

P16, p21^{WAF1/CIP1}, p27^{Kip1} et p53 : rivaless ou compagnes ?

Un gigantesque casse-tête, au nombre de pièces inconnu et sans original : ainsi pourrait être symbolisé le cycle cellulaire dont de nouveaux éléments régulateurs émergent continuellement de voies de recherche diverses, les unes directement consacrées à la prolifération cellulaire, et d'autres à une grande variété de domaines de la biologie.

La clé de la régulation du cycle cellulaire et des éléments qui le contrôlent est la phosphorylation et la déphosphorylation de toute une série de protéines régulatrices, incluant les kinases elles-mêmes. Ces phosphorylations sont effectuées par des kinases regroupées sous le terme de kinases dépendantes des cyclines (Cdk). En effet, ces kinases sont inactives en elles-mêmes et doivent être associées à une sous-unité régulatrice, la cycline, pour être activées. La multiplicité de ces cyclines (au moins huit cyclines ont été identifiées à l'heure actuelle) et le nombre aussi important de kinases Cdk (au moins cinq) peuvent engendrer un grand nombre de combinaisons cycline/Cdk avec, pour chaque complexe, un rôle bien défini dans la régulation temporelle du cycle cellulaire [1]. L'originalité de ce mode de régulation vient de l'observation que chaque cycline n'est synthétisée qu'à une période bien précise du cycle cellulaire et ne s'associe qu'à une série définie de kinases Cdk [2] (figure 1).

Un nouveau mode de régulation de ces activités kinase a été dévoilé après l'identification de facteurs de

régulation pouvant se fixer sur les complexes cyclines-Cdk et inhiber leur activité kinasique. Le premier facteur découvert a été le produit du gène *WAF1/CIP1*, simultanément cloné et identifié par plusieurs équipes [3]. L'équipe de Vogelstein a caractérisé *WAF1* comme l'un des gènes cibles activés par la protéine p53 [4]. L'activité anti-proliférative de la protéine p53 au niveau de la transition G1/S peut ainsi être expliquée par son activation de la transcription du gène *WAF1* qui code pour une protéine de 21 kDa (p21), inhibitrice de l'activité des complexes cycline/Cdk. Cette protéine p21 a aussi été identifiée par l'équipe de Elledge comme une protéine capable de s'associer spécifiquement à la kinase Cdk2 [5]. Néanmoins, l'ensemble de ces travaux, effectués *in vitro*, n'apportaient aucune preuve directe de la relation entre p53, p21^{WAF1/CIP1} et cycle cellulaire. C'est maintenant chose faite, avec les travaux de l'équipe de Reed [6]. L'introduction de lésions au niveau de l'ADN induit une stabilisation de la protéine p53 qui bloque la division cellulaire au niveau de la transition G1/S (*m/s* n° 9, vol. 8, p. 1002). Reed *et al.* ont montré que l'irradiation de fibroblastes humains induisait un arrêt de la division cellulaire, concomitante d'une perte d'activité du complexe Cdk2-cycline E. Le taux d'expression de ces deux protéines et leur association ne sont pas affectés par le traitement. En utilisant des anticorps spécifiques de la p21^{WAF1/CIP1}, ils ont

montré que l'expression de cette protéine est responsable de la perte d'activité du complexe Cdk2-cycline E.

Une protéine impliquée dans la régulation de l'activité cycline-Cdk vient aussi d'être mise en évidence par les équipes de Sherr et Koff [7]. Ces équipes ont recherché le mécanisme responsable du blocage de la division cellulaire après traitement des cellules par le TGF- β , ou lorsqu'elles sont en inhibition de contact. Ils ont identifié une protéine, p27^{Kip1}, qui inhibe spécifiquement l'activité kinase du complexe Cdk2-cycline E. Après microséquençage, ils ont montré que cette protéine est différente de p21^{WAF1/CIP1} ou de la p16 (*voir plus loin*). Ce résultat est important, car il prouve que plusieurs inhibiteurs peuvent moduler l'activité d'un complexe Cdk-cycline en fonction du signal de départ.

