

De nouveaux régulateurs du cycle cellulaire : les protéines modulatrices des complexes cdk-cyclines

Récemment, une explosion de travaux a révélé l'existence de petites protéines capables de s'associer aux complexes cdk-cyclines mis en jeu dans les phases G1 et S du cycle cellulaire et de moduler leur activité. Elles agissent principalement en tant qu'inhibiteurs et pourraient retarder l'activation des cdk-cyclines, assurant ainsi leur mise en œuvre ordonnée durant la progression des cellules en G1 : p21, dont la synthèse est stimulée par p53, induit un arrêt des cellules en G1 dans les cellules sénescents ou quiescentes, ainsi qu'en cas d'altération de l'ADN ; ces effets semblent principalement dus à l'action inhibitrice de p21 sur le complexe cdk2-cycline E, mais p21 pourrait aussi être un régulateur universel des cdk-cyclines ; p27 provoque l'arrêt en G1 des cellules en inhibition de contact ou traitées par le TGF β ou l'AMPc (inhibition de cdk2-cycline E ou cdk4-cycline D) ; p15, dont la synthèse est induite par le TGF β , et p16 s'associent à cdk4 et cdk6 et pourraient être de nouveaux suppresseurs de tumeur ; p24 appartient à la famille des phosphatases à double spécificité et s'associe à cdc2, cdk2 et cdk3.

Jean-Marie Darbon
Didier Fesquet
Jean-Claude Cavadore

ADRESSES

J.M. Darbon : directeur de recherche à l'Inserm. Inserm U. 326, CHU Purpan, 31059 Toulouse Cedex, France. D. Fesquet : chargé de recherche au Cnrs. J.C. Cavadore : directeur de recherche à l'Inserm. Cnrs UPR 9008 et Inserm U. 249, BP 5051, route de Mende, 34033 Montpellier Cedex, France.

m/s n° 3, vol. 11, mars 95

S'il fallait marquer d'une pierre blanche les années déterminantes dans notre compréhension de la régulation du cycle cellulaire, sans doute l'année 1993 devrait-elle être retenue au même titre que 1988. La plus ancienne de ces dates signe l'identification du premier complexe kinase cdk-cycline. La plus récente a vu la découverte d'une série de petites protéines régulatrices capables de s'associer aux différentes cdk-cyclines aujourd'hui connues.

MPF : émergence du concept cdk-cycline

C'est en 1988 que le facteur universel MPF (pour *M-phase promoting factor*), contrôlant l'entrée en mitose des cellules eucaryotes, a été identifié du point de vue moléculaire comme étant un complexe kinase hétérodimérique constitué d'une sous-unité catalytique, p34^{cdc2}, et d'une sous-unité régulatrice, la cycline B. Plusieurs équipes furent à l'origine de cette découverte et notamment celle de

RÉFÉRENCES

1. Lohka M, Hayes MK, Maller JL. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3009-15.
2. Gautier J, Minshull J, Lohka M, Glotzer M, Hunt T, Maller JL. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* 1990; 60: 487-94.
3. Labbé JC, Capony JP, Caput D, Cavadore JC, Derancourt J, Kaghad M, Lelias JM, Picard A, Dorée M. MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *EMBO J* 1989; 8: 3053-8.
4. Dorée M. Le complexe cdc2-cycline – un facteur universel pour l'entrée en mitose. *médecine/sciences* 1990; 6: 8-9.
5. Le Peuch C. La régulation de la division cellulaire. *médecine/sciences* 1990; 6: 10-7.
6. Cavadore J, Le Bouffant F, Labbé J. Les substrats de p34cdc2, la kinase spécifique de la phase M du cycle cellulaire. La liste continue de s'allonger. *médecine/sciences* 1990; 6: 895-900.
7. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993; 73: 1059-65.
8. Pines J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: take your partners. *Trends Biochem Sci* 1993; 18: 195-7.
9. Pines J. Arresting developments in cell cycle control. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 143-5.
10. Fesquet D, Labbé JC, Derancourt J, Capony JP, Galas S, Girard F, Lorca T, Shuttleworth J, Dorée M, Cavadore JC. The *MO15* gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *EMBO J* 1993; 12: 3111-21.
11. Solomon MJ, Harper JW, Shuttleworth J. CAK, the p34^{cdc2} activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40^{MO15}. *EMBO J* 1993; 12: 3133-42.
12. Darbon JM, Devault A, Taviaux S, Fesquet D, Martinez AM, Galas S, Cavadore JC, Dorée M, Blanchard JM. Cloning, expression and subcellular localization of the human homolog of p40^{MO15} catalytic subunit of cdk-activating kinase. *Oncogene* 1994; (sous presse).
13. Fisher RP, Morgan DO. A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 1994; 78: 713-24.
14. Gu Y, Rosenblatt J, Morgan DO. Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of the Thr160 and Tyr15. *EMBO J* 1992; 11: 3995-4005.

