

L'inactivation du gène *MTS1* (p16^{INK4a}, *CDKN2*) est une anomalie génétique commune à la majorité des leucémies aiguës lymphoblastiques de la lignée T

Jusqu'à une date toute récente, les stratégies de cytogénétique et de biologie moléculaire n'avaient pu caractériser d'anomalie génétique acquise commune à la majorité des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) de phénotype T. Les translocations récurrentes activant des oncogènes potentiels ne sont retrouvées que dans un faible pourcentage de cas (moins de 5 % au total) et l'anomalie moléculaire la plus fréquente, la recombinaison survenant entre la région 5' du gène *TAL1* et le locus *SIL*, ne s'observe que dans 20 % des cas environ [1]. L'étude de l'inactivation de gènes suppresseurs connus était restée peu informative.

***MTS1* est inactivé dans la majorité des LAL-T**

Lorsqu'au printemps 1994, deux groupes montrèrent qu'un gène codant pour un inhibiteur des kinases *cdk4* et *cdk6* associées aux cyclines D *MTS1* /*p16^{INK4a}* / *CDKN2* [2] et localisé au niveau de la bande chromosomique 9p21 était délété dans une majorité de lignées tumorales continues établies à partir d'une grande variété de types cellulaires [3, 4], on souleva l'hypothèse que ce gène était un gène suppresseur de tumeurs. Celle-ci se renforça lorsque, dans les mois qui suivirent, il fut démontré que l'expression de *MTS1* bloquait le cycle cellulaire de lignées établies et inhibait la transformation cellulaire de fibroblastes murins embryonnaires par *MYC* [5]. Après une intense excitation, une ambiance de déception s'installa lorsqu'il apparut que la fréquence d'inactivation dans les cellules tumorales primaires était bien inférieure à celle observée

dans les lignées continues, et cela pour la plupart des types de tumeur. De nombreux groupes avaient commencé à analyser le gène *MTS1* dans les tumeurs hématopoïétiques. Cette démarche était motivée par des études cytogénétiques qui avaient montré des anomalies chromosomiques de la bande 9p21 dans divers types d'hémopathies et notamment dans les LAL où leur fréquence atteignait 10 %. La cible fonctionnelle de ces anomalies n'était pas connue et *MTS1* représentait un candidat plausible. Au cours du dernier trimestre 1994, deux études indépendantes, dont l'une provenait de mon groupe, furent publiées dans la revue *Blood* montrant que l'inactivation de *MTS1* n'était pas seulement fréquente dans les lignées établies de LAL, mais également dans les cellules primaires [6, 7]. Notre étude soulignait, en outre, que la fréquence d'inactivation de *MTS1* dans les LAL-T était très nettement supérieure à celle retrouvée dans les LAL de la lignée B. La LAL-T apparaissait donc comme une des rares tumeurs où l'inactivation de *MTS1* était caractéristique de la maladie [7].

Au cours de l'année 1995, une dizaine d'articles portant sur ce sujet furent publiés dans des revues à diffusion internationale [8-17], incluant une analyse détaillée par notre groupe d'une série de 59 cas de LAL-T d'adultes et d'enfants [8, 17]. Bien que des pourcentages faibles ou nuls d'inactivation aient été retrouvés dans certains articles publiés au début de l'année 1995 [9, 10, 12], l'analyse globale de la littérature, et notamment celle des séries portant sur un nombre important de cas, montre que *MTS1* est inactivé dans la

majorité des LAL-T (75 % dans notre série, quel que soit l'âge du malade, 54 % par méta-analyse de 196 cas) [17]. Il s'agit donc bien de l'anomalie génétique la plus fréquente décrite à ce jour dans cette maladie.

Un gène, deux protéines : combien de cibles fonctionnelles ?

Alors que les études de cellules primaires ont permis de définir les quelques maladies dans lesquelles le locus *MTS* est l'objet de réarrangements fréquents, la cible fonctionnelle de ces altérations reste encore à définir. Le locus *MTS* (figure 1) comprend en fait deux gènes *MTS1* et *MTS2* localisés à 30 kb l'un de l'autre [17]. *MTS2*, considéré d'abord comme un pseudogène, code pour un inhibiteur des Cdk associées aux cyclines D, *p15^{INK4b}* [18]. Les deux gènes semblent avoir des fonctions équivalentes et sont candidats à être des gènes suppresseurs de tumeurs. L'analyse détaillée des recombinaisons survenant dans le locus montre que, dans le cas des LAL-T, le gène *MTS1* est plus fréquemment inactivé que le gène *MTS2* [17]. En outre, dans les cas d'altération hémizygote du locus, des mutations ou une inhibition transcriptionnelle ont été retrouvées au niveau du deuxième allèle de *MTS1* [16, 17].

