle, consiste à rechercher les mécanismes de la **cancérogenèse**. En effet, la connaissance de ces mécanismes devrait permettre de préciser si un agent, physique ou chimique est en mesure d'intervenir dans le processus de cancérogenèse et à quel niveau, et donc

d'évaluer le risque lié à l'exposition à cet agent. Ces recherches sont réalisées *in vivo* sur des animaux ou *in vitro* sur des cellules en culture. Les modèles *in vitro* ont l'avantage d'offrir la possibilité d'étudier certaines étapes sans avoir recours à un trop grand nombre d'animaux.

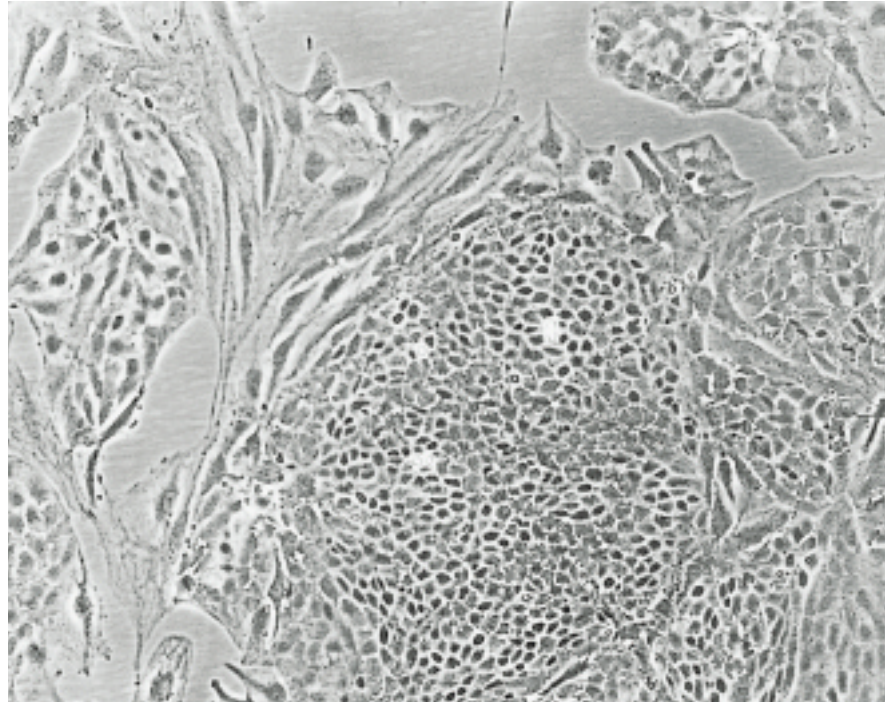
Qu'est-ce qu'une cellule cancéreuse ?

Dans les tumeurs, les cellules ont un aspect différent de celui des cellules normales. Elles présentent une perte plus ou moins complète de leurs caractéristiques fonctionnelles (sécrétion, absorption...). De plus, les cellules cancéreuses sont capables d'accomplir un nombre pratiquement *infini* de divisions, alors que les cellules normales entrent en **sénescence** après un nombre limité de divisions cellulaires, ce nombre étant d'autant plus élevé qu'elles sont prélevées sur un sujet jeune). En outre, le temps de doublement de population cellulaire est plus court que pour les cellules normales (encadré D, **La cellule, le maillon essentiel** et encadré E, **Le cycle cellulaire, duplication sous contrôle**). Enfin, elles peuvent quitter le tissu d'origine et migrer à distance pour donner naissance à une autre tumeur appelée métastase.

Culture cellulaire

Les cellules, placées dans des flacons de culture, adhèrent au fond. Le milieu de culture est changé régulièrement pour éviter toute carence nutritive et/ou effet toxique par accumulation de déchets éliminés par les cellules. Les cellules vont se diviser et, leur nombre augmentant, vont progressivement recouvrir tout le fond du flacon de culture : elles sont dites **confluentes**. À ce moment, elles doivent être subdivisées, c'est-à-dire décollées puis réensemencées à une concentration plus faible : cette opération se nomme un **passage**. Lorsque des cellules sont établies en culture, il s'agit d'une **lignée** cellulaire.