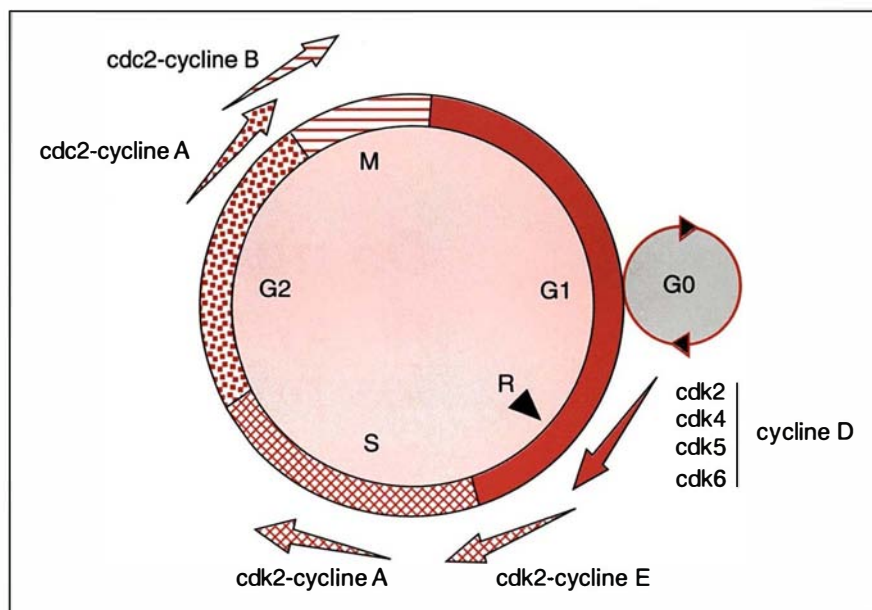


Figure 1. **Contrôle du cycle cellulaire par les complexes cdk-cyclines.** L'épaisseur des flèches symbolise l'expression quantitative des cyclines et la formation ordonnée dans le temps des différents complexes cdk-cyclines. R représente le point de restriction R à partir duquel la progression des cellules en G1 est indépendante des facteurs de croissance.

James Maller à Denver (CO, USA) [1, 2] et celle de Marcel Dorée à Montpellier [3].

Depuis cette date, il est apparu que l'ensemble des transitions du cycle cellulaire étaient vraisemblablement contrôlées par de tels complexes entre différents membres d'une famille de sérine/thréonine kinases apparentées à cdc2, les cdk (pour *cyclin-dependent kinases*) et leurs partenaires cyclines respectifs [4-9] (figure 1). A ce jour, pas moins de sept cdk (cdk1 à cdk7), incluant cdc2 (cdk1), et huit différents types de cyclines (A, B, C, D, E, F, G et H) ont été mis en évidence et clonés chez les mammifères. Le rôle et le niveau d'intervention dans le cycle ne sont pas élucidés pour l'ensemble des différents complexes cdk-cyclines mais il semble que leur formation et leur activation à des moments précis et ordonnés permettent la progression le long du cycle et, notamment, le passage des différents points de contrôle. Alors que cdc2, en association avec la cycline A et la cycline B, assure la transition G2/M, les autres complexes mis en évidence interviennent au cours

de la progression en G1 au niveau du point de restriction R, équivalent du point *Start* de la levure (cdk4-cycline D et cdk6-cycline D), dans la transition G1/S (cdk2-cycline E) et dans le déroulement de la phase S (cdk2-cycline A). Il semble que cdk4 soit particulièrement mobilisée, sous l'effet des facteurs de croissance, lorsque les cellules quittent l'état de quiescence pour entrer dans le cycle (transition G0/G1). Cdk5 (en association avec la cycline D ?) pourrait être mise en jeu au cours du processus de différenciation cellulaire. Ni le partenaire cycline de cdk3, ni le partenaire cdk des cyclines C, F et G ne sont connus. Il est cependant probable que cdk3 exerce son activité en fin de G1 et que la cycline C intervienne en début de G1.

Régulation des cdk-cyclines par phosphorylation-déphosphorylation

L'activité des cdk dépend, non seulement de leur association avec les cyclines, mais également de modifica-