Une autre série de travaux, publiés dans *Science*, vient d'apporter une grande contribution à l'association entre cycle cellulaire et cancer [8]. Depuis plusieurs années, l'équipe de Skolnick (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT, USA) s'intéressait au gène impliqué dans le mélanome familial. En 1992, ce groupe avait rapporté des éléments suggérant que le segment p21 du chromosome 9 pouvait porter le gène de susceptibilité recherché. Cette région avait déjà été l'objet d'attentions particulières car elle semblait altérée dans un grand nombre de cancers. Dans la majorité des cas, des délétions

étaient observées, suggérant l'existence d'un gène suppresseur de tumeur dans cette région. L'analyse de cent lignées cellulaires de patients atteints de mélanome a permis de mieux définir la plus petite région commune à toutes ces délétions. Les auteurs eurent la chance de trouver une région relativement petite, comprise dans un seul cosmide de 45 kb. Le séquençage de plusieurs régions de ce cosmide a permis de mettre en évidence deux gènes, nommés *MTS1* et *MTS2*

(*MTS* pour *multiple tumor suppressor*). La comparaison de *MTS1* avec les séquences publiées par Genbank montra que *MTS1* est semblable à 100 % au gène codant pour la protéine p16. Cette protéine avait été identifiée en 1993 par l'équipe de Beach comme régulateur négatif de la division cellulaire [9]. La protéine p16 se fixe spécifiquement sur le complexe Cdk4-cycline D et inhibe l'activité kinase de ce complexe, un mécanisme absolument identique à celui de la p21^{WAF1/CIP1}. L'analyse

de plusieurs centaines de tumeurs cancéreuses d'origines différentes a montré que la délétion du gène *MTS1* n'est pas spécifique du mélanome, mais qu'elle est retrouvée dans la plupart des cancers humains. Les auteurs ont mis à jour des altérations de ce gène dans 80 % des astrocytomes, 60 % des cancers du sein et des ostéosarcomes, 56 % des carcinomes rénaux ou 25 % des leucémies. Seuls les cancers colorectaux et les neuroblastomes semblaient épargnés. La majorité de ces études a été faite par *Southern blot*, des remaniements mineurs pouvaient donc passer inaperçus. L'analyse de lignées cellulaires de mélanomes a montré que des mutations ponctuelles pouvaient aussi inactiver le gène *MTS1*. Le gène *MTS2*, qui est à proximité de *MTS1*, est aussi très proche du gène codant pour la p16 mais possède une partie 5' différente; le rôle de *MTS2* reste encore à préciser. Ces résultats ont été confirmés par des travaux publiés une semaine plus tard dans *Nature* par Nobori *et al.* (La Jolla, CA, USA) [10].

L'ensemble de ces études jette une nouvelle lumière sur les relations entre cycle cellulaire et cancer. Plusieurs questions passionnantes restent posées. La découverte que le gène *p16* est directement la cible d'altérations dans des tumeurs humaines suggère que le gène *WAF1/CIP1* pourrait être, lui aussi, la cible potentielle d'altérations génétiques. Par ailleurs, la similitude des processus d'inhibition du cycle cellulaire par les protéines p21^{WAF1/CIP1} et p16 suggère qu'il puisse y avoir redondance entre ces mécanismes. La protéine p53 est altérée dans 50 % des cancers humains, tous types confondus. On se demande généralement pourquoi cette altération est aussi fréquente; mais la question pourrait être posée autrement: pourquoi la moitié des cancers n'a-t-elle pas cette altération? Les travaux de Skolnick *et al.* montrent que, sur 290 tumeurs ou lignées cellulaires, le gène p16 est altéré dans 46 % des cas; ne

