

Cycline A et cancer

Eugénia Lamas
Frédérique Zindy
Joëlle Sobczack
Patricia Paterlini
Jian Wang
Xavier Chenivesse
Berthold Henglein
Christian Bréchet

La cycline A, associée à la protéine kinase p34^{cdc2}, est impliquée dans la transition G2/M du cycle. Elle s'associe aussi à la protéine kinase p33^{cdk2} au cours de la phase S du cycle. La cycline A participe à la formation de complexes multimériques comprenant le facteur de transcription E2F, la protéine kinase p33^{cdk2} et la protéine p107, homologue de la p110^{Rb}. La modification de l'expression de la cycline A dans un cancer primitif du foie humain, due à l'insertion de l'ADN du virus de l'hépatite B dans le gène de cette cycline, de même que sa liaison à l'oncoprotéine E1A de l'adénovirus, suggèrent qu'elle pourrait jouer un rôle important dans la carcinogénèse humaine. Les études actuelles de la cycline A font le lien entre, d'une part, la machinerie du cycle cellulaire et, d'autre part, la prolifération cellulaire et l'expression de certains gènes à effet oncogénique ou anti-oncogénique. La cycline A pourrait, enfin, se révéler être un bon marqueur de cellules, plus particulièrement des cellules tumorales. Dans cette optique, il serait intéressant d'élargir les observations actuelles à divers types de cancer.

Les transitions G1/S et G2/M, événements clés du cycle cellulaire, sont contrôlées par un certain nombre de molécules régulatrices, parmi lesquelles les cyclines. Les cyclines sont les sous-unités régulatrices d'une famille de sérine/thréonine protéine kinases regroupées actuellement sous le terme de kinases dépendantes des cyclines (cdk_s) et dont le prototype a été la p34^{cdc2} kinase (*m/s* n° 1, vol. 6, p. 8).

Des travaux récents montrent, en effet, l'existence d'une famille de protéine kinases apparentées à la p34^{cdc2} et associées à différentes cyclines [1-11].

Il est bien établi aujourd'hui, de la levure à l'homme, que la transition G2/M, contrôlant l'entrée en mitose des cellules, est réglée par l'association d'une cycline de type B avec la protéine kinase p34^{cdc2}. L'activation de cette kinase nécessite son association physique avec la cycline et l'activité du complexe cdc2-cycline B est réglée par l'état de phosphorylation de la sous-unité cdc2 [2, 3, 12-14].

Contrairement à la transition G2/M, où le rôle clé de la p34^{cdc2} est bien établi, le contrôle de la transition G1/S, permettant aux cellules de rentrer en phase S de synthèse de

ADRESSE

E. Lamas : chargée de recherche à l'Inserm.
F. Zindy : étudiante en thèse. J. Sobczack : maître de conférences des universités. P. Paterlini : Assistant hospitalo-universitaire. J. Wang : docteur ès sciences. X. Chenivesse : docteur ès sciences. B. Henglein : chargé de recherche à l'Inserm. C. Bréchet : professeur des universités, praticien hospitalier. Inserm U. 370, CHU Necker, 156, rue de Vaugirard, 75015 Paris, France.

l'ADN, n'est pas encore élucidé chez les eucaryotes supérieurs. En revanche, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le rôle de la p34^{cdc28} — et de son équivalent p34^{cdc2} chez *Schizosaccharomyces pombe* — dans la transition G1/S a été clairement montré. Chez *S. cerevisiae*, des cyclines G1 (CLN 1, 2, 3), identifiées par des tests de complémentation, permettent l'activation de la p34^{cdc28} au moment où la cellule s'engage vers la phase S (*start point*) [15, 16].

Les cyclines A et B ont été initialement définies comme des protéines qui s'accumulent pendant l'interphase, puis se dégradent brutalement durant la mitose. Ce sont des cyclines mitotiques ; en effet, la micro-injection des ARNm des cyclines A et B dans les ovocytes de xénope induit leur maturation, et leur dégradation est indispensable pour que la cellule puisse sortir de la mitose [17, 18]. La cycline A comme la cycline B s'associe à la p34^{cdc2} et permettent son activation [19].

Cependant, ces deux types de cyclines présentent des caractéristiques distinctes. En effet, l'accumulation de la cycline A précède celle de la cycline B ; la dégradation de la cycline A a lieu en prophase alors que la cycline B disparaît lors de la

transition métaphase-anaphase. L'activation du complexe cycline A-cdc2 apparaît plus précocement que celle du complexe cycline B-cdc2 au cours du cycle [1]. Les cyclines A et B se distinguent également par leur localisation cellulaire : la cycline A est une protéine essentiellement nucléaire, alors que la cycline B est cytoplasmique et migre dans le noyau au moment de la rupture de l'enveloppe nucléaire [20-22].

Un certain nombre d'éléments suggèrent que, chez les eucaryotes supérieurs, la cycline A, outre son rôle en mitose, pourrait intervenir à un stade plus précoce, notamment dans la phase S en se liant à la p33^{cdk2}, proche mais bien distincte de la p34^{cdc2} [10, 23] (*figure 1*). En effet, nous avons montré (*voir cycline A et phase S*, p. 679) que la cycline A est indispensable à la synthèse d'ADN de cellules épithéliales normales, alors que la cycline B ne l'est pas [21]. D'autres équipes ont confirmé ces résultats dans d'autres systèmes cellulaires [22, 24]. Toutefois, il est important de préciser que la cycline A n'a pas été trouvée chez tous les eucaryotes et que son rôle ne semble pas univoque chez tous les organismes. Ainsi, chez la drosophile, des embryons déficients en cycline A suivent un cycle cellu-

laire qui s'arrête en G2 [25]. Par ailleurs, il a été suggéré, après des études *in vitro* chez le xénope, que la cycline A pourrait être impliquée dans le contrôle qui assure que l'entrée en mitose n'a lieu qu'après la fin de la phase S [26].