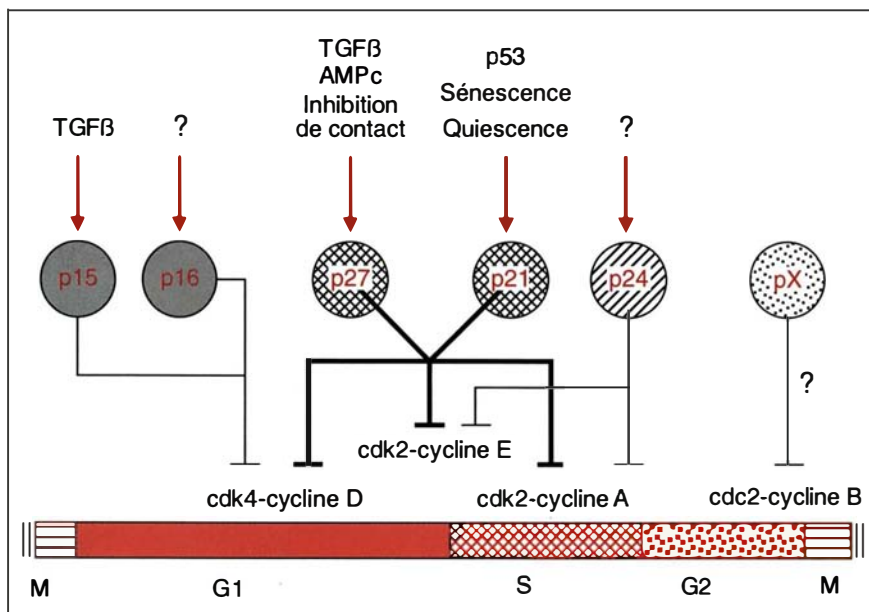


Figure 2. **Sites potentiels d'action des inhibiteurs des cdk-cyclines.** Par souci de clarté, les kinases cdk5 et cdk6 ne sont pas représentées. L'action de p21, p27 et p24 au niveau de cdc2-cycline B reste hypothétique et n'est pas figurée. pX symbolise un éventuel inhibiteur spécifique des complexes cdk-cyclines mis en jeu en G2/M.

tions post-traductionnelles par réaction de phosphorylation-déphosphorylation. Les sites de phosphorylation ont été déterminés pour cdc2, cdk2 et, plus récemment, pour cdk4.

La phosphorylation du résidu Thr161 de cdc2 ou de son homologue dans les autres cdk (cdk2, cdk4 et vraisemblablement cdk3) est essentielle pour une activité maximale du complexe kinase cdk-cycline. Cette phosphorylation « activatrice » est réalisée par une kinase, appelée CAK (pour *cdk activating kinase*), purifiée à partir d'ovocytes d'étoile de mer [10] et de xénope [11]. Cette kinase, à l'instar des complexes cdk-cyclines, comprend une sous-unité catalytique appelée MO15* ou Cdk7, dont l'homologue humain a vu son ADN être récemment cloné [12], et une sous-unité régulatrice dont on a pensé dans un premier temps qu'elle n'était pas apparentée aux cyclines [10] mais qui s'avère, en fait, présen-

ter une faible analogie avec cette famille de protéines [13]. Elle a, de ce fait, reçu le nom de cycline H. La déphosphorylation du résidu Thr161 de cdc2 semble nécessaire pour que s'effectue, en fin de mitose, la transition métaphase/anaphase, comme l'est aussi la dégradation de la cycline B.

Deux sites de phosphorylation « inhibitrice » ont été mis en évidence sur cdc2 ainsi que sur cdk2, sur les résidus Thr14 et Tyr15. La phosphorylation de Tyr15 par la kinase weel, et de Thr14 par une kinase différente et non identifiée, inhibe l'activité kinase du complexe cdc2-cycline B, empêchant ainsi une entrée en mitose prématurée. La déphosphorylation de Thr14 et de Tyr15 par la Thr/Tyr phosphatase cdc25 permet la transition G2/M. En ce qui concerne cdk2, bien qu'*in vitro* ce type de régulation ait pu être mis en évidence, sa validité physiologique n'est pas démontrée. En effet, *in vivo*, cdk2 est phosphorylée sur la Tyr15 en phase S, à un moment où l'activité kinase du complexe cdk2-cycline est maximale [14]. Il semble donc que la régula-

tion négative exercée par la phosphorylation sur les Thr14/Tyr15 ne soit pas aussi universelle que l'est la régulation positive exercée par la phosphorylation sur la Thr161 (ou son homologue).

Quelle stratégie alternative la cellule pouvait-elle mettre en jeu pour freiner l'activité kinase des complexes cdk-cyclines autres que cdc2-cycline B?

Protéines inhibitrices des cdk-cyclines : de la levure à l'homme

Durant l'année 1993, une réponse magistrale à cette question a été apportée par la mise en évidence, dans les cellules de mammifères, d'une série de petites protéines capables de lier les complexes cdk-cyclines et d'inhiber leur activité kinase (Tableau I). On imagine l'importance de cette découverte : outre le fait que ces protéines inhibitrices puissent participer à la régulation du cycle cellulaire en retardant l'activation des divers complexes cdk-cyclines spécifiques de G1/S jusqu'au temps adéquat et en assurant ainsi leur mise en œuvre ordonnée (figure 2), la perte ou le dysfonctionnement de ces inhibiteurs pourrait entraîner une prolifération cellulaire incontrôlée telle qu'on l'observe dans les cellules cancéreuses.

FAR1 : le prototype découvert chez *S. cerevisiae*

En fait, le premier inhibiteur d'un complexe cdk-cycline fut mis en évidence chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* [15]. Sous l'effet de la phéromone appelée facteur α , une protéine de 85 kDa dénommée FAR1 (pour *factor arrest*) se lie aux complexes cdc28-CLN (cdc28 est l'homologue de cdc2 chez *S. cerevisiae*, les CLN sont les cyclines G1 présentes chez cette levure). Cette liaison entraîne l'inhibition de l'activité kinase de cdc28-CLN et l'arrêt des cellules au point *Start*. Fait remarquable, le facteur α active un récepteur membranaire couplé à une protéine G et mobilise une voie de signalisation analogue à celle de la MAP kinase. La liaison de FAR1 aux complexes cdc28-CLN est, en fait, consécutive à sa phosphorylation par la kinase

* La protéine MO15/Cdk7 semble être une sous-unité du facteur de transcription TFIIF (Feaver WJ, et al. Cell 1994; 79: 1103-9; Roy D, et al. Cell 1994; 79: 1093-101).

