

## Un nouveau gène de fusion dans les leucémies aiguës promyélocyaires

La grande majorité des patients atteints de leucémies aiguës promyélocyaires (LAP), hémopathies qui représentent 10 % à 15 % des leucémies non lymphoïdes, présentent une translocation acquise, t(15,17), véritable signature chromosomique de la maladie. Celle-ci entraîne une fusion entre les gènes *PML* (*promyelocytic leukemia*) et *RARA* (récepteur  $\alpha$  de l'acide rétinoïque) [1]. Dans 1 % à 2 % des LAP, dont certaines ont des caractères cytologiques atypiques, le gène *RARA* est fusionné à un autre partenaire: *PLZF* (*promyelocytic leukemia zinc finger*) dans la translocation t(11;17); *NPM* (*nucleophosmin*); *NuMA* (*nuclear mitotic apparatus protein*). Ces quatre partenaires de *RARA* n'ont pas de structure commune, mais possèdent tous un domaine amino-terminal d'interaction protéine-protéine et un domaine d'homodimérisation [2]. Le point de cassure est dans l'intron 2 (ou exceptionnellement dans l'exon 3) du gène *RARA*, et la protéine hybride X-*RARA* est toujours fortement exprimée dans les LAP, qu'elles soient typiques ou non, alors que l'expression du transcrit réciproque *RARA-X* est variable.

Les protéines oncogéniques X-*RARA* (surtout *PML-RARA* et *PLZF-RARA*) forment des dimères avec les récepteurs *RARA* et *RXR* (*retinoid X receptor*) normaux et se comportent comme des récepteurs dominants négatifs. Ainsi, dans les LAP associées à la fusion *PML-RARA*, *PML* est séquestrée par les hétérodimères *PML/PML-RARA*, et les corps nucléaires, contenant normalement la protéine *PML*, sont désorganisés, ce qui peut contribuer à accroître la survie des blastes bloqués au stade

promyélocyte, *PML* étant impliquée dans l'apoptose [3, 4]. *RARA* fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires qui s'hétérodimérisent avec *RXR* et se fixent sur des éléments de réponse aux rétinoïdes (*RARE*), formant ainsi une unité transcriptionnelle inductible par les rétinoïdes (*AR*) dont l'activité est modulée par des co-facteurs transcriptionnels [5, 6]. En l'absence de ligand, l'hétérodimère *RARA-RXR* recrute des co-répresseurs (*SMRT* ou *NCoR*, *mSin3* et une histone désacétylase), l'interaction entre le dimère *RARA-RXR* et le complexe co-répresseur s'effectuant au niveau de la boîte N-*CoR* située dans la partie centrale des récepteurs nucléaires (figure 1) [7]. La désacétylation localisée des histones entraîne la compaction de la chromatine et donc la répression transcriptionnelle des gènes contrôlés par les acides rétinoïques (*AR*). La présence d'*AR* à des concentrations physiologiques ( $10^{-9}$  M) induit la dissociation du complexe et favorise l'association de *RARA-RXR* avec des co-activateurs (tels que *CBP/p300*) possédant une activité acétyltransférase. Il en résulte une décompaction de la chromatine favorable à l'expression des gènes impliqués dans la différenciation de la lignée granulocytaire. Des études récentes ont démontré que les oncoprotéines *PML-RARA* et *PLZF-RARA* interagissent de façon anormale avec les co-répresseurs de la transcription [2]. Cette interaction est stable à des concentrations physiologiques d'*AR* et il en résulte un blocage de la différenciation de la lignée myéloïde. Le complexe entre les co-répresseurs et la protéine *PML-RARA* est déstabilisé à des doses

pharmacologiques d'*AR* ( $10^{-6}$  M), ce qui explique la différenciation induite par l'*ATRA* (acide rétinoïque tout-*trans*) dans la vaste majorité des LAP. En effet, un aspect remarquable des LAP associées à *PML-RARA*, *NPM-RARA* et *NuMA-RARA* est la rémission complète qu'entraîne l'administration de concentrations supra-physiologiques ( $10^{-6}$  M) d'*ATRA*. A l'inverse, l'interaction entre *PLZF-RARA* et les co-répresseurs est insensible à l'*ATRA*. En fait, *PLZF* possède un domaine de liaison avec les co-répresseurs (domaine *BTB/POZ*) situé dans sa partie amino-terminale, le complexe formé entre *BTB/POZ* et les co-répresseurs n'est pas déstabilisé en présence de rétinoïdes, et ce même à des concentrations supraphysiologiques [2]. *PLZF-RARA* entraîne donc une répression constitutive des gènes contrôlés par les *AR*.