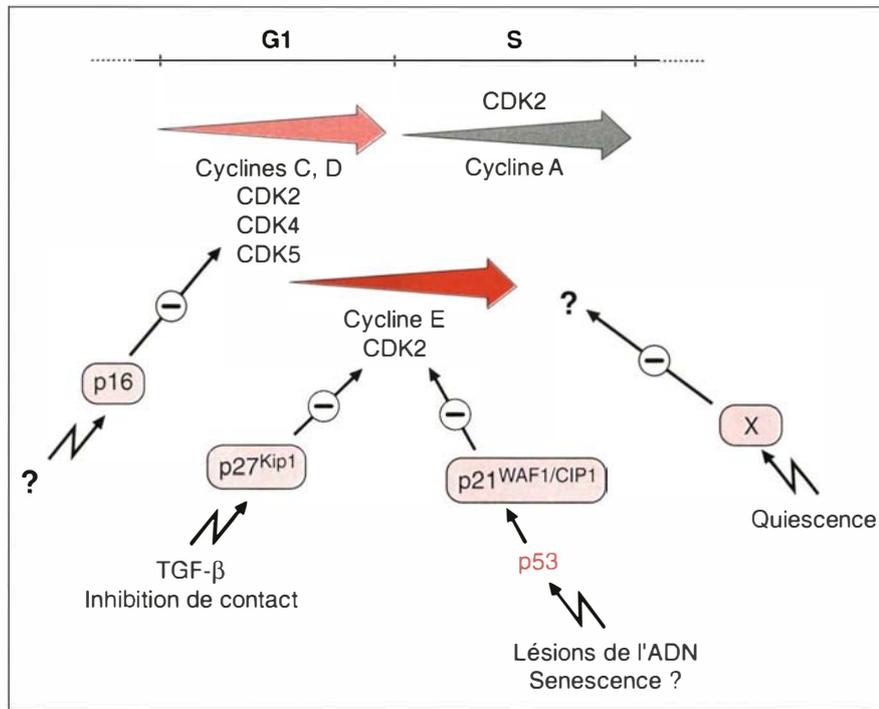


Figure 1. **Cycle cellulaire et éléments de régulation.** Pour plus de clarté, seules les phases G1 et S du cycle ont été représentées, bien que des complexes cyclines-Cdk soient aussi impliqués dans les autres phases. Pour l'instant, aucun inhibiteur n'a été mis en évidence au niveau des autres étapes du cycle cellulaire. Les flèches épaisses correspondent à l'expression quantitative et temporelle des cyclines. Le blocage de la division cellulaire après traitement par TGF- β ou inhibition de contact semble dû à l'action de la protéine p27^{Kip1} qui inhibe spécifiquement l'activité kinase du complexe Cdk2-cycline E. p21^{WAF1/CIP1}, dont la transcription est activée par la protéine p53, inhibe le même complexe Cdk2-cycline E. Plusieurs inhibiteurs peuvent donc moduler l'activité d'un complexe Cdk-cycline en fonction du signal de départ. La protéine p16, identifiée tout récemment dans des lignées cellulaires de patients atteints de mélanome, se fixe spécifiquement sur le complexe Cdk4-cycline D et inhibe l'activité kinase de ce complexe, indispensable au passage de la phase G1 à la phase S.

s'agirait-il pas des 50 % des cancers sans altération du gène p53 ? Dans l'affirmative, on pourrait vraiment affirmer que le cycle cellulaire est la cible obligatoire des phénomènes de transformation néoplasique. En opposition avec l'éditorial de *Science* [11], qui voyait dans la protéine p16 la nouvelle rivale de la protéine p53, on pourrait faire l'hypothèse que ces deux protéines sont deux compagnes sur lesquelles nous devons concentrer nos études afin de développer de nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques.

T.S.

1. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993; 73: 1059-65.
2. Le Peuch C. La régulation de la division cellulaire. *médecine/sciences* 1990; 6: 10-7.
3. Kahn A. Cycle cellulaire, cancer, sénescence et p53. *médecine/sciences* 1994; 10: 206-7.
4. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer E, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-25.
5. 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.
6. 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.
7. Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. p27(kip1), a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994; 8: 9-22.
8. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day III RS, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumors types. *Science* 1994; 264: 436-40.
9. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regularity motif in cell control casing specific inhibition of cyclin D/CDK. *Nature* 1993; 366: 704-7.
10. 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.
11. Marx J. New tumor suppressor may rival p53. *Science* 1994; 264: 344-5.