En culture, outre les caractéristiques précédemment décrites, les cellules cancéreuses se différencient des cellules nor-



CEA/DRR

males par une grande autonomie par rapport aux conditions extérieures. Elles supportent une plus grande densité cellulaire et sont moins sensibles à la composition du milieu de culture. Elles sont également indépendantes du support et n'ont pas besoin de s'ancrer sur le fond du flacon de culture pour proliférer. Les tests qui permettent d'évaluer la transformation cellulaire sont basés sur ces critères. Enfin, lorsque les cellules peuvent induire une tumeur quand elles sont injectées à un animal, cette capacité signe le fait que la transformation est complète : les cellules sont alors dites **tumorigènes**.

Les cellules cancéreuses ont presque toujours un **caryotype** anormal. Dans quelques rares cas de cancers, des remaniements spécifiques, notamment un réarrangement d'un **chromosome** avec un autre, sont observés. Plus généralement, les anomalies du caryotype se traduisent à la fois par une modification du nombre total de chromosomes et par des déséquilibres, c'est-à-dire une diminution ou une augmentation du nombre relatif de segments ou de chromosomes entiers (voir *L'instabilité chromosomique*). Il est important ici de noter que chaque type de tumeur présente un profil de remaniements chromosomiques caractéristique, même si dans les cellules tumorales d'un patient toutes les modifications ne sont pas observées et bien qu'il existe, au demeurant, des ana-

Cellules en cours de transformation : un foyer se trouve au centre de l'image.



logies plus ou moins grandes entre des tumeurs provenant de tissus différents.

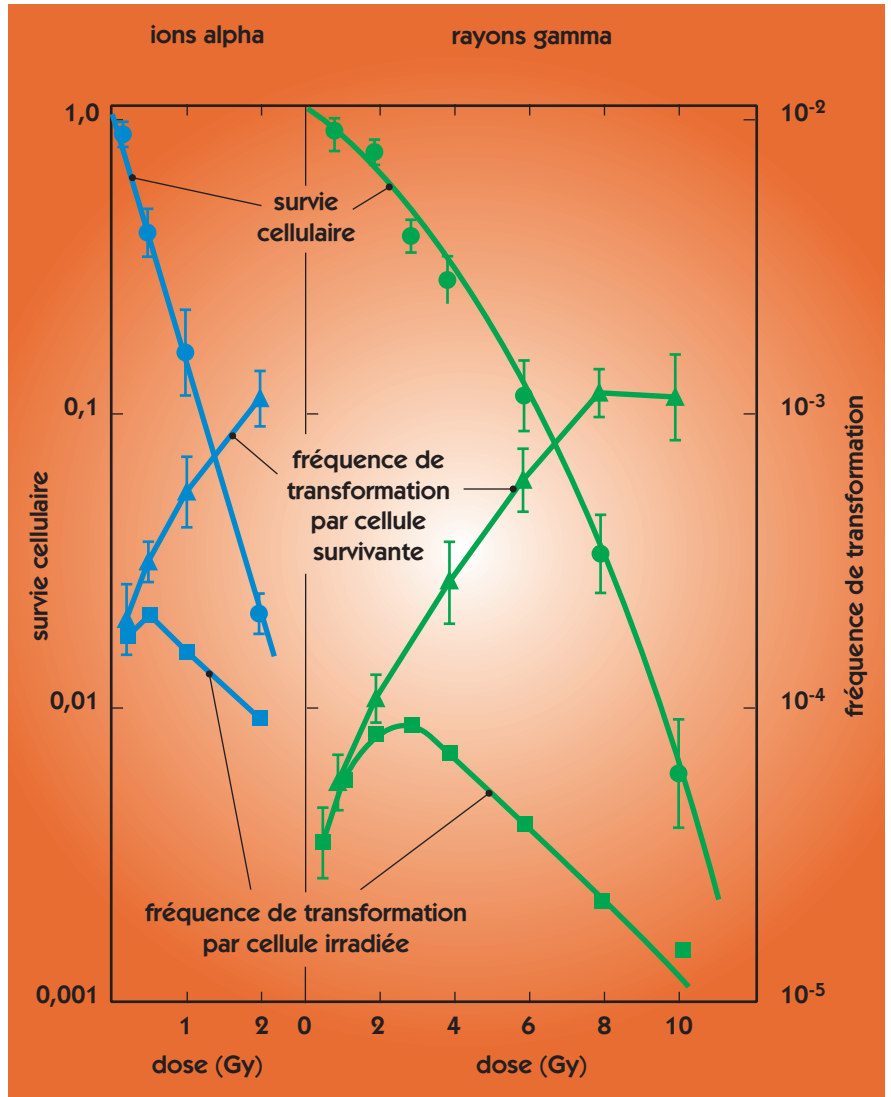
À l'échelle du **gène**, les cellules cancéreuses présentent des modifications diverses, comme la surexpression d'**oncogènes**, c'est-à-dire de gènes qui favorisent la transformation cellulaire, ainsi que des pertes ou des **mutations** d'**anti-oncogènes**, c'est-à-dire de gènes qui s'y opposent. Ces changements du **génome** s'accompagnent de modifications non génétiques, en particulier des modifications **métaboliques**, qui contribuent sans doute, bien que les mécanismes restent à préciser, à la transformation cancéreuse.