### STAT5b est fusionné à RARA dans un cas de LAP atypique

Nous avons récemment identifié, chez un patient atteint de LAP atypique, insensible à l'action de l'acide rétinoïque tout-*trans*, une nouvelle fusion de *RARA* avec un gène partenaire original codant pour le facteur de transcription *STAT5b* (*signal transducer and activator of transcription*) [8]. D'un point de vue chromosomique, le gène de fusion *STAT5b-RARA* dérive d'une délétion interstitielle de la région 17q21.1-q21.2 survenue à la suite d'une recombinaison illégitime intramoléculaire (les gènes *STAT5b* et *RARA* ne sont distants que de quelques Mb sur le chromosome 17). *STAT5b* est un facteur de transcription présent dans le cytoplasme sous

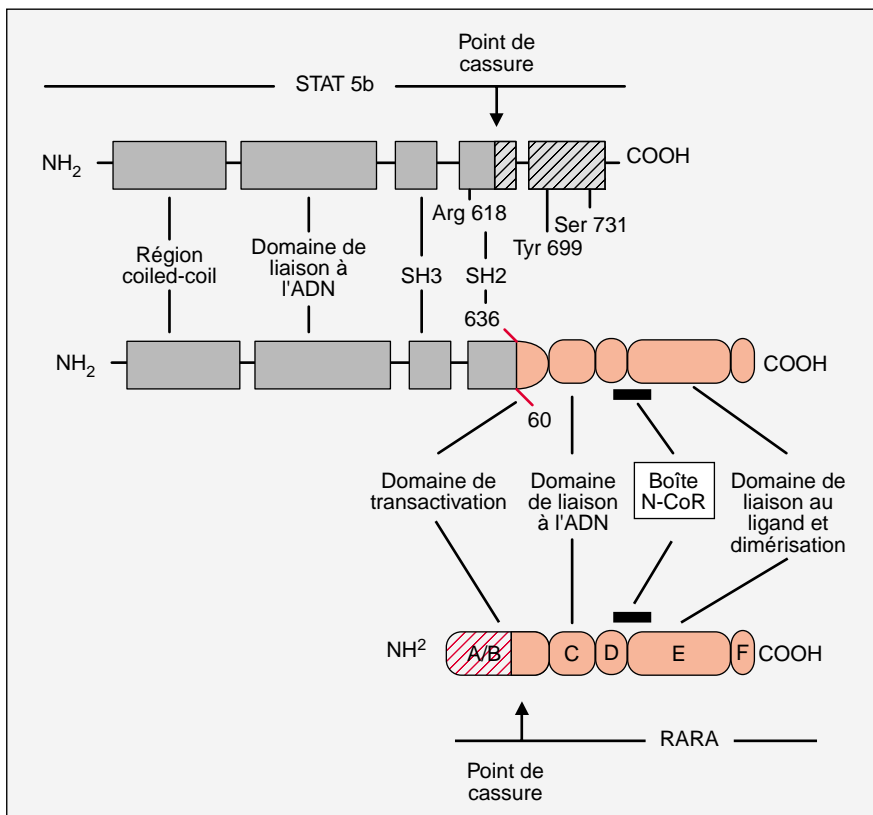


Figure 1. **Anatomie de la protéine hybride STAT5b/RARA.** L'oncoprotéine STAT5b/RARA est longue de 1038 acides aminés, elle contient la quasi-totalité des domaines fonctionnels de RARA à l'exception du domaine de transactivation A/B qui est tronqué; le point de cassure est classiquement situé dans l'intron 2 du gène codant pour le récepteur aux rétinoïdes. Comme les autres partenaires de RARA au cours de LAP typiques ou atypiques, STAT5b contient un domaine d'interaction protéine-protéine (coiled-coil, entre les acides aminés 232 et 321) et un domaine de dimérisation, tous deux présents au sein de la protéine de fusion. Le domaine de liaison à l'ADN ainsi que le domaine SH3 (Src homology 3) sont également présents au sein de la protéine hybride. Le point de fusion se situe dans le domaine SH2, la région carboxy-terminale, contenant les résidus tyrosine 699 (essentielle au processus d'activation) et sérine 731 (intervenant dans la modulation de l'activité du facteur de transcription), est donc absente. À l'inverse, l'arginine en position 618, intervenant dans le processus de dimérisation, est présente; il est donc envisageable, comme cela a déjà été décrit pour STAT1 et STAT2, que la protéine de fusion s'hétérodimérise avec des facteurs STAT normaux par le biais d'une seule interaction SH2-Tyr phosphorylée.

forme de monomère inactif, et qui, en réponse à la liaison d'un facteur de croissance exogène sur son récepteur, est phosphorylé par les Janus kinases (JAK) sur une tyrosine située dans la partie carboxy-terminale des STAT [9]. L'activation induit la dimérisation de deux monomères STAT, et leur migration dans le noyau où ils modulent la transcription de gènes cibles. STAT5b a été