Jusqu'à une date récente, il apparaissait plausible que le produit protéique de *MTS1*, *p16^{INK4a}*, soit la cible fonctionnelle des recombinaisons du locus. Nous avons analysé cette hypothèse en montrant l'absence de la protéine dans tous les cas (sauf un) comportant une altération du locus et en montrant une corrélation étroite entre l'absence d'expression de

$p16^{INK4a}$ et l'hyperphosphorylation de la protéine Rb qui joue un rôle important dans la progression à travers la phase G1 du cycle cellulaire ([19] et données non publiées). Dans un cas, cependant, l'interprétation restait difficile car $p16^{INK4a}$ était exprimée, alors qu'une recombinaison était survenue en amont du promoteur habituel des transcrits codants pour cette protéine et alors que le locus *MTS* était délété sur le deuxième chromosome. La protéine Rb était hyperphosphorylée. Dans ce cas, on pouvait faire l'hypothèse selon laquelle le réarrangement inactivait un gène inconnu comportant des exons localisés en 5' de ce promoteur de *MTS1*. Des résultats récents [20-22] montrant l'existence de transcrits de *MTS1* utilisant un promoteur et un premier exon alternatifs localisés 20 kb en amont du promoteur classique et codant pour une protéine distincte de $p16^{INK4a}$, $p19^{ARF}$ (alternative reading frame) [23] doivent faire réanalyser ces données (figure 1). D'une façon très inhabituelle pour un gène eucaryote, *MTS1* code pour deux protéines qui utilisent des cadres de lecture différents de la même séquence. A la différence de $p16^{INK4a}$, $p19^{ARF}$ n'est pas un inhibiteur des Cdk et sa fonction biochimique reste encore inconnue [23]. Son expression bloque le cycle cellulaire en G1 et G2 [23]. Nous avons montré que toutes les recombinaisons survenant au niveau du locus *MTS* dans les LAL-T altèrent des séquences présentes dans les transcrits codant pour $p19^{ARF}$ [18] (figure 1B). Il est donc possible que $p19^{ARF}$ soit la cible fonctionnelle de l'inactivation de *MTS1*. Il est également possible que l'inactivation des deux protéines $p16^{INK4a}$ et $p19^{ARF}$ soit un événement plus efficace que l'inactivation d'une seule d'entre elles. Si cela était le cas, on comprendrait pourquoi les anomalies structurales (délétions, réarrangements...), dont la probabilité d'altérer les séquences codant pour les deux protéines est élevée, représentent les mécanismes d'inactivation privilégiés de *MTS1* dans les LAL-T [17]. Cette question a non seulement un intérêt fondamental pour la compréhension de l'oncogénèse des cellules T mais est égale-

m/s n° 2, vol. 12, février 96

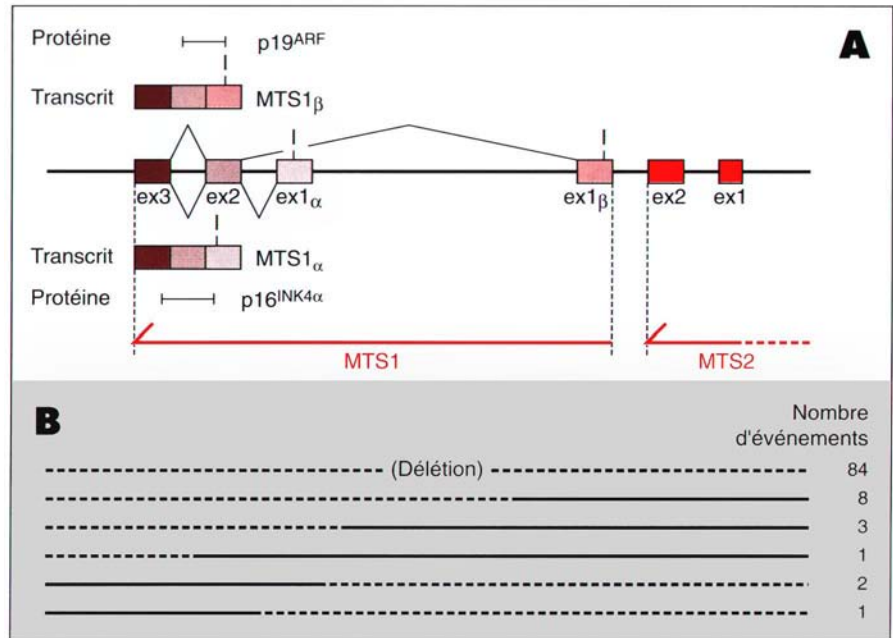


Figure 1. **Locus MTS.** **A.** Représentation schématique de l'organisation du locus *MTS* (une carte de restriction détaillée peut être retrouvée dans la référence [17]) et de la génération de deux protéines à partir du gène *MTS1* [23]. *l*: site d'initiation de la traduction. **B.** Analyse des délétions dans une série de 59 LAL-T [17]. Les traits pleins correspondent aux régions conservées et les pointillés aux régions délétées. Le nombre d'événements est indiqué.

ment importante pour envisager des stratégies thérapeutiques ciblées sur les événements oncogènes dans les LAL-T.