L'implication de la cycline A en G1/S et S en fait une cible possible pour des agents carcinogènes. En particulier, nous avons montré, dans un cancer primitif du foie, que l'ADN du virus de l'hépatite B (HBV) s'intégrait dans le gène codant pour la cycline A humaine [27]. Par ailleurs, dans des cellules infectées par l'adénovirus du type 5, l'oncoprotéine virale E1A se lie à la cycline A [28].

Intégration de l'ADN du virus de l'hépatite B dans le gène de la cycline A

Des études épidémiologiques ont montré que l'infection chronique par le virus de l'hépatite B (HBV) est un facteur de risque majeur pour le développement d'un cancer primitif du foie [29]. Divers mécanismes agissant de façon synergique peuvent rendre compte de l'action de l'HBV dans la transformation hépatocytaire. La cirrhose induite par le virus (associée à une régénération hépatique) est un facteur important. Plusieurs arguments plaident également en faveur d'un rôle direct de l'HBV dans la transformation de la cellule hépatique. Il a été montré, en effet, que la protéine virale X et une protéine Prés2/S tronquée à l'extrémité C-terminale peuvent transactiver certains gènes cellulaires comme les oncogènes *myc* et *fos* [30, 31]. De plus, des souris transgéniques pour le seul gène codant pour X peuvent développer des cancers du foie. Une mutagenèse par insertion dans un gène cellulaire peut également être impliquée dans la transformation hépatocytaire. Ainsi, dans 50 % des tumeurs du foie de marmottes chroniquement infectées par le virus de l'hépatite de marmotte, on trouve l'ADN viral intégré dans les gènes codant pour les oncogènes *c-myc* ou *n-myc* [32]. Chez l'homme, seulement deux cas de mutagenèse insertionnelle ont été décrits. Ils concernent les gènes du récepteur B de l'acide rétinique et de la cycline A [27, 33].

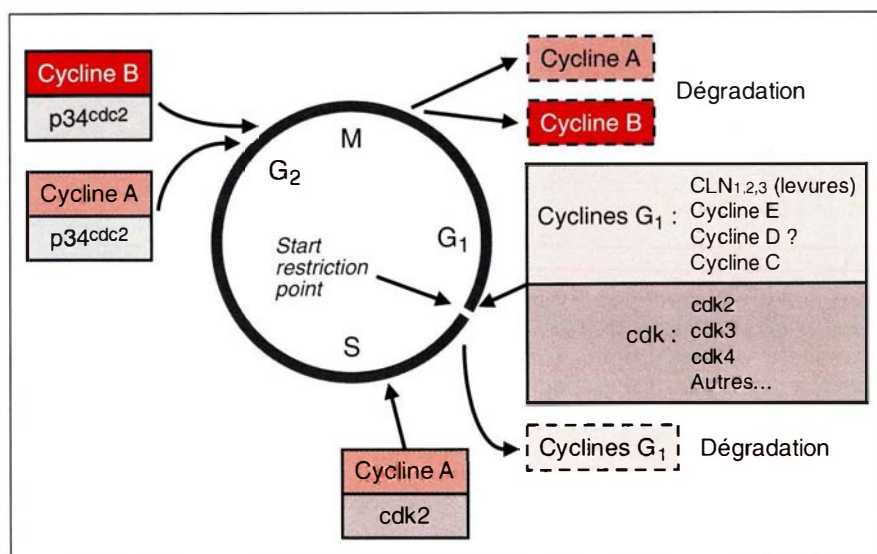


Figure 1. **Cyclines et cycle cellulaire.** Représentation schématique des différentes phases du cycle cellulaire : implication de la cycline A dans les phases S et G2/M du cycle.

RÉFÉRENCES

1. Minshull J, Golsteyn RS, Hill C, Hunt T. The A- and B-type cyclin associated cdc2 kinases in xenopus turn on and off at different times in the cell cycle. *EMBO J* 1990 ; 9 : 2865-75.
2. Meijer L, Azzi L, Wang JYJ. Cyclin B targets p34^{cdc2} for tyrosine phosphorylation. *EMBO J* 1991 ; 10 : 1545-54.
3. Murray W, Kirschner MW. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 1989 ; 339 : 275-86.
4. Blow JJ, Nurse P. A cdc2-like protein is involved in the initiation of DNA replication in xenopus egg extracts. *Cell* 1990 ; 62 : 855-62.
5. Fang F, Newport JW. Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes. *Cell* 1991 ; 66 : 731-42.
6. Paris J, Le Guellec R, Couturier A, Le Guellec K, Omilli F, Camonis J, MacNeill S, Philippe M. Cloning by differential screening of a xenopus cDNA coding for a protein highly homologous to cdc2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 1039-43.
7. Elledge SJ, Spottswood MR. A new human p34 protein kinase, cdk2, identified by complementation of a cdc28 mutation in *Saccharomyces cerevisiae*, is a homolog of xenopus Egl1. *EMBO J* 1991 ; 10 : 2653-9.
8. Meyerson M, Enders GH, Wu CL, Su LK, Gorka, Nelson C, Harlow E, Tsai LH. A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J* 1992 ; 11 : 2909-17.
9. Ninomiya-Tsuji J, Nomoto S, Yasuda H, Reed SI, Matsumoto K. Cloning of a human cDNA encoding a cdc2-related kinase by complementation of a budding yeast cdc28 mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 9006-10.
10. Tsai LH, Harlow E, Meyerson M. Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A and adenovirus E1A-associated p33 kinase. *Nature* 1991 ; 353 : 174-7.
11. Dalton S. Cell cycle regulation of the human cdc2 gene. *EMBO J* 1992 ; 11 : 1797-804.
12. Luca FC, Shibuya EK, Dohrmann CE, Ruderman JV. Both cyclin A 60 and B 97 are stable and arrest cells in M-phase, but only cyclin B 97 turns on cyclin destruction. *EMBO J* 1991 ; 10 : 4311-20.