initialement identifié dans le tissu mammaire [10] et, depuis, la réalisation de l'inactivation des gènes STAT5A et STAT5B a permis de préciser leur fonction dans l'hématopoïèse [11]. Des études d'immunocytochimie sur les blastes de la moelle osseuse du patient nous ont permis de localiser la protéine hybride majoritairement dans le noyau où elle pourrait être

en mesure d'interférer avec les voies des rétinoïdes mais également avec les voies JAK-STAT (STAT5 et STAT3). De plus, la protéine STAT5b-RARA est présente en faible quantité dans le cytoplasme, où elle pourrait affecter les premières étapes de la transduction du signal par la voie JAK-STAT.

L'oncoprotéine STAT5b-RARA (1038 acides aminés), produit du gène hybride, fusionne un récepteur RARA délété d'un de ses domaines d'activation, et un facteur STAT5b qui a perdu son extrémité carboxy-terminale, critique pour l'activation par les JAK (figure 1). Cette fusion STAT5b-RARA est doublement intéressante: (1) elle identifie un nouveau partenaire de RARA, et (2) elle représente le premier remaniement de structure connu d'un gène de la famille STAT dans un processus néoplasique. Reste à comprendre son implication dans le processus leucémique. A ce jour, la responsabilité des membres de la famille STAT dans certains processus malins se fonde sur des arguments indirects, soit une dérégulation de leur activité, soit une activité constitutive associée à l'expression de certains oncogènes [12]. Par exemple, la protéine de fusion Tel/JAK2, identifiée dans les blastes d'un enfant atteint de leucémie lymphoblastique T avec une translocation t(9;12) (p24;p13) phosphoryle et active STAT 1, 3 et 5 [13].

### STAT5b et PLZF: un modèle commun de résistance à la thérapie par différenciation dans les LAP atypiques

Notre patient était résistant à l'action de l'ATRA comme c'est le cas pour les patients porteurs de la translocation t(11;17) fusionnant PLZF et RARA. Le domaine d'interaction protéine-protéine dans la partie amino-terminale des protéines STAT est conservé dans la protéine hybride (figure 1), et pourrait, comme c'est le cas du domaine BTB/POZ de PLZF, s'associer avec un complexe répresseur, et ce même en présence de fortes concentrations d'ATRA. STAT5 est aussi capable de s'associer avec CBP/p300, un co-activateur de la transcription qui est recruté par

RARA-RXR en présence d'AR. Il est donc possible que la protéine hybride, si elle se lie à CBP/p300, puisse interférer avec l'action de ces co-activateurs, il est aussi possible que, dans la protéine hybride, la partie STAT5b crée un encombrement stérique gênant l'accessibilité de l'ATRA.