L'effet sur la transformation de cellules déjà immortalisées

De très nombreuses études ont été effectuées sur des cellules de souris ou de hamster déjà immortalisées et établies en lignées. Ces cellules sont irradiées, puis ensemencées en faible densité. Après un délai, qui a été fixé à six

Figure 1. Influence de la dose et du type de rayonnement sur la fréquence de transformation de cellules immortalisées (d'après Hall E.J. et Hei T.K. 1987).

semaines afin de standardiser les protocoles, les foyers de cellules présentant certaines caractéristiques morphologiques sont dénombrés. Une plus grande densité des cellules traduit en effet un avantage prolifératif. La probabilité ou la fréquence de transformation est calculée en divisant le nombre de foyers soit par le nombre de cellules irradiées, soit par le nombre de cellules survivantes. La fréquence de transformation par cellule irradiée augmente en fonction de la dose jusqu'à un maximum, puis diminue car, aux doses les plus fortes (supérieures à 2 Gy pour les rayons gamma), un pourcentage important de cellules ne survit pas. En revanche, la fréquence de transformation par cellule survivante augmente régulièrement avec la dose (figure 1). Ces expériences ont permis d'évaluer l'influence de divers paramètres sur la transformation cellulaire radio-induite. Les rayonnements à fort **transfert linéique d'énergie** (TLE), comme les neutrons ou les particules alpha, sont plus efficaces que les **rayonnements X** ou **gamma** (figure 1). L'influence du débit de dose est différente selon le type de rayonnement. Une diminution entraîne une baisse de la probabilité de transformation pour les rayons X et gamma, alors que c'est l'inverse pour les rayonnements à fort TLE, du moins dans certaines limites.

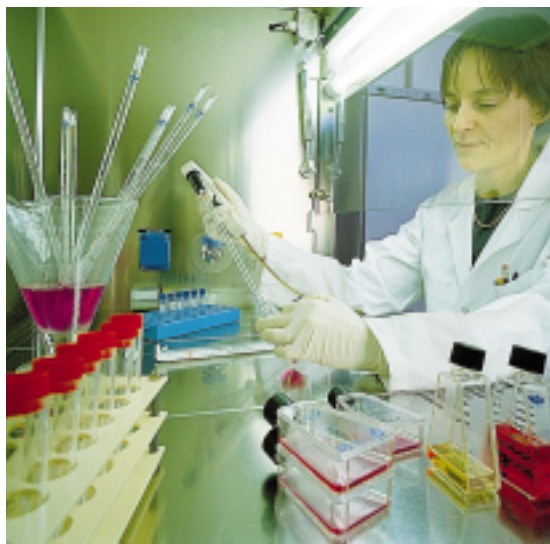


L'intervalle de temps entre l'irradiation et le test de transformation est très important. Il permet aux cellules de réparer une partie des lésions radio-induites avant de se diviser à nouveau et conduit donc à une diminution de la probabilité de trans-

formation. La transformation cellulaire nécessite que les cellules se divisent, ce qui ne se produit normalement que dans certains tissus ou bien lorsque les doses d'irradiation sont assez élevées pour provoquer une mort cellulaire importante, de l'ordre de quelques grays (Gy) pour le rayonnement X ou gamma. L'exposition à différents agents, chimiques par exemple, peut avoir un effet synergique avec l'irradiation dans certains cas, antagoniste dans d'autres.