RÉFÉRENCES

15. Peter M, Gartner A, Horecka J, Ammerer G, Herskowitz I. FAR1 links the signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast. *Cell* 1993; 73: 747-60.
 16. Mendenhall MD. An inhibitor of p34^{cdc28} protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 1993; 259: 216-9.
 17. Donovan JD, Toyn JH, Johnson AL, Johnston LH. p40^{DB25}, a putative CDK inhibitor, has a role in the M/G1 transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 1994; 8: 1640-53.
 18. Moreno S, Nurse P. Regulation of progression through the G1 phase of the cell cycle by the *rum1*⁺ gene. *Nature* 1994; 367: 236-42.
 19. Koff A, Ohtsuki M, Polyak K, Roberts JM, Massagué J. Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF β . *Science* 1993; 260: 536-9.
 20. Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massagué J, Roberts JM, Koff A. p27^{Kip1}, a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994; 8: 9-22.
 21. Hengst L, Dulic V, Slingerland JM, Lees E, Reed SI. A cell-cycle-regulator of cyclin-dependent kinases. *Proc Acad Sci USA* 1994; 91: 5291-5.
 22. Kato JY, Matsuoka M, Polyak K, Massagué J, Sherr CJ. Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27^{Kip1}) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 1994; 79: 487-96.
 23. Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massagué J. Cloning of p27^{Kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994; 78: 59-66.
 24. Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994; 78: 67-74.
 25. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-16.
 26. Xiong Y, Zhang H, Beach D. Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Dev* 1993; 7: 1572-83.
 27. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366: 701-4.
- FUS3 (homologue de MAPK). Une deuxième protéine, p40^{SIC1}, a été identifiée chez *S. cerevisiae* comme pouvant lier et inhiber cdc28 [16]. Cette action inhibitrice pourrait s'exercer lors de la transition M/G1 [17]. Enfin chez *Schizosaccharomyces pombe*, un gène, *rum1*⁺, responsable de l'arrêt des cellules en G1/S, code pour une protéine p25 inhibitrice de la fonction *Start* de cdc2 [18].
- Dans la mouvance de ces découvertes, on a pu assister à une véritable explosion de travaux démontrant la présence de tels inhibiteurs de cdk-cyclines chez les mammifères.
- p27^{Kip1} : médiateur de l'action anti-proliférative du TGF β et de l'AMPc**
- Le premier d'entre eux a été mis en évidence dans les cellules épithéliales de poumon de vison (Mv1Lu) par Andrew Koff (Seattle, WA, USA) et Joan Massagué (New York) lors d'études concernant l'inhibition de la prolifération cellulaire par le *transforming growth factor* β (TGF β). Le TGF β induit un arrêt des cellules Mv1Lu en fin de G1 et empêche la phosphorylation de la protéine p105^{tb} qui précède l'entrée en phase S dans les cellules cyclantes. En avril 1993, Koff et Massagué démontraient que ces effets étaient vraisemblablement la conséquence de l'incapacité des cellules traitées par le TGF β de former des complexes cdk2-cycline E actifs [19]. Des résultats similaires sont observés dans les cellules Mv1Lu en inhibition de contact [20]. Dans les deux cas, c'est une protéine dénommée p27^{Kip1} (pour *cdk inhibiting protein*) qui, en se liant à cdk2-cycline E, empêche l'activation du complexe due à la phosphorylation de cdk2 sur la Thr160 (homologue de la Thr161 de cdc2). p27^{Kip1} est présente sous forme séquestrée et inactive dans les cellules prolifératives. Le TGF β induirait la libération et/ou l'activation de l'inhibiteur. Les complexes cdk4-cycline D, qui interviennent, semble-t-il, en amont de cdk2-cycline E dans le cycle, lient également p27^{Kip1} et pourraient ainsi contribuer au titrage de l'inhibiteur. Une protéine p28^{ta} (pour *inhibitor of cyclin-dependent kinase*) a été mise en évidence dans les cellules HeLa bloquées en G1 par traitement à la lovastatine [21]. Son éventuelle identité avec p27^{Kip1} n'est pas démontrée.
- Enfin, les travaux de Charles J. Sherr (Memphis, TN, USA) et Joan Massagué ont récemment démontré que l'arrêt en milieu de G1 induit par l'AMPc dans les macrophages mettait également en jeu p27^{Kip1}: l'élévation du taux de l'inhibiteur dans les cellules traitées empêche l'activation des complexes cdk4-cycline D1 par la CAK [22].
- Le clonage de l'ADNc de p27^{Kip1} [23, 24] a permis de mettre en évidence une certaine analogie (limitée à une région N-terminale de 60 aminoacides) de cette protéine avec un second inhibiteur, p21^{CIP1/WAF1/Sdi1}, qui avait été, entre temps, identifié et cloné.
- p21^{CIP1/WAF1/Sdi1} : un régulateur aux multiples facettes?**
- Pas moins de cinq équipes, travaillant parfois dans des domaines relativement éloignés, sont à l'origine de sa découverte, justifiant les divers noms attribués à cette protéine (*m/s* n° 2, vol. 10, p. 206 et n° 6-7, vol. 10, p. 744).
- En utilisant la stratégie des doubles hybrides (voir *m/s* n° 6-7, vol. 10, p. 761), Wade Harper et Stephen Elledge à Houston (TX, USA) identifièrent un gène *CIP1* (pour *cdk inhibiting protein*) codant pour une protéine s'associant à cdk2 (*m/s* n° 2, vol. 10, p. 206, [25]). Cette protéine de 18 kDa (mais migrant à 21 kDa en SDS-PAGE) se révélait identique à la protéine p21 préalablement mise en évidence dans les fibroblastes humains WI38 par le groupe de David Beach du Cold Spring Harbor Laboratory (NY, USA) [26] et dont l'ADNc a été cloné depuis lors [27]. p21^{CIP1} est capable de s'associer aux divers complexes cdk-cyclines formés entre cdc2, cdk2 et cdk4 et les cyclines B, A, E et D dans les fibroblastes normaux mais pas dans les cellules transformées par l'antigène T du virus SV40. Contrairement à p27^{Kip1}, qui semble empêcher l'activation des complexes cdk2-cycline E ou cdk4-cycline D, p21^{CIP1} supprime l'activité kinase des complexes cdk-cyclines. La surexpression de p21^{CIP1} dans les fibroblastes entraîne l'arrêt de leur prolifération, un effet contraire par l'antigène T de SV40.