Des études de transfection de la protéine hybride STAT5b/RARA *in vitro* mais également *in vivo* permettront d'appréhender les propriétés biochimiques et biologiques de cette oncoprotéine et d'évaluer les perturbations qu'elle entraîne tant sur les voies JAK/STAT que sur les voies de signalisation faisant intervenir les récepteurs nucléaires.

1. Lavau C, Jansen J, Weis K, Lamond A, Dejean A. Leucémie aiguë promyélocytaire et acide rétinolique : le paradoxe. *Med Sci* 1994; 10: 817-24.
2. Lin RJ, Egan DA, Evans RM. Molecular genetics of acute promyelocytic leukemia. *Trends Genet* 1999; 15: 179-84.
3. Quignon F, De Bels F, Koken M, Feunteun J,

Ameisen JC, de Thé H. PML induces a novel caspase-independent death process. *Nat Genet* 1998; 20: 259-65.

4. Wang ZG, Ruggero D, Ronchetti S, *et al.* Pml is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet* 1998; 20: 266-72.

5. Gelman L, Staels B, Auwerx J. Rôle des co-facteurs transcriptionnels dans la transduction des signaux hormonaux par les récepteurs nucléaires. *Med Sci* 1997; 13: 961-70.

6. Taddei A, Almouzni G. Les acétyl-transférases et les désacétylases des histones: des co-régulateurs de la transcription. *Med Sci* 1997 13: 1205-9.

7. Dhordain P, Albagli O. SMRT est un co-répresseur commun aux récepteurs nucléaires et aux protéines oncogéniques à domaine POZ, LAZ3 et PLZF. *Med Sci* 1998; 14: 219-22.

8. Arnould C, Philippe C, Bourdon V, Grégoire M, Berger R, Jonveaux P. The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor  $\alpha$  in acute promyelocytic-like leukemia. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1741-9.

9. Vignais ML. Protéines JAK et STAT dans la transmission du signal cellulaire. *Med Sci* 1997; 13: 1277-84.

10. Wakao H, Gouilleux F, Groner B. Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *EMBO J* 1994; 13: 182-91.

11. Morrigl R, Topham D, Teglund S, *et al.* Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity* 1999; 10: 249-59.

12. Frank D. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of cancer. *Mol Med* 1999; 5: 432-56.

13. Lacronique V, Boureux A, Valle VD, *et al.* A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* 1997; 278: 1309-12.

**Christophe Philippe**  
**Cécile Arnould**  
**Violaine Bourdon**  
**Marie-José Grégoire**  
**Philippe Jonveaux**

Laboratoire de génétique, UPRES UA 952, CHRU, rue du Morvan, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

**Roland Berger**

Inserm U. 434, SD 401 N° 434 Cnrs, CEPH, 27, rue Juliette-Dodu, 75010 Paris, France.



## 26<sup>e</sup> SYMPOSIUM EUROPÉEN DES PEPTIDES

**Montpellier, France**  
**10-15 septembre 2000**

- Le 26<sup>e</sup> Symposium Européen des Peptides (26<sup>th</sup> EPS) aura lieu à Montpellier, France du 10 au 15 septembre 2000. C'est un événement biennal, qui regroupe plus d'un millier de personnes et qui est le congrès de référence dans le monde du **Peptide** (le dernier symposium, qui s'est déroulé en France, a été organisé par le Professeur Bricas en 1968). Il est organisé sous les auspices de la Société Européenne des Peptides (EPS) et, cette année, du Groupe Français des Peptides et Protéines (GFPP). L'organisateur, le Professeur Jean Martinez, vous attend à Montpellier.
- Un présymposium sur le suivi analytique des réactions organiques sur support solide aura lieu le samedi 9 septembre 2000 et est organisé par le Professeur Jean-Louis Aubagnac.
- Consultez notre site web pour toute information et inscription.

Site web : <http://ww2.pharma.univ.montp1.fr/26-EPS>

Date limite d'inscription : 1<sup>er</sup> mars 2000