■■■ **Mécanisme transcriptionnel de la régulation par les stérols.** Le cholestérol et d'autres stérols sont capables d'inhiber la transcription des gènes codant pour le récepteur des LDL (*low density lipoproteins*) et de l'HMG CoA synthétase, une enzyme clef de la synthèse endogène des stérols. Les éléments de réponse situés dans les promoteurs de ces gènes et conférant l'activation transcriptionnelle dans les cellules déplétées en stérols ont une séquence de type TCACCCCAC, dénommée SRE (*sterol response element*). L'équipe des deux prix Nobel, Michael S. Brown et Joseph L. Goldstein (Dallas, TX, USA), responsable de l'essentiel des progrès réalisés dans le domaine du métabolisme des stérols, a cloné les ADNc pour deux facteurs capables de se fixer aux SRE dénommés SRE BP-1 et SRE BP-2 (*SRE binding protein 1 and 2*). Les ADNc ont le potentiel de coder pour des protéines d'environ 125 kDa. SREBP-1 est une protéine intégrale des membranes situées à l'extérieur des noyaux et du réticulum endoplasmique. Une protéolyse clive une protéine de 68 kDa correspondant à l'extrémité aminotermine de ce précurseur, portant un domaine de liaison à l'ADN de type HLH (*helix-loop-helix*) qui se localise dans le noyau et, très probablement, se fixe aux SRE et active la transcription des gènes du récepteur des LDL et de l'HMG CoA synthétase. Les stérols inhibent le clivage des précurseurs, et par conséquent la production par protéolyse de l'activateur de 68 kDa. La durée de vie de cet activateur semble brève car il est très sensible à la dégradation par des protéases neutres à cystéine encore non caractérisées. Un inhibiteur de ce type de protéases prolonge d'ailleurs la demie-vie de l'activateur et aboutit à une activation très importante des deux gènes contrôlés par les stérols [1]. Ces nouveaux résultats de l'équipe remarquablement féconde de Brown et Goldstein aboutissent à des observations très originales. Tout d'abord, le motif HLH de

l'activateur de 68 kDa ne reconnaît pas les séquences auxquelles se lie habituellement les protéines de cette famille, à laquelle appartiennent les facteurs de différenciation myogénique de type Myo D et l'oncogène *Myc*, c'est-à-dire l'hexamère CCNNTG. La régulation de la transcription par la séquestration d'un activateur transcriptionnel dans le cytoplasme est, en revanche, maintenant illustrée par de nombreux exemples [2] dont le système NFκB a été l'un des premiers [3]. Cependant, dans ces cas, l'inducteur transcriptionnel provoque la translocation de l'activateur dans le noyau alors qu'ici les stérols, inhibiteurs transcriptionnels, agissent en inhibant cette translocation.

- [1. Wang X, *et al.* *Cell* 1994; 77: 53-62.]
- [2. Piechaczyk M, Roux P. *médecine/sciences* 1990; 6: 803-6.]
- [3. Israël A. *médecine/sciences* 1991; 7: 67-9.]

■■■ **Protéinose alvéolaire congénitale et déficit en apoprotéine B du surfactant.** Le surfactant est un mélange complexe de lipides et de protéines spécifiques qui réduit la tension de surface des alvéoles pulmonaires, permettant une bonne expansion de celles-ci à la naissance. L'immaturité pulmonaire des prématurés est associée à une diminution de la production de surfactant, cause du syndrome des membranes hyalines [1]. La protéinose alvéolaire congénitale est une maladie pulmonaire toujours fatale qui est caractérisée par une détresse respiratoire des nouveau-nés avec, à l'examen histologique des poumons, une accumulation dans les alvéoles et dans les voies respiratoires distales d'un matériel granuleux, éosinophile et positif pour la coloration au PAS. Récemment, plusieurs observations de cette maladie ont rapporté un déficit d'apoprotéine B (SP-B) du surfactant. Cependant, d'autres anomalies des apoprotéines A et C étaient également observées, si

bien que l'hypothèse d'un déficit secondaire était plausible. Nogee *et al.*, de Saint-Louis (MO, USA) [2], viennent maintenant de démontrer que la protéinose alvéolaire congénitale observée dans plusieurs familles était associée à une mutation du gène *SP-B*. La fréquence réelle de la maladie et de cette mutation n'est pas connue, mais pourrait avoir été sous-estimée, de nombreux syndromes de détresse respiratoire néonatale ne recevant pas de diagnostic précis. Dans l'étude rapportée ici, la même mutation a été trouvée dans sept familles parmi les huit familles non reliées examinées, indiquant qu'un allèle morbide prédominant est en cause dans cette affection. Une telle observation est évidemment de nature à faciliter un diagnostic génétique des hétérozygotes et, dans la période prénatale, des fœtus atteints.

[1. Zupan V, *et al. médecine/sciences* 1993; 9: 277-88.]

[2. Nogee LM. *J Clin Invest* 1994; 93: 1860-3.]