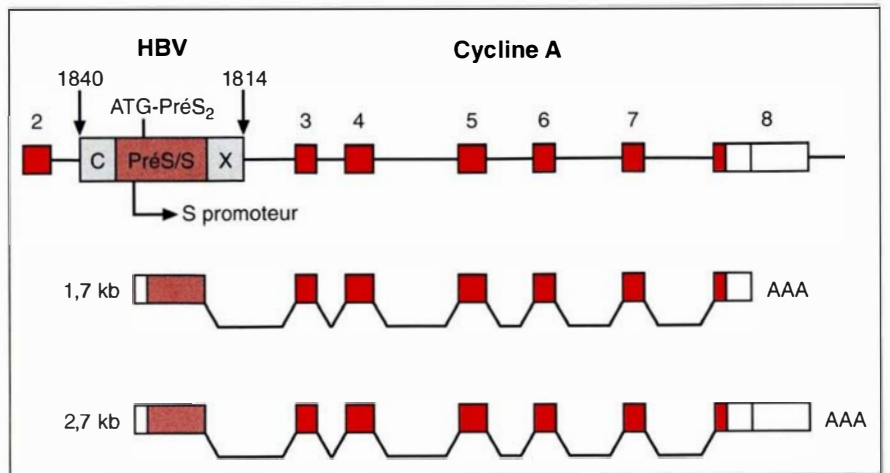


Figure 2. **Cycline A (tumeur HEN).** Insertion de l'ADN du virus de l'hépatite B dans le deuxième intron du gène de la cycline A dans un cancer primitif du foie (tumeur HEN). Organisation génétique des transcrits hybrides (HBV-cycline A) identifiés dans la tumeur « HEN ». Les exons codants du gène cycline A sont représentés en rouge, les régions non codantes en blanc. Le génome viral intégré est représenté en gris et, pour la partie se retrouvant dans l'ARN hybride, en couleur bistre.

C'est précisément l'identification du site d'intégration de l'ADN de l'HBV dans une tumeur précoce du foie qui nous a permis d'isoler et de séquencer le gène de la cycline A (B. Henglein, soumis pour publication). Dans cette tumeur, le tissu adjacent est histologiquement normal (nous laissons supposer un effet direct de l'HBV sur la transformation hépatocytaire). L'ADN viral est intégré dans le deuxième intron du gène de la cycline A, entraînant une surexpression de deux ARN hybrides, initiés au promoteur PréS2/S de l'HBV ; ces ARN comprennent les séquences PréS2 et S délétées en 3', fusionnées après épissage aux exons 2-8 de la cycline A avec conservation du cadre de lecture (figure 2). Dans cette tumeur, les transcrits normaux cycline A et HBV n'ont pu être mis en évidence. La protéine potentiellement codée par ces ARN hybrides présente des caractéristiques très intéressantes : il s'agirait, en effet, d'une protéine chimère de 430 acides aminés dans laquelle les 152 acides aminés de la partie N-terminale sont remplacés par 150 acides aminés des protéines virales PréS2-S alors que, dans les deux tiers de la partie C-terminale, la séquence de la cycline A contenant la *cyclin box* est intacte. Les séquences responsables de la dégrada-

tion de la cycline A sont localisées dans la partie N-terminale et sont donc délétées dans la protéine chimère. Utilisant un système de dégradation *in vitro* dans les ovocytes de xénope, nous avons pu effectivement vérifier que la protéine HBV/cycline A n'est pas dégradée (figure 3). Il est cependant frappant de constater que, malgré l'expression très importante des ARN hybrides, nous n'avons pas pu détecter la protéine chimère. Cela peut s'expliquer soit par des modifications conformationnelles de la protéine empêchant sa reconnaissance aussi bien par des anticorps anti-cycline A que par des anticorps anti-PréS2/S, soit par un taux très faible d'expression [34]. Le rôle potentiel de la protéine HBV/cycline A dans la transformation cellulaire est actuellement testé au laboratoire. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer l'implication éventuelle de la protéine chimère dans la carcinogenèse. Il est possible que cette protéine chimère non dégradée ait gardé la capacité de lier et d'activer les kinases p34^{cdc2} et p33^{cdk2}, provoquant ainsi une synthèse d'ADN et donc une prolifération cellulaire prématurée et non réglée. Par ailleurs, la localisation de la cycline A pourrait être altérée par la présence des séquences virales

transmembranaire — et il est possible que la localisation cellulaire, plus que le taux d'expression de cette protéine, puisse rendre compte des modifications du phénotype. Enfin, nous avons vu que la protéine virale PrÉS2/S tronquée en C-terminal peut transactiver certains gènes cellulaires ; or, la partie N-terminale de la protéine hybride inclut ce type de séquences.

Cycline A et phase S

De façon parallèle à ce travail, nous avons étudié l'expression de la cycline A dans des cellules épithéliales normales (hépatocytes de rat en culture primaire) au cours du cycle cellulaire. Les hépatocytes peuvent être maintenus en culture primaire pendant une période d'environ huit jours dans un milieu sans sérum, supplémenté en insuline et en dexaméthasone, en gardant une partie de leurs fonctions différenciées. Dans ces conditions, la synthèse d'ADN est faible. En revanche, dans un milieu sans sérum mais supplémenté en insuline, pyruvate et *epidermal growth factor* (EGF), elle est stimulée avec un maximum au troisième jour de culture. Nous avons montré que les ARNm et la protéine de cycline A sont uniquement détectés dans les