Tableau I			
PROTÉINES MODULATRICES DES COMPLEXES CDK-CYCLINES CHEZ LES MAMMIFÈRES			
Nom(s)	Cible(s)	Effet(s)	Fonction(s)
p15 ^{INK4B}	cdk4, cdk6	inhibition de cdk4-cycline D cdk6-cycline D	médiateur du TGFβ gène suppresseur de tumeur
p16 ^{INK4}	cdk4, cdk6	inhibition de cdk4-cycline D cdk6-cycline D	gène suppresseur de tumeur
p21 ^{CIP1/WAF1/Sdi1}	cdk2-cycline E et autres cdk-cyclines PCNA	inhibition* cdk-cyclines arrêt G1 inhibition réplication	effecteur de p53
p24 ^{CIP2/Cdi1/KAP}	cdk1, cdk2, cdk3	phosphatase délai G1	?
p27 ^{Kip1}	cdk2-cycline E et autres cdk-cyclines	inhibition cdk-cyclines arrêt G1	médiateur du TGFβ médiateur de l'AMPc

* p21 pourrait exercer, à faible stœchiométrie, un effet activateur plutôt qu'inhibiteur sur les complexes cdk-cyclines

Fait remarquable, l'ADNc codant pour p21^{CIP1} était parallèlement identifié par deux approches différentes. En utilisant un criblage différentiel sophistiqué, l'équipe de Bert Vogelstein à Baltimore (MD, USA) a identifié un gène, *WAF1* (pour *wild-type p53-activated fragment*), dont la transcription est induite dans une lignée tumorale humaine par la forme sauvage de p53 et non par une forme mutée [28]. L'introduction de l'ADNc *WAF1* dans des cellules cancéreuses de cerveau, de poumon et de côlon supprime la prolifération cellulaire. Le promoteur du gène *WAF1* inclut un site de liaison de p53 qui confère l'inductibilité d'un gène rapporteur. *WAF1* s'avérant identique à *CIP1* (les deux clonages furent publiés dans le même numéro de *Cell* en novembre 1993, *m/s* n° 2, vol. 10, p. 206), un lien spectaculaire entre gène suppresseur de tumeur et cycle cellulaire était donc mis à jour et un modèle pouvait être proposé quant à la fonction de p53 [28] : p53 n'est pas requis dans une situation cellulaire normale, mais, dans certaines conditions (ADN endommagé, stress cellulaire), l'expression de p53 est stimulée. En se liant au promoteur du gène *WAF1*, p53 induit l'expression de *WAF1*. La protéine p21^{CIP1/WAF1} se lie et inhibe les com-

plexes cdk-cyclines assurant la fonction G1/S, bloquant ainsi la progression du cycle cellulaire. Dans les cellules transformées possédant une protéine p53 mutée, ce processus est impossible conduisant à une dérégulation de la prolifération cellulaire. Dans la même période, le groupe de James Smith à Houston (TX, USA) mettait en évidence un gène, *Sdi1*, (pour *senescent cell-derived inhibitor*), identique à *CIP1/WAF1* [29]. L'approche utilisée mettait en jeu la surexpression transitoire dans les fibroblastes en prolifération de protéines codées par des ADNc isolés à partir de cellules sénescentes et susceptibles d'inhiber la synthèse d'ADN dans les cellules prolifératives. L'expression de *Sdi1* augmente de 10 à 20 fois dans les cellules sénescentes par rapport aux cellules jeunes; cette augmentation est corrélée au phénotype « sénescent » et à la perte de la capacité des cellules de proliférer. L'expression de *Sdi1* est également stimulée dans les cellules rendues quiescentes par privation de sérum ou dans les cellules en inhibition de contact, rappelant les résultats obtenus pour p27^{Kip1}. Enfin, l'équipe de David Morgan (San Francisco, CA, USA) a mis en évidence une protéine CAP20 (pour *cdk2-associated protein*) liant et inhi-