Ces expériences ont donc permis d'évaluer le risque de transformation cellulaire après irradiation dans différentes conditions d'exposition. Toutefois, le court délai de quelques semaines entre l'irradiation et la transformation *in vitro* est en contradiction avec le long temps de latence, de quelques années au minimum, observé *in vivo*. Cela suggère un mécanisme en une seule phase comme si ces cellules, qui ont d'ailleurs un caryotype déjà modifié et

Changement de milieu dans des flacons de cellules en culture sous une hotte à flux laminaire au CEA/Fontenay-aux-Roses.



instable, avaient déjà franchi plusieurs étapes. La question est donc de savoir sur quel stade agissent les rayonnements ionisants et ce qui a été quantifié.

La transformation de cellules normales

Comme les cellules humaines ne s'immortalisent pas spontanément en culture, il est nécessaire de s'orienter vers des solutions de compromis, soit en les immortalisant par des manipula-

tions génétiques, soit en étudiant la transformation de cellules issues d'animaux qui ne présentent pas ce problème. Pour les modèles développés au Laboratoire de radiobiologie cellulaire du Commissariat à l'énergie atomique (CEA), le choix s'est porté sur des cellules de rat Sprague-Dawley car un très grand nombre d'expériences de cancérogenèse *in vivo* ont déjà été effectuées sur cette souche de rat, et notamment dans les laboratoires du CEA. Les études visent donc à corréler les données obtenues *in*

vitro aux observations faites sur les tumeurs humaines et chez les animaux.

Pour étudier la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses, des rats ont été irradiés pendant la dernière semaine de gestation par une source de cobalt 60 (rayonnement gamma) avec un débit de dose de 0,022 Gy par heure, soit une dose de 0,5 Gy par jour et une dose totale de 3,5 Gy. À la fin de l'irradiation, les cellules ont été mises en culture à partir de fragments de cerveau et de poumons prélevés sur les fœtus. Les cellules ont été maintenues en culture pendant plus de cent passages (encadré). Divers paramètres comme le temps de doublement de la population cellulaire, la **clonogénicité** et la **tumorigénicité** ainsi que le caryotype ont été analysés après un nombre de plus en plus grand de passages des cellules en culture (figure 2).

Au cours des premiers passages, les cellules issues de poumons ne sont ni clonogènes, ni tumorigènes et les caryotypes sont normaux. Il n'y a donc pas de remaniements chromosomiques induits par une exposition aux rayonnements gamma dans ces conditions de dose et de débit de dose. Par contre, aux environs d'une trentaine de passages en culture, des cellules présentent diverses anomalies chromosomiques. Une de ces anomalies a un avantage prolifératif puisque après quelques passages la totalité de la population est issue des cellules