hépatocytes stimulés par les facteurs de croissance. Le profil d'expression de la cycline A coïncide avec celui de la synthèse d'ADN, mesurée par l'incorporation de la thymidine tritiée, suggérant un rôle de la cycline A à la phase S du cycle cellulaire. Afin de vérifier que ces observations *in vitro* reflétaient la situation *in vivo*, nous avons utilisé le modèle du foie de rat en régénération. Dans ce système, qui permet une synchronisation partielle, les ARNm et la protéine de cycline A s'accumulent à partir de 24 heures (phase répliative) et cela jusqu'à 32 heures (première division cellulaire) (figure 4, p. 681). Il nous a été possible de compléter cette étude par des expériences de micro-injection : la micro-injection d'un plasmide contenant l'ADNc de la cycline A placé en orientation antisens sous le contrôle d'un promoteur fort de SV40 bloque la synthèse de l'ADN cellulaire des hépatocytes stimulés par les facteurs de croissance. Cet effet est spécifique et n'est pas retrouvé pour la cycline B [21]. Des résultats semblables ont été obtenus après micro-injection d'anticorps anti-cycline A dans des fibroblastes et des cellules HeLa [22, 24]. L'ensemble de ces résultats montre que la cycline A est nécessaire pour l'accomplissement de la phase S dans les cel-

lules de mammifères en culture. La cycline A s'associe à la p33^{cdk2} ; cette kinase est un élément régulateur important de la transition G1/S. Le complexe cycline A-cdk2 est essentiellement présent en phase S. Il semble donc, au moins dans les modèles de cellules de mammifères en culture, que la cycline A se lie à deux kinases différentes, et cela en fonction des phases du cycle cellulaire [10, 35]. Le rôle de la cycline A en phase S suggère qu'elle pourrait être impliquée dans la réplication de l'ADN cellulaire. Précisément, en collaboration avec F. Harper et E. Puvion, nous avons récemment observé, dans des cellules HeLa en culture, une co-localisation de la cycline A et de l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA) au niveau de sites de synthèse de l'ADN cellulaire (identification par visualisation au microscope électronique de l'incorporation de bromodésoxyuridine) [36]. Ce résultat renforce notre hypothèse. Des données plus précises ont pu être obtenues par l'utilisation de systèmes acellulaires de réplication de l'ADN du virus SV40. En présence d'extraits cellulaires provenant de cellules humaines en croissance exponentielle (S-100), l'antigène grand T (AgT) de SV40 permet la réplication d'un plasmide contenant l'origine de réplication de l'ADN SV40. Ce modèle expérimental a permis la purification, à partir des extraits cellulaires, de plusieurs facteurs de réplication humains agissant à différentes étapes de la réplication de l'ADN. Les protéines actuellement identifiées et directement impliquées dans la synthèse d'ADN sont : les deux ADN polymérases (l'ADN polymérase α /primase et l'ADN polymérase D), la protéine de réplication A (RP-A), l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA), un facteur de réplication E (RFC) et les deux ADN topo-isomérases I et II. Des études de fusion cellulaire, montrant que la fusion d'une cellule en G1 avec une cellule en phase S induit une synthèse prématurée de l'ADN dans la cellule en G1, suggéraient déjà l'existence d'un inducteur de la réplication de l'ADN. Actuellement, plusieurs arguments laissent penser que certains de ces inducteurs pourraient être des cdk. Sur la base de sa

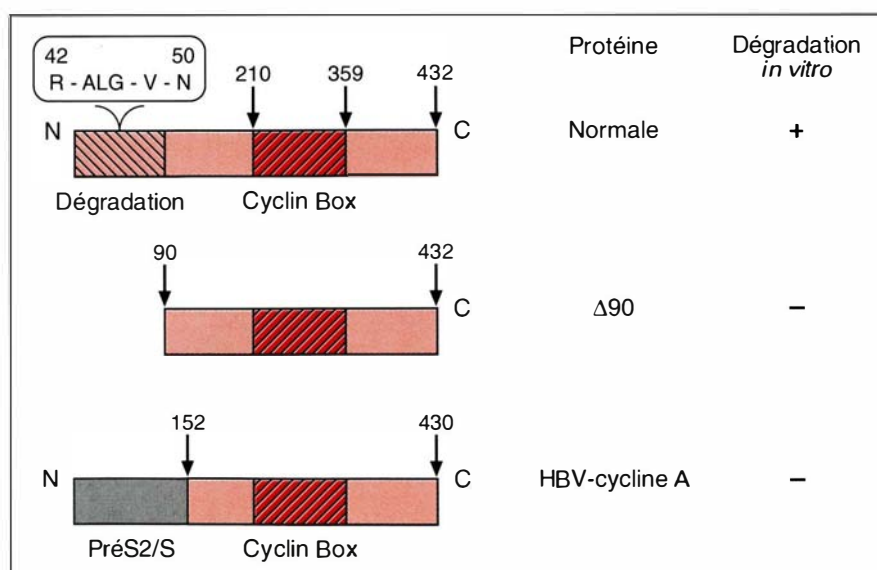


Figure 3. **Structure de la protéine hybride HBV-cycline A.** Représentation de la protéine chimère potentiellement codée par les transcrits hybrides dans la tumeur HEN.