bant les complexes cdk2-cycline A dans les fibroblastes de souris [30]. Bien que le clonage de l'ADNc de CAP20 n'ait pas été réalisé, l'identité de cette protéine avec p21 est fort probable. Du florilège de travaux concernant cette protéine, il faut aussi extraire les résultats du groupe de Bruce Stillman (Cold Spring Harbor, NY, USA) [31] démontrant la capacité de p21 d'inhiber, *in vitro*, la réplication de l'ADN dépendante de PCNA (*proliferating-cell nuclear antigen*). On connaissait l'existence, dans les cellules normales, de complexes quaternaires entre cdk, cycline, p21 et PCNA, un agencement détruit dans les cellules transformées [26], mais l'action antirépllicative récemment rapportée met en jeu une interaction directe de p21 avec PCNA en absence de cdk-cycline. Plus déterminants sont les travaux récents de l'équipe de Steven Reed (La Jolla, CA, USA) [32] qui établissent définitivement le lien entre p53 et cycle cellulaire et valident ainsi le modèle proposé par Bert Vogelstein : l'irradiation de fibroblastes humains induit, *via* p53 et p21^{CIP1/WAF1/Sdi1}, une perte d'activité des complexes cdk2-cycline E conduisant à un arrêt de la progression des cellules en G1/S (*m/s* n° 6-7, vol. 10, p. 744).

RÉFÉRENCES

28. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-25.
29. Noda A, Ning Y, Venable SF, Perreira-Smith OM, Smith JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 1994; 211: 90-8.
30. Gu Y, Turck CW, Morgan DO. Inhibition of CDK2 activity *in vivo* by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 1993; 366: 707-10.
31. Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994; 369: 574-8.
32. Dulic V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, Elledge SJ, Reed SI. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 1994; 76: 1013-23.
33. Zhang H, Hannon GJ, Beach D. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* 1994; 8: 1750-8.
34. Gyuris J, Golemis E, Chertkov H, Brent R. Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with cdk2. *Cell* 1993; 75: 791-803.
35. Hannon GJ, Casso D, Beach D. KAP. A dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1731-5.
36. Hannon GJ, Beach D. p15^{INK4B} is a potential effector of TGF β -induced cell cycle arrest. *Nature* 1994; 371: 257-61.
37. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; 366: 704-7.
38. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitian SV, Stockert E, Day III RS, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436-40.
39. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; 368: 753-6.
40. Cairns P, Mao L, Merlo A, Lee DJ, Schwab D, Eby Y, Tokino K, Van der Riet P, Blaugrund JE, Sidransky D. Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science* 1994; 265: 415-6.

Nous avons évoqué la parenté des protéines p21 et p27. Le domaine conférant l'activité inhibitrice de ces deux protéines a été identifié dans leur région N-terminale homologue [23]. Il n'est donc pas surprenant que les deux protéines présentent un spectre d'action similaire: à l'instar de p21, p27 peut, *in vitro*, inhiber les différents complexes cdk-cyclines [23, 24].

Notons enfin qu'un travail récent apporte un degré supplémentaire de complexité quant au mécanisme d'action potentiel des «inhibiteurs» de cdk: des complexes p21-cdk2-cycline A existaient sous forme active ou inactive selon la stoechiométrie de p21 [33]. L'effet inhibiteur ne s'exercerait que lorsque le taux de la protéine modulatrice deviendrait supérieur à celui du complexe cdk-cycline.

p24^{CIP2/Cdi1/KAP}: un inhibiteur à activité phosphatase?

Une autre protéine, s'associant à cdc2, cdk2 et cdk3 (mais pas à cdk4), a été mise en évidence et son ADNc a été cloné par trois groupes différents grâce au système des doubles hybrides: CIP2 (*Cdk interacting protein*), Cdi1 (*cyclin-dependent kinase interactor*) et KAP (*cdk associated phosphatase*), découvertes respectivement par Wade Harper et Stephen Elledge [25], Roger Brent (Boston, MA, USA) [34] et David Beach [35] correspondent en fait à une même protéine de 24 kDa. La fonction et le mécanisme d'action de p24 ne sont pas connus. On sait seulement qu'il s'agit d'une phosphatase à double spécificité (Thr/Tyr phosphatase). Dans les cellules HeLa, p24 est exprimée lors de la transition G1/S. L'introduction de l'ADNc codant pour p24 dans les cellules HeLa ou chez la levure retarde la progression en G1. Cet effet est dépendant de l'activité phosphatase de p24. Il est tentant de postuler que l'action de p24 s'exerce au niveau de la Thr161 de cdc2 (et de son homologue dans cdk2 et cdk3) mais cela n'est pas démontré.

p16^{INK4}: un nouveau suppresseur de tumeur?

p16^{INK4} (pour *inhibitor of cdk4*), protéine s'associant à cdk4 (et à cdk6, se-

lon une récente publication,[36]), a été mise en évidence pour la première fois par l'équipe de David Beach [26] et ultérieurement clonée grâce, une fois encore, au système des doubles hybrides [37]. Ce nouvel inhibiteur serait spécifique des complexes cdk4-cycline D [37] et cdk6-cycline D [36]. De façon étonnante, la protéine p16 est retrouvée engagée sous forme de complexes binaires avec cdk4 dans les fibroblastes transformés [26].