■■■ **Syndrome de l'X fragile et activité de liaison à l'ARN.** Le syndrome de l'X fragile est très généralement associé à une amplification de triplets CGG dans la région 5' non traduite du gène *FMR1*, ce qui aboutit à une perte de l'expression de ce gène ([1] et *m/s* n° 4, vol. 10, p. 472). Cependant, une forme sévère de la maladie a été trouvée associée à une mutation ponctuelle transformant l'isoleucine 304 en asparagine [2]. Cette mutation siège dans l'un des deux domaines KH de la protéine *FMR1*. Les domaines KH, initialement décrits dans une protéine se liant aux *hnRNP* (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*), semblent caractériser des sites de fixation à l'ARN. De fait, Siomi *et al.* (Philadelphie, PA, USA) [3] démontrent maintenant que de tels domaines KH sont indispensables à la liaison à l'ARN. En particulier, la mutation Ile-304 → Asn des malades atteints du syndrome de l'X fragile avec retard mental altère grave-

ment la liaison de *FMR1* à l'ARN. Ces résultats suggèrent que les signes cliniques du syndrome de l'X fragile pourraient être reliés à l'absence d'une activité de liaison à l'ARN, et pourraient donc être dus à une perturbation d'une réaction de modification de l'ARN.

[1. Rousseau, *et al. médecine/sciences* 1991; 7: 637-9.]

[2. De Boule K, *et al. Nature Genet* 1993; 3: 31-5.]

[3. Siomi H, *et al. Cell* 1994; 77: 33-9.]

■■■ **Rôle physiologique de l'hormone hypercalcémianté paranéoplasique dans le développement du squelette.** Certains syndromes paranéoplasiques avec hypercalcémie, notamment observés chez des malades souffrant de cancer du poumon, sont liés à la sécrétion d'une protéine dénommée *PTHrP* (*parathyroid hormone related peptide*). La PTH parathyroïdienne et le *PTHrP* ont en commun leur région amino-terminale de 34 acides aminés qui interagit avec le récepteur commun de ces deux hormones. Le *PTHrP* n'est pas synthétisé que par les tissus cancéreux, mais aussi, à un faible niveau, par différents tissus adultes et fœtaux. Afin d'analyser le rôle physiologique de cette hormone *PTHrP* au cours du développement, Karaplis *et al.* (de Munich, Allemagne, Boston et Cambridge, USA) [1] ont invalidé le gène codant pour le *PTHrT* par recombinaison homologue dans des cellules ES de souris. La mutation insertionnelle homozygote entraîne une létalité périnatale, probablement par asphyxie, en rapport avec de très importantes anomalies du développement squelettique liées à une diminution de la prolifération des chondrocytes dont la maturation est accélérée, associée à une hypertrophie et à une formation exagérée de tissu osseux. Le *PTHrP* pourrait donc être nécessaire à la prolifération des chondrocytes et, directement ou indirectement, inhiber la différenciation précoce des ostéoblastes. Différents syndromes carac-

térisés par une dysplasie squelettique ont été décrits chez les souris et les humains; le gène codant pour le *PTHrP* s'avère clairement un candidat pour certaines de ces affections.

[1. Karaplis AC, *et al. Genes Dev* 1994; 8: 277-89.]

■■■ **Anomalies immunitaires des souris sans chaîne γ des récepteurs Fc des Ig.** Les récepteurs de forte affinité des IgE (*Fc ϵ R1*) et de faible affinité des IgG (*Fc γ RIII*) ont une chaîne γ en commun qui est indispensable à l'assemblage des complexes, leur expression de surface et la transmission intracellulaire de signaux. Elle est aussi associée au récepteur de forte affinité des IgG (*Fc γ R1*) et au complexe CD3-récepteur de l'antigène des lymphocytes T. Dans les cellules NK (*natural killer*), elle forme des hétérodimères avec une chaîne ζ qui lui est homologue. Les souris rendues déficientes en chaîne γ présentent des anomalies immunitaires plus larges encore que celles que l'on pouvait prévoir. Les macrophages de ces souris ne sont plus capables de phagocyter les globules rouges de mouton recouverts d'IgG. L'absence de fixation des IgG2a correspond à la disparition de leur récepteur de forte affinité, *Fc γ R1*. En revanche, les IgG1 et IgG2b se fixent toujours sur le récepteur *Fc γ R2* (un récepteur de basse affinité des IgG) mais celui-ci n'est plus internalisé. Cela est d'autant plus surprenant que rien ne laissait supposer que la chaîne γ était couplée avec *Fc γ R2*. Les cellules NK des souris mutantes gardent leur activité cytotoxique naturelle mais ne développent pas de cytotoxicité dépendante des anticorps à cause de la perte du *Fc γ R3*. L'activation des mastocytes et l'anaphylaxie habituellement provoquées par les IgE sont inexistantes chez les souris γ^- , certainement en raison de la disparition du *Fc ϵ R1* car les souris uniquement déficientes pour ce récepteur se comportent de manière identique