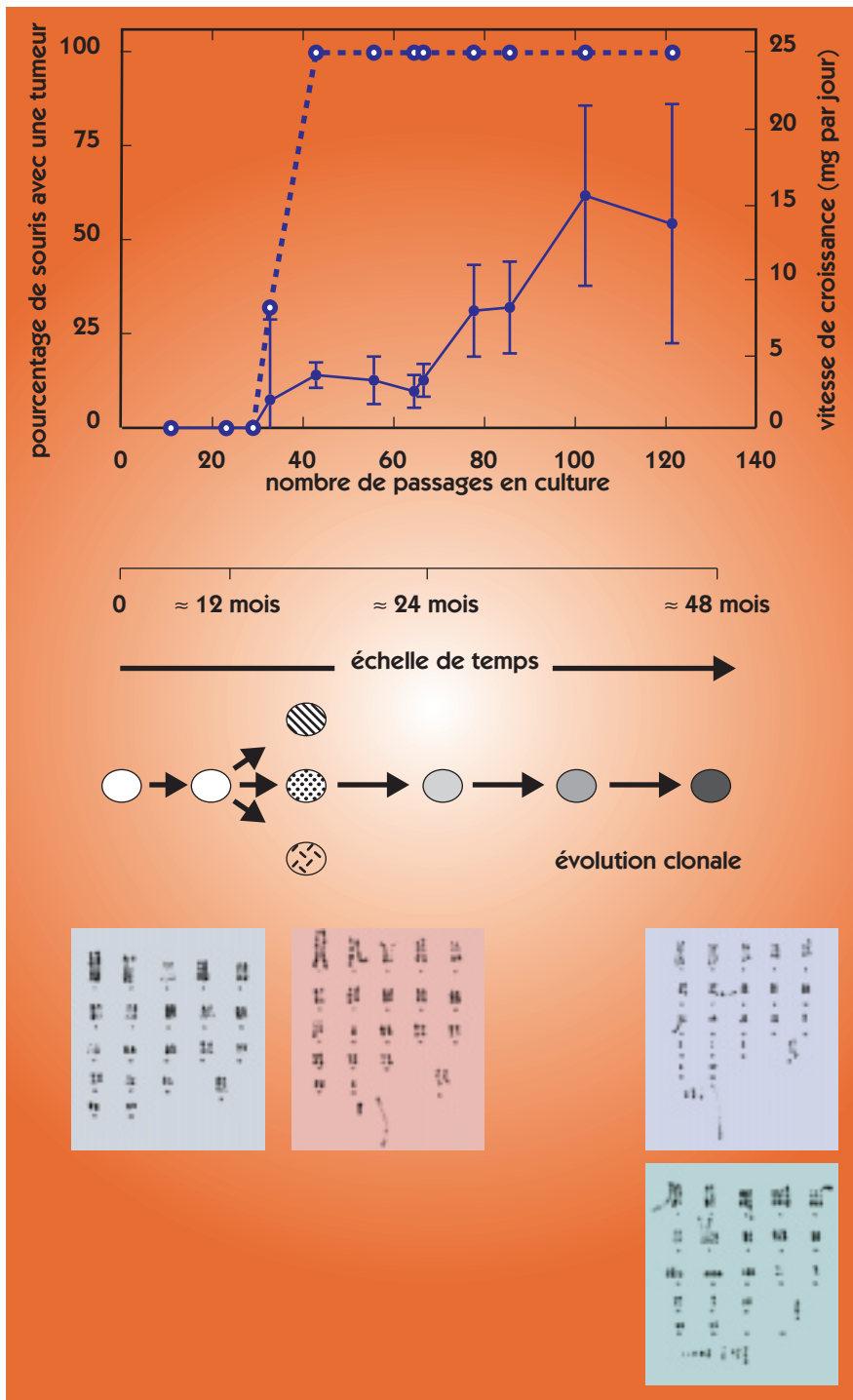
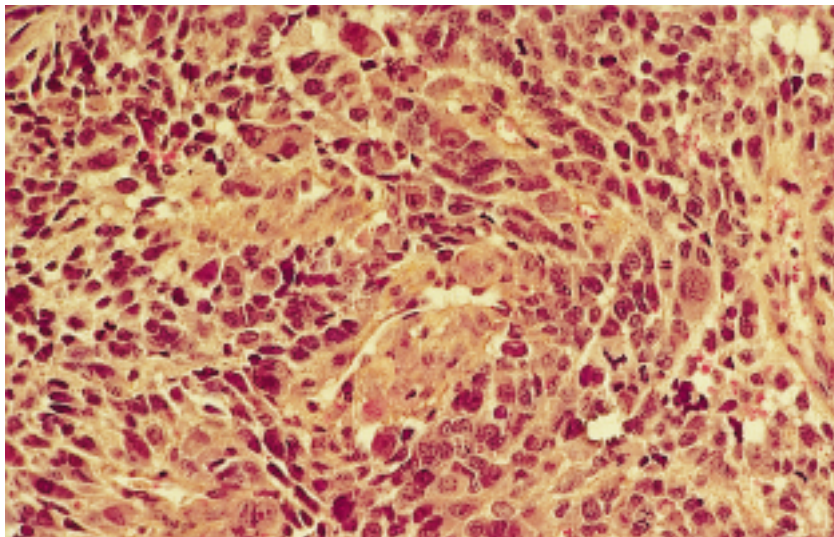


Figure 2. Évolution de la tumorigénicité et des remaniements chromosomiques mise en parallèle avec l'évolution clonale dans les cellules issues de poumons de rats irradiés. Les courbes indiquent le pourcentage de souris nude chez lesquelles les cellules injectées ont donné des tumeurs (trait discontinu) et la vitesse de croissance de ces tumeurs, en milligramme par jour (trait continu). Au-dessous, de gauche à droite, caryotypes de cellules pulmonaires à des passages précoce (16, caryotype normal), intermédiaire (49, remaniements visibles) et tardif (113, nombreux remaniements). En bas, caryotype d'une cellule de cerveau au passage 110.