Par une voie totalement différente, deux autres groupes, celui d'Alexander Kamb et Mark Skolnick à Salt Lake City (UT, USA) [38] et celui de Dennis Carson à San Diego (CA, USA) [39] allaient révéler l'importance de p16^{INK4} dans les relations entre cancer et cycle cellulaire (*m/s n° 6-7 vol. 10, p. 744*). A la recherche de gènes impliqués dans la transformation cellulaire, ces auteurs se sont intéressés à une région du bras court du chromosome 9 humain (9p21) soumis à de multiples remaniements (par inversion, translocation et surtout délétion) dans de nombreuses lignées tumorales issues de mélanomes, de gliomes, de cancers du poumon ou de leucémies. La fréquence des délétions observées suggérait la présence d'un (ou de plusieurs?) gène(s) suppresseur(s) de tumeur dans cette région. Les deux groupes parvinrent simultanément à isoler la plus petite région (40 à 50 kb) commune à ces délétions. Le séquençage mettait en évidence un gène (*MTS1*) codant pour une protéine qui n'était autre que p16^{INK4}. Un second gène (*MTS2*) codant pour une protéine similaire à p16 mais non identifiée était également localisé à proximité [38]. Cette découverte paraissait considérable: sur les 290 lignées tumorales étudiées par Kamb et Skolnick, 46% présentaient des délétions au niveau de p16: 82% des astrocytomes, 71% des gliomes, 60% des ostéosarcomes et des carcinomes mammaires, 58% des mélanomes, 56% des cancers rénaux présentaient de telles altérations. Seuls les cancers du côlon et les neuroblastomes échappaient au phénomène. p16^{INK4} se voyait dotée d'un statut égal à celui de p53. Bien qu'il ne se soit passé que quelques mois depuis la publication de ces travaux, le formidable engouement suscité alors doit être au-

jourd'hui modulé. La fréquence des délétions de p16^{INK4} observées dans les tumeurs primaires (et non plus dans les lignées établies) chute spectaculairement à moins de 20 % [40]. Notons cependant que des travaux récents mettent en évidence l'existence de mutations ponctuelles en plus des délétions précédemment décrites. Il paraît néanmoins nécessaire d'attendre que soient conduites des études plus complètes pour statuer définitivement sur l'importance de p16 en tant que suppresseur de tumeur.

p15^{INK4B} : une nouvelle pièce du puzzle

C'est le dernier-né des inhibiteurs des cdk-cyclines et c'est encore au groupe de David Beach que l'on doit son identification [36]. Un an après la découverte de p27^{Kip1}, le TGFβ livrait une nouvelle pièce du puzzle. L'immunoprécipitation de cdk4 ou de cdk6 à partir de lysats de kératinocytes humains (HaCaT) arrêtés en G1 par le TGFβ démontrait la présence d'une protéine d'environ 15 kDa, en plus de l'inhibiteur p16^{INK4} précédemment mis en évidence. L'utilisation d'un anticorps anti-p16 suggérait une possible relation immunologique, et donc une ressemblance des protéines p15 et p16. L'ADNc de la protéine p15 a alors été cloné par criblage, à l'aide d'une sonde p16, d'une banque d'ADNc préparée à partir des cellules HaCaT traitées par le TGFβ. p15^{INK4B} est ainsi nommée du fait de sa très forte homologie avec p16^{INK4} (44 % de similitude pour les 50 premiers acides aminés N-terminaux, 97 % pour les 81 suivants). Le TGFβ stimule d'un facteur 30 la synthèse de p15 dans les kératinocytes. Rappelons que l'expression de p27^{Kip1} apparaissait, au contraire, constitutive. p15 et p16 inhibent l'activité Rb-kinase des complexes cdk4-cycline D et cdk6-cycline D. Enfin, chose remarquable, p15 semble être la protéine codée par le gène MTS2 et pourrait donc être, à l'instar de p16, un suppresseur de tumeur.

Pour conclure....