RÉFÉRENCES

13. Lorca T, Labbé JC, Devault A, Fesquet D, Capony JP, Cavadore JC, Le Bouffant F, Dorée M. Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2 kinase inactivation and normal anaphase. *EMBO J* 1992 ; 11 : 2381-90.
14. Durphy WD, Brizuela L, Beach D, Newport J. The xenopus cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 1988 ; 54 : 423-31.
15. Lew DJ, Dulic V, Reed SI. Isolation of three novel human cyclin puc1+ in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 1991 ; 351 : 245-8.
16. Cross FR. Cell cycle arrest caused by CLN gene deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* resembles Start-1 arrest and is dependent of the mating-pheromone signalling pathway. *Mol Cell Biol* 1990 ; 10 : 6482-90.
17. Murray AW, Solomon MJ, Kirschner MW. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* 1989 ; 339 : 280-6.
18. Swenson KI, Farrell KM, Ruderman JV. The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and resumption of meiosis in xenopus oocytes. *Cell* 1986 ; 47 : 861-70.
19. Draetta G, Luca F, Westendorf J, Brizuela L, Ruderman J, Beach D. cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B : evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell* 1989 ; 56 : 829-38.
20. Pines J, Hunter T. Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *Cell Biol* 1991 ; 115 : 1-17.
21. Zindy F, Lamas E, Chenivresse X, Sobczak J, Wang J, Fesquet D, Henglein B, Bréchet C. Cyclin A is required in S phase in normal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 ; 182 : 1144-54.
22. Girard F, Strausfeld U, Fernandez Lamb NJC. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 1991 ; 67 : 1169-79.
23. Pines J, Hunter T. Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* 1990 ; 346 : 760-3.
24. Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J* 1992 ; 88 : 1039-43.
25. Lehner CF, O'Farrell PH. The role of drosophila cyclins A and B in mitotic control. *Cell* 1990 ; 61 : 535-47.
26. Walker DH, Maller JL. Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature* 1991 ; 354 : 314-7.
27. Wang J, Chenivresse X, Henglein B, Bréchet C. Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 1990 ; 343 : 555-7.
28. Giordano A, Whyte P, Harlow E, Franza BR, Beach DJr, Draetta G. A 60 kDa cdc2-associated polypeptide complexes with the E1A proteins in adenovirus-infected cells. *Cell* 1989 ; 58 : 981-90.
29. Szumness W. Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus : evidence for a causal association. *Prog Med Virol* 1991 ; 24 : 40-69.
30. Kekule AS, Laner U, Meyer M, Caselman WH, Hofschneider PH, Kosh R. The preS2.S region of integrated hepatitis B virus encodes a transcriptional trans-activator. *Nature* 1990 ; 343 : 457-60.
31. Arii M, Takada S, Koike K. Identification of three essential regions of hepatitis B virus X protein for trans-activation. *Oncogene* 1992 ; 7 : 397-403.
32. Hsu T, Moroy T, Etienneble J, Louise A, Trepo C, Tiollais P, Buendia MA. Activation of c-myc by woodchuck hepatitis virus insertion in hepatocellular carcinoma. *Cell* 1988 ; 55 : 627-35.
33. Dejean A, Bougueleret L, Grzeschik KH, Tiollais P. Hepatitis B virus DNA integration in a sequence homologous to v-erb-A and steroid receptor gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 1986 ; 33 : 70-2.
34. Wang J, Zindy F, Chenivresse X, Lamas E, Henglein B, Bréchet C. Modification of cyclin A expression by hepatitis B virus DNA integration in a hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1992 ; 7 : 653-6.
35. Rosenblatt J, Gu Y, Morgan DO. Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during the S and G2 phases of the cell cycle and associates with cyclin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 2824-8.
36. Sobczak J, Harper F, Florentin Y, Zindy F, Bréchet C, Puvion E. Localisation of cyclin A at the sites of cellular DNA replication. *Exp Cell Res* 1993 (sous presse).
37. D'Urso G, Marracino RL, Marschak DR, Roberts JM. Cell cycle control of DNA replication by a homologue from human cells of the p34^{cdc2} protein kinase. *Science* 1990 ; 250 : 786-91.

capacité à activer la réplication de l'ADN dans des extraits cellulaires en G1, le facteur RF-S a été partiellement purifié à partir de cellules humaines : on a montré que le RF-S contient une kinase cdc2 (la p34^{cdc2}) et que l'étape limitant l'activation de la kinase cdc2 à la transition G1/S pourrait être son association à une cycline. En effet, l'addition de cyclines A ou B à des extraits cellulaires en G1 augmente l'initiation de la réplication de l'ADN. Par ailleurs, la protéine de réplication A (RP-A) possède une sous-unité (RPA-32) dont la phosphorylation dépend du cycle cellulaire. La phosphorylation de la RPA-32 survient au moment de la synthèse d'ADN. Il a été montré *in vitro* que les complexes cycline A-cdc2, cycline B-cdc2 et cycline A-cdk2 peuvent phosphoryler la sous-unité RPA-32 et pourraient donc être considérés comme les kinases *in vivo* de la RP-A. Cependant, une autre étude montre des résultats différents, suggérant que les cdk ne sont pas indispensables à la phosphorylation de RPA-32. En effet, cette phosphorylation et l'association de RPA-32 à l'origine de la réplication ont été observées dans un extrait cellulaire en phase S dont les cdk ont été épuisés [37-39]. Il est également frappant de constater que, dans ces systèmes *in vitro*, la cycline B est détectée dans des facteurs de réplication alors qu'il n'existe aucun argument actuellement en faveur d'un rôle de la cycline B dans la phase S du cycle cellulaire.

Malgré les discordances entre différentes équipes, il semble que des kinases dépendantes des cyclines sont impliquées dans une ou plusieurs étapes du processus de réplication de l'ADN cellulaire. Bien que son rôle ne soit pas définitivement établi, la cycline A pourrait intervenir dans cette réplication. Cependant, d'autres cyclines, les cyclines G1 et notamment la cycline E, pourraient également participer à la réplication de l'ADN.

Cycline A et régulation transcriptionnelle

La cycline A s'associe à l'oncoprotéine virale E1A de l'adénovirus, et participe à la formation de complexes

avec des protéines jouant un rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire, telles que le facteur de transcription E2F et la protéine p107, homologue de la p110 du rétinoblastome. Ces complexes contenant la cycline A semblent s'accumuler spécifiquement à la phase S du cycle cellulaire [40]. La protéine précoce E1A de l'adénovirus de type 5 a la capacité d'immortaliser des cellules épithéliales normales. Les domaines nécessaires à la fonction d'immortalisation d'E1A sont également ceux qui participent à la liaison d'E1A avec des protéines cellulaires. En effet, il a été montré par immunoprécipitation que la protéine p110 du rétinoblastome,

la p107, et la cycline A se trouvent parmi les protéines se liant à E1A dans les cellules infectées par l'adénovirus [41-44]. Par ailleurs, l'étude de la transcription du gène E2 de l'adénovirus a permis d'identifier le facteur de transcription E2F et de montrer qu'il est indispensable à cette transcription. Depuis, des sites pouvant lier E2F ont été identifiés sur un certain nombre de promoteurs de gènes qui, pour la plupart, sont impliqués dans la transition G1/S du cycle (*c-myc*, *c-myb*, thymidine kinase, DHFR, ADN polymérase α) [40, 45-49]. E2F réglerait l'expression de ces promoteurs. La cycline A se lie à E2F dans un complexe spécifique-