(*m/s n° 3, vol. 10, p. 376*). Au contraire de son homologue ζ , la chaîne γ n'est pas essentielle au développement des lymphocytes T qui semble s'effectuer normalement. Une étude plus fine des populations lymphocytaires T et de leur fonction mériterait cependant d'être réalisée. [Takai T, *et al. Cell* 1994; 76: 519-29.]

■■■ **Le gène de la paralysie périodique hypokaliémique est localisé sur le bras long du chromosome 1.** Les relations entre les troubles du tonus musculaire et des anomalies de canaux ioniques sont de mieux en mieux connues. On a d'abord identifié un gène responsable de la paralysie périodique hyperkaliémique (HYPP), maladie autosomique dominante, sur le bras long du chromosome 17 (*m/s n° 1, vol. 7, p. 79 et n° 1, vol. 8, p. 41*, chez l'homme, puis chez le cheval de course (*n° 10, vol. 8, p. 1121*); le support moléculaire en est la sous-unité α d'un canal sodium. On a montré ensuite (*n° 8, vol. 8, p. 872 et n° 6-7, vol. 9, p. 805*) que la myotonie congénitale, tant dans sa forme dominante que dans sa forme récessive, est due à l'anomalie d'un canal chlore dont le gène réside sur le bras long du chromosome 7. Restait la

paralysie périodique hypokaliémique (HypoPP), affection dominante autosomique, marquée par des épisodes de faiblesse durant quelques heures ou quelques jours. Une équipe parisienne, avec des chercheurs portugais et allemands, a localisé à partir de trois familles le gène sur le chromosome 1 en 1q31-32 [1]. Les auteurs ont pu individualiser un gène candidat, codant pour la sous-unité α 1 du canal calcium sensible aux dihydropyridines, dit *CACNLIA3*. Le locus de ce dernier est très voisin du locus *HypoPP* [2], et dans deux familles informatives on ne trouvait aucun recombinant. Ce même gène *CACNLIA3* a été décrit comme responsable de la mutation *muscular dysgenesis* de la souris [3]. [1. Fontaine B, *et al. Nature Genet* 1994; 6: 267-72.] [2. Gregg RG, *et al Genomics* 1993; 15: 107.] [3. Chaudari N. *J Biol Chem* 1992; 267: 25636-9.]

■■■ **La souris qui synthétise des anticorps humains.** La firme californienne GenPharm International (Mountain View) vient de produire des souris synthétisant des anticorps humains. Dans un premier temps, ont été créées des souris transgéniques avec un mini-locus des gènes de

chaîne lourde (4 segments fonctionnels V, 15 segments D, 6 segments J, les exons codant pour les parties constantes M et G1 avec leurs régions de commutation respectives et le *enhancer* intronique J_m ; en outre, le *enhancer* situé en 3' du locus « chaîne lourde » de rat a été ajouté à la construction) et un mini-locus des chaînes légères K (40 kb contenant 4 segments fonctionnels VK, 5 segments J, l'exon CK et les *enhancers* correspondants intronique et aval). Ces deux transgènes ont alors été intégrés par croisement dans le génome de souris transgéniques dont les gènes codant pour les chaînes lourdes et les chaînes légères K ont été invalidés par recombinaison homologue. Les animaux ainsi obtenus synthétisent des immunoglobulines humaines de type IgMK ou IgG1K. Ces animaux peuvent être immunisés et synthétiser des anticorps humains. A partir de souris immunisées contre le CD4 humain, des anticorps monoclonaux anti-CD4, de bonne affinité, ont été obtenus [1]. Ces remarquables résultats ouvrent la voie, pour la première fois, à la production d'anticorps monoclonaux humains qui pourraient être d'utilisation large en thérapeutique. [1. Lonberg N, *et al. Nature* 1994; 368: 856-9]