Ainsi, au moins cinq types de protéines modulatrices (p15, p16, p21,

p24 et p27) interviennent dans la régulation de l'activité des complexes cdk-cyclines mis en jeu en G1/S chez les mammifères. Leur spécificité est plus ou moins large, avec, aux deux extrêmes, d'une part p15 et p16 (spécifiques de cdk4 et cdk6) et d'autre part p21 et p27 (potentiellement actives sur l'ensemble des complexes). Plusieurs de ces inhibiteurs paraissent particulièrement mobilisés dans certaines situations cellulaires : p21 induit un blocage en G1 dans les cellules quiescentes, sénescences ou en cas de lésion de l'ADN ; p27 pourrait être responsable de l'arrêt en G1 des cellules en inhibition de contact, traitées par le TGFβ ou par l'AMPc ; p15, dont la synthèse est induite par le TGFβ, est un autre médiateur possible de cette cytokine. p15 et p16 pourraient être de nouveaux suppresseurs de tumeur (mais les trois autres inhibiteurs sont aussi de bons candidats).

La liste de ces inhibiteurs est-elle close ? Rien n'est moins sûr, d'autant que ceux identifiés à ce jour semblent essentiellement concerner les cdk-cyclines mobilisées en G1 et S. L'apparente exception représentée par p21 et p27 n'est peut-être pas significative car rien n'indique que l'interaction de ces protéines avec cdc2-cycline B soit opérante *in vivo*. Existe-t-il des inhibiteurs spécifiques de la transition G2/M ? Les travaux rapportés suscitent de nombreuses autres interrogations :

- Comment diverses protéines ne présentant pas de similitude de séquence (à l'exception de p21 et p27, d'une part, et de p15 et p16, d'autre part) peuvent-elles se lier aux cdk-cyclines de façon aussi efficace ?
- Quels sont les liens entre ces inhibiteurs et la signalisation cellulaire ? Une telle relation n'a été élucidée qu'en ce qui concerne la protéine de levure FAR1.
- Quelles fonctions les protéines inhibitrices des complexes cdk-cyclines exercent-elles dans les cellules transformées ?
- Une question tout aussi fondamentale reste à ce jour sans réponse : par quel(s) mécanisme(s) la cellule met-elle fin à l'action de ces inhibiteurs ? Plusieurs hypothèses peuvent être formulées : (1) leur action cesserait lorsque le taux des complexes cdk-cyclines deviendrait supérieur à celui

de l'inhibiteur ; (2) leur activité pourrait être réglée par modification post-traductionnelle ; (3) ils subiraient une dégradation protéolytique* (rappelons que c'est ce mécanisme qui est mis en jeu dans le cas des cyclines).

La mise en évidence de complexes p21-cdk2-cycline A actifs souligne l'importance de la stœchiométrie protéine modulatrice/complexe cdk-cycline et met en exergue la finesse des régulations mises en jeu. On peut formuler l'hypothèse qu'en deçà d'un certain seuil, les modulateurs s'associant aux cycline kinases pourraient, en favorisant la formation des complexes, agir non comme inhibiteurs mais, au contraire, comme activateurs des cdk-cyclines.

Il est clair, en tous les cas, que les modulateurs de petit poids moléculaire sont des liens entre les facteurs de régulation de la prolifération et la machinerie du cycle cellulaire. Ils seront, de ce fait, dans les années à venir, des cibles de choix pour une approche pharmacologique du contrôle des mécanismes de prolifération cellulaire ■

* Il a été récemment suggéré qu'Il2 pourrait avoir pour cible dans les lymphocytes T un système de dégradation protéolytique de p27^{Kip1} (m/s n°2, vol. 11, p. 301).

TIRÉS À PART

J.M. Darbon.

Summary

New cell-cycle regulators: the cdk-cyclins modulatory proteins

A few years after identification of the universal factor that controls onset of mitosis in all eukaryotic cells, MPF (M-phase promoting factor), as the cyclin B-cdc2 kinase, it has become apparent that all transitions of the cell cycle are controlled by a series of kinase complexes between cdc2-related cyclin-dependent kinases (cdk) and their respective regulatory cyclin subunits. While the phosphorylation of Thr161 in cdc2 (or its homologue in the other cdks) appears as a prerequisite for maximal activity of the cyclin-kinases, phosphorylation on Thr14 and Tyr15 exerts an inhibitory action on cyclin B-cdc2 but likely not on the other complexes *in vivo*. A recent flurry of reports reveals the existence of a variety of small proteins which bind to and modulate G1/S cdk-cyclin complexes. In mammalian cells, 5 different regulators, p15, p16, p21, p24 and p27, have been identified so far, being mainly inhibitors. They are believed to delay activation of cdk-cyclins to maintain a temporal order of cdk activation during progression of G1. Some of these inhibitors have been shown to be particularly involved in certain circumstances : p21, whose synthesis is induced by p53, causes G1 cell-cycle arrest following DNA damage or in senescent or quiescent cells. These effects seem essentially the consequence of the inhibitory action of p21 on cdk2-cyclin E complexes but p21 is possibly a universal cdk-cylin regulator. p27 induces G1 arrest in contact-inhibited and in TGF β - or cyclic AMP-treated cells by inhibiting particularly cdk2-cyclin E and/or cdk4-cyclin D. p15, whose synthesis is induced by TGF β , and p16 bind cdk4 as well as cdk6 and appear as new potential tumor suppressors. p24 has homology to dual protein phosphatases and associates to cdc2, cdk2 and cdk3.