ment identifié en phase S. Ce complexe cycline A-E2F peut être dissocié par la protéine E1A, libérant le facteur E2F. De plus, la cycline A s'associe à la protéine p107, homologue de la p110^{Rb}, régulateur négatif de la prolifération cellulaire. Les protéines p110^{Rb} et p107 possèdent toutes deux un domaine de liaison (*pocket domain*) qui permet l'association aux oncoprotéines virales E1A, à l'antigène grand T de SV40 et à la protéine E7 du papillomavirus humain (HPV 16). Cependant, la liaison de la p107 à la cycline A se réalise grâce à un domaine intermédiaire (*spacer region*) (figure 5). En revanche, la protéine p110^{Rb} ne

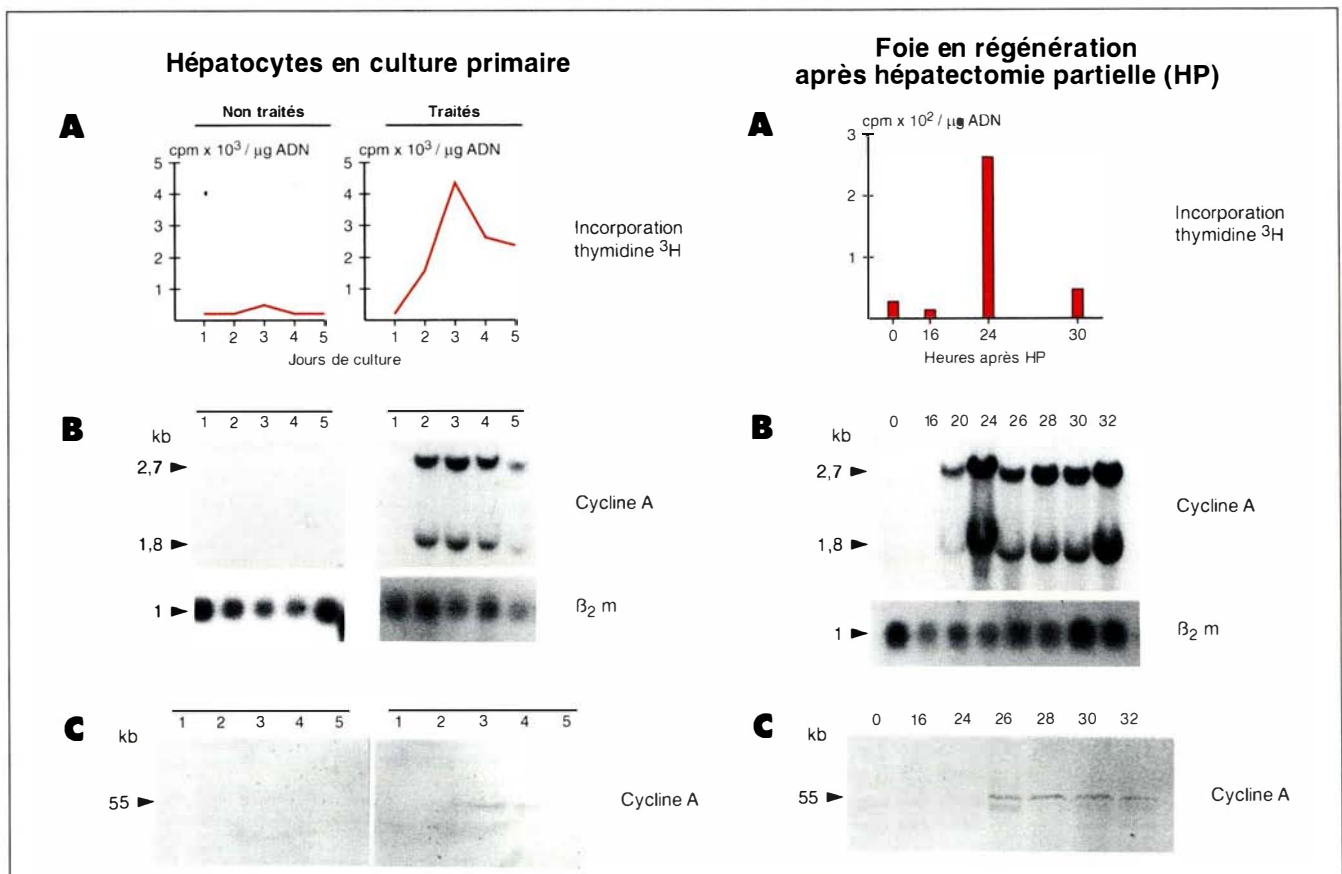


Figure 4. **Expression de la cycline A. Hépatocytes en culture primaire.** **A.** Incorporation de la thymidine tritiée (³H) dans les hépatocytes à différents jours de culture primaire. **B.** Northern blot : expression des ARN messagers de la cycline A à différents jours de culture. **C.** Western blot : expression de la protéine de cycline A à différents jours de culture. **Foie en régénération après hépatectomie partielle (HP).** **A.** Incorporation de la thymidine tritiée (³H) différentes heures après hépatectomie partielle (24 heures : phase S). **B.** Northern blot : expression des ARN messagers de la cycline A à différentes heures après hépatectomie partielle. **C.** Western blot : expression de la protéine de cycline A à différentes heures après hépatectomie partielle.