Coupe histologique de tumeur obtenue sur souris nude après injection de cellules transformées. Les souris nude, dépourvues de défenses immunitaires, ne rejettent pas les greffes de cellules provenant d'une autre espèce : elles sont utilisées pour tester la tumorigénicité de cellules, mais aussi pour augmenter la quantité de matériel tumoral humain, les fragments prélevés lors d'une exérèse thérapeutique ou d'une biopsie et qui sont disponibles pour les études fondamentales étant souvent de petite taille.



CEA/DRR

qui la possèdent. L'apparition des modifications chromosomiques correspond au moment où les cellules deviennent clonogènes et tumorigènes. Les remaniements chromosomiques observés sont ainsi bien en relation avec le processus de transformation radio-induite et non directement avec l'irradiation. Aux remaniements chromosomiques, en particulier l'**amplification génique**, qui caractérisent le clone initial prédominant, s'ajoutent d'autres anomalies qui apparaissent. Au total, après un grand nombre de passages, le caryotype est considérablement remanié. Par ailleurs, le temps de doublement de la population cellulaire diminue au moment de la sélection du clone prédominant, puis reste stable.

Une étude a été menée en parallèle sur des cellules issues de cerveau prélevées sur des rats irradiés dans les mêmes conditions. Le processus est pratiquement identique, les cellules restent apparemment normales au cours des premiers passages en culture, puis les remaniements chromosomiques, la clonogénicité et la tumorigénicité évoluent de façon synchrone comme pour les cellules issues de poumons. Par contre, il n'y a pas d'amplification génique et le nombre de chromosomes évolue selon un mode déjà décrit dans les tumeurs humaines, à savoir qu'il y a duplication du nombre de chromosomes suivie de la perte progressive de certains d'entre eux. Ce processus se produit de façon répétitive.

Les deux modèles ont des caractéristiques communes. En effet, la clonogénicité, la tumorigénicité et le caryotype de ces cellules sont normaux au cours des

passages précoces. Ensuite, pendant une période intermédiaire évoquant une instabilité génétique, des cellules avec des caryotypes anormaux, mais différents, sont observées. Une d'entre elles possède un avantage prolifératif puisqu'en quelques passages toutes les cellules en sont issues. Par ailleurs, la tumorigénicité évolue par palier et le nombre d'anomalies chromosomiques augmente au cours de la transformation. L'étude de ces cellules à différents stades de cette dernière permettra d'identifier les gènes impliqués dans la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses. Enfin, l'examen de transformations spontanées ou induites par divers agents cancérogènes permettra de rechercher d'éventuelles spécificités ou au contraire des analogies entre les différents processus.

D'autres recherches s'orientent actuellement vers l'étude de la transformation de cellules humaines immortalisées par des manipulations génétiques, mais une question se pose : le processus d'immortalisation en lui-même est-il identique à celui qui s'inscrit dans le cadre de la transformation cellulaire ?

Nécessité des études *in vivo*

La compréhension de processus aussi complexes que ceux impliqués dans la cancérogenèse nécessite des approches complémentaires. En effet, les études effectuées sur des cellules en culture ne prennent pas en compte les influences physiologiques normales comme les taux hormonaux et l'organisation des cellules

en tissu avec une architecture propre et la présence de cellules de différentes origines. Elles omettent également de prendre en compte la réaction de l'organisme et, en particulier, le rôle des défenses immunitaires. De plus, régulièrement subdivisées, les cellules sont obligées de se multiplier en permanence, ce qui ne se produit normalement que dans les **cellules souches** de certains tissus. Les expériences de cancérogenèse *in vivo* sur des animaux sont donc indispensables. Elles le sont d'autant plus qu'il est maintenant possible d'identifier les modifications génétiques des cellules tumorales, et donc de préciser les gènes en cause. Par ailleurs, les résultats obtenus à partir des modèles expérimentaux actuels ne peuvent être interprétés qu'à la lumière de ceux provenant de l'analyse des cancers humains eux-mêmes, bien que celle-ci soit rendue difficile par les variations individuelles et que la tumeur, prélevée au moment de l'**exérèse** thérapeutique, ne représente qu'une sorte de photographie à un instant donné après un temps plus ou moins long d'évolution. ●

Catherine Luccioni(*)

Département de radiobiologie
et radiopathologie

Direction des sciences du vivant
CEA/Fontenay-aux-Roses

(*) Les études de transformation de cellules de rat ont été effectuées avec la collaboration de Monique Reillaudou, Jacqueline Beaumatin, Hervé Coffigny, Hervé Peyre, Isabelle Giuliani et Michèle Morin.