RÉFÉRENCES

38. Dutta A, Stillman B. cdc2 family kinases phosphorylate a human cell DNA replication factor, RPA, and activate DNA replication. *EMBO J* 1992 ; 11 : 2189-99.
39. Fotedar R, Roberts JM. Cell cycle regulated phosphorylation of RPA-32 occurs within the replication complex. *EMBO J* 1992 ; 11 : 2177-87.
40. Shirodkar S, Ewen M, DeCaprio JA, Morgan J, Livingston DM, Chittenden T. The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle regulated manner. *Cell* 1992 ; 68 : 157-66.
41. Ewen ME, Faha B, Harlow E, Livingston DM. Interaction of p107 with cyclin A independent of complex formation with viral oncoproteins. *Science* 1992 ; 255 : 85-7.
42. Faha B, Ewen ME, Tsai LH, Livingston DM, Harlow E. Interaction between human cyclin A and adenovirus E1A-associated p107 protein. *Science* 1992 ; 255 : 87-90.
43. Giordano A, McCall C, Whyte P, Franza BR. Human cyclin A and the retinoblastoma protein interact with similar but distinguishable sequences in the adenovirus E1A gene product. *Oncogene* 1991 ; 6 : 481-5.
44. Howe JA, Bayley ST. Effects of AdS E1A mutant viruses on the cell cycle in relation to the binding of cellular proteins including the retinoblastoma protein and cyclin A. *Virology* 1992 ; 186 : 15-24.
45. Hiebert SW, Blake M, Azizkhan J, Nevins JR. Role of E2F transcription factor in E1A-mediated transactivation of cellular genes. *J Virol* 1991 ; 65 : 3547-52.
46. Helin K, Lec JA, Vidal M, Dyson N, Harlow E, Fattay A. A cDNA encoding a pRb-binding protein with properties of the transcription factor E2F. *Cell* 1992 ; 70 : 337-50.
47. Kaelin WG, Krek W, Sellers WR, DeCaprio JA, Ajchenbaum F, Fuchs CS, Chittenden T, Li Y, Farhanam PJ, Blannar MA, Livingston DM, Flemington EK. Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell* 1992 ; 70 : 351-64.
48. Nevins JR. A closer look at E2F. *Nature* 1992 ; 358 : 375-6.
49. Goodrich DW, Wang NQ, Qian YW, Lee EYHP, Lee WH. The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 1991 ; 67 : 293-302.
50. Partridge JF, La Thanguc NB. A developmentally regulated and tissue-dependent transcription factor complexes with the retinoblastoma gene product. *EMBO J* 1991 ; 12 : 3819-27.
51. Weinstraub SJ, Prater CA, Dean DC. Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* 1992 ; 358 : 259-61.
52. Hinds PW, Mittnacht S, Dulic V, Arnold A, Reed SI, Weinberg RA. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* 1992 ; 70 : 993-1006.
53. Devoto SH, Mudrij M, Pines J, Hunter T, Nevins JR. A cyclin A protein kinase complex possesses sequence-specific DNA binding activity : p33^{cdk2} is a component of the E2F-cyclin A complex. *Cell* 1992 ; 68 : 161-76.
54. Mudryj M, Devoto SH, Hiebert SW, Hunter T, Pines J, Nevins JR. Cell cycle regulation of the E2F transcription factor involves an interaction with cyclin A. *Cell* 1991 ; 65 : 1243-53.
55. Pagano M, Draetta J, Pidge JD. Association of cdc2 kinase with the transcription factor E2F during S phase. *Science* 1992 ; 255 : 1144-7.
56. Paterlini P, Suberville AM, Zindy F, Melle J, Sonnier M, Marie JP, Dreyfus F, Bréchet C. Cyclin expression in human hematological malignancies : a new marker of cell proliferation. *Cancer Res* 1993 ; 53 : 1-4.
57. Xiong Y, Beach D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 1992 ; 71 : 505-14.
58. Motokur T, Bloom T, Kim HG, Juppner H, Ruderman JV, Kronenberg HM, Arnold A. A novel cyclin encoded by a bcl-1 linked candidate oncogene. *Nature* 1991 ; 350 : 512-5.
59. Matsushime H, Ewen ME, Strom DK, Kato JY, Hanks SK, Roussel MF, Sherr CJ. Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34^{p3K-J3^{cdk4}}) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* 1992 ; 71 : 323-34.
60. Xiong Y, Connolly T, Futcher B, Beach D. Human D-type cyclin. *Cell* 1991 ; 65 : 691-9.

semble pas se lier directement à la cycline A [43, 44]. La fonction répressive de la croissance cellulaire de la p110^{Rb} est modulée par son état de phosphorylation, qui dépend de complexes cycline-cdc2. La protéine Rb est hypophosphorylée en G1 et phosphorylée en S. La forme hypophosphorylée s'associe aux oncoprotéines virales ainsi qu'à des protéines cellulaires : c-myc, n-myc, E2F, *Rb binding proteins* (RBP 1, 2, 3...) [46-50]. La liaison de la forme hypophosphorylée en G1 à ces protéines cellulaires pourrait rendre compte de la répression par la protéine Rb de la croissance cellulaire en G1. En revanche, à la fin de G1 et en phases S/G2/M, Rb est sous forme phosphorylée et inactive [49, 51]. Des résultats récents, rapportés par l'équipe de Nevins, suggèrent cependant que ce modèle est probablement trop simplifié : le couple E2F/Rb apparaîtrait en fait en phase S et non en phase G1 (résultats non publiés). Le rôle de la phosphorylation dans l'inactivation de Rb a été bien illustré récemment par les travaux de Hinds *et al.* montrant que l'expression ectopique de cycline A et de cycline E peut induire la phosphorylation et l'inactivation de Rb [52].

Finalement, la protéine kinase p33^{cdk2} participe aussi au complexe spécifique en phase S, qui est donc composé de E2F/p107/cycline A/cdk2. Toutes ces observations montrent que la cycline A participe à une série de complexes multimoléculaires où elle est associée à diverses protéines ayant un rôle dans la croissance cellulaire [53-55].

Actuellement, le rôle précis de la cycline A n'est pas encore bien établi. Cela dit, plusieurs hypothèses peuvent être émises : il a été montré que la protéine E2F possède un domaine de liaison à l'ADN. L'association du complexe cycline A/cdk2 kinase à une protéine de liaison de l'ADN pourrait cibler la kinase vers son substrat et/ou moduler son activité *via* sa phosphorylation. De plus, puisque des complexes cycline/cdk2 phosphorylent Rb, la cycline A pourrait annuler le blocage imposé par Rb dans la progression du cycle cellulaire. La protéine p53 étant phosphorylée par ces mêmes complexes, la

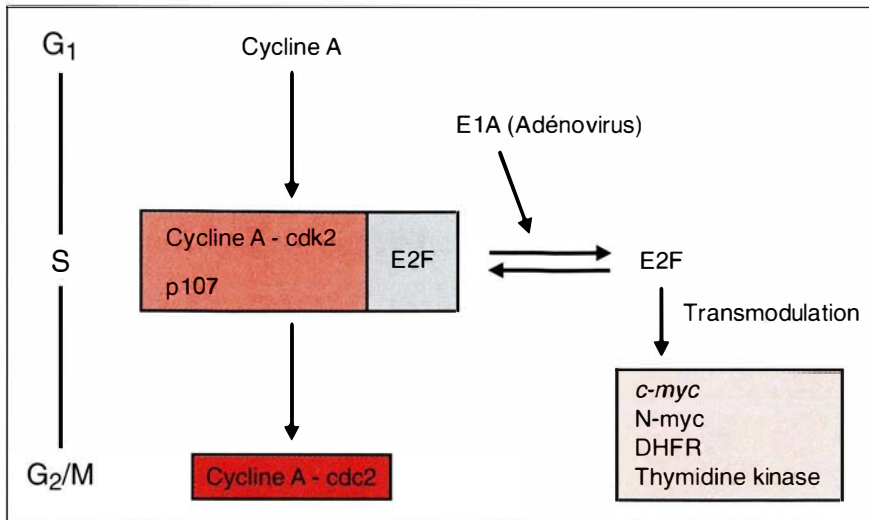


Figure 5. **Cycline A et régulation de la transcription.** Illustration des liaisons de la cycline A avec la cdk2, la p107 et le facteur de transcription E2F, dans la phase S du cycle. Dissociation du complexe par l'oncoprotéine E1A de l'adénovirus.

cycline A pourrait également modifier la fonction de cette protéine régulatrice de la croissance cellulaire.

Cycline A comme marqueur de la prolifération des cellules tumorales in vivo : application en oncologie

Nous avons précédemment cité plusieurs travaux suggérant que l'expression de cycline A est décelable en phases G1/S et jusqu'à la phase M. Nous avons étudié l'expression de la cycline A dans des cellules tumorales en prolifération *in vivo*. Cette étude a été réalisée chez des malades atteints de néoplasies hématologiques de différents types et de cancer primitif du foie. Les taux d'ARN et de protéine ont été déterminés respectivement par les techniques de *slot blot* et *western blot*. Les résultats de cette étude montrent qu'il existe une très forte corrélation entre la quantité d'ARN et protéine de cycline A, et le nombre des cellules en phases S plus G2/M (estimé par cytométrie de flux) [56]. Dans la plupart des tumeurs humaines, le taux des cellules qui rentrent dans un cycle cellulaire est généralement bas. De plus, ces cellules tumorales ont été souvent considérées

comme étant arrêtées en G0. Des études récentes suggèrent, au contraire, que ces cellules sont bloquées à la transition G1/S du cycle. Ainsi, les résultats obtenus indiquent que le taux d'expression de la cycline A devrait donner une bonne estimation du nombre des cellules tumorales qui s'engagent dans une division cellulaire. L'utilisation de la cycline A (détectée sur coupes histologiques) en tant que marqueur de la prolifération cellulaire pourrait donc être complémentaire de celle d'autres marqueurs tels que l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA) et l'antigène Ki67. En effet, l'identification de marqueurs adéquats pour la prolifération cellulaire représente encore un point essentiel en oncologie.

Conclusions

Ces dernières années ont permis une évolution considérable des connaissances sur le cycle cellulaire et les cyclines. Il est frappant de constater la convergence de deux domaines de recherche : le cycle cellulaire et l'oncogénèse. En ce qui concerne les cyclines, les résultats que nous avons rapportés, ainsi que ceux obtenus pour la cycline D1, suggèrent que des modifications de leur expression pourraient intervenir dans certaines étapes de la carcinogénèse. Pour la

cycline D1, en effet, une accumulation des ARN a été décrite dans des tumeurs qui sont dues soit à des translocations chromosomiques, soit à une amplification de la région 11q13, où le gène est localisé. Récemment, une activation *in cis* par insertion d'un provirus du virus de Moloney a été également rapportée. Il est donc probable que, dans l'avenir, la disponibilité de sondes correspondant aux différents éléments du cycle permettra de mettre en évidence d'autres réarrangements dans des tumeurs humaines et d'identifier de nouveaux marqueurs directs de la prolifération tumorale [57-60] ■

Summary

Cyclin A and cancer

Cyclin A is a multifunctional protein. It associates to p34^{cdk2} kinase and is thus involved in the G2/M transition of the cell cycle, it associates also to p33^{cdc2} during the S phase. It has been found in multimeric protein complexes which include the E2F transcription factor, the p33^{cdc2} kinase, and the Rb^{p107} homologue. The modified expression of cyclin A in a human liver cancer, due to the insertion of hepatitis B viral DNA within the cyclin A gene, as well as the binding of cyclin A to the oncogenic E1A viral protein in adenovirus infected cells, might have relevant implications in human carcinogenesis. Cyclin A provides a link between studies directed to the cell cycle machinery and those aiming at elucidating the modulation of cell proliferation and the regulation of gene expression by oncogenes and growth suppressor proteins. In addition, cyclin A might also be considered as a marker for tumor cells proliferation in oncology. In this perspective it will now be of importance to extend these observations to different types of cancer.

TIRÉS A PART

E. Lamas.