F.S.

- Rabbitts T. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994; 372: 143-9.
- 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.
- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day R, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436-40.
- 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.
- Serrano M, Gomez-Lahoz E, De Pinho RA, Beach D, Bar-Sagi D. Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by $p16^{INK4}$. *Science* 1995; 267: 249-52.

- Ogawa S, Hirano N, Sato N, Takahashi T, Hangaishi A, Tanaka K, Kurokawa M, Tanaka T, Mitani K, Yazaki Y, Hirai H. Homozygous loss of the *cyclin-dependent kinase 4-inhibitor (p16)* gene in human leukemias. *Blood* 1994; 84: 2431-5.
- Hebert J, Cayuela JM, Berkeley J, Sigaux F. Candidate tumor-suppressor genes *MTS1 (p16^{INK4A})* and *MTS2 (p15^{INK4B})* display frequent homozygous deletions in primary cells from T- but not from B-cell lineage acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 1994; 84: 4038-44.
- Cayuela JM, Hebert J, Sigaux F. Homozygous *MTS1 (p16^{INK4A})* deletion in primary tumor cells of 163 leukemic patients (letter). *Blood* 1995; 85: 854.
- Quesnel B, Preudhomme C, Philippe N, Vanrumbeke M, Dervite I, Lai JL, Bauters F, Wattel E, Fenaux P. *p16* gene homozygous deletions in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995; 85: 657-63.
- Stranks G, Height S, Mitchell P, Jadavay D, Yuille M, De Lord C, Clutterbruck R, Treleaven J, Powles R, Nacheva E, Oscier D, Karpas A, Lenoir G, Smith S, Millar J, Catovsky D, Dyer M. Deletions and rearrangements of *CDNK2* in lymphoid malignancy. *Blood* 1995; 85: 893-901.
- Okuda T, Shurtleff S, Valentine M, Raimondi S, Head D, Behm F, Curcio-Brint A, Liu Q, Pui C, Sherr C, Beach D, Look A, Downing J. Frequent deletion of *p16^{INK4A}/MTS1* and *p15^{INK4B}/MTS2* in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995; 85: 2321-30.

12. Fizzotti M, Cimino G, Pisegne S, Alimena G, Quartarone C, Mandelli F, Pelicci P, Lo Coco F. Detection of homozygous deletions of the *cyclin-dependent kinase 4 inhibitor (p16)* gene in acute lymphoblastic leukemia and association with adverse prognostic features. *Blood* 1995; 85: 2685-90.
13. Rasool O, Heyman M, Borgonovo Brandter L, Liu Y, Grandaer D, Soderhall S, Einhorn S. *p15^{INK4B}* and *p16^{INK4}* gene inactivation in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995; 85: 3431-6.
14. Takeuchi S, Bartram K, Seriu T, Miller C, Tobler A, Janssen J, Reiter A, Ludwig W, Zimmermann M, Schwaller J, Lee E, Miyoshi I, Koeffler H. Analysis of a family of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15/MTS2/INK4B, p16/MTS1/INK4A, and p18 genes in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood* 1995; 86: 755-60.
15. Delmer A, Tang R, Denamaud-beaufort C, Paterlini P, Brechot C, Zittoun R. Alterations of *cyclin-dependent kinase 4 inhibitor (p16^{INK4A}/MTS1)* gene structure and expression in acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia* 1995; 9: 1240-5.
16. Ohnishi H, Kawamura M, Ida K, Sheng X, Hanada R, Nobori T, Yamamori S, Hayashi Y. Homozygous deletions of *p16/MTS1* gene are frequent but mutations are infrequent in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995; 86: 1269-75.
17. Cayuela J, Madani A, Sanhes L, Stern M, Sigaux F. *Multiple tumor suppressor gene 1* inactivation is the most frequent genetic alteration in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996 (sous presse).
18. Hannon GJ, Beach D. *p15^{INK4B}* is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 1994; 371: 257-61.
19. Darbon J, Fesquet D, Cavadore J. De nouveaux régulateurs du cycle cellulaire: les protéines modulatrices des complexes Cdk-cyclines. *médecine/sciences* 1995; 11: 349-56.
20. Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavtigian S, Katcher H, Parry D, Peters G, Kamb A. Complex structure and regulation of the *p16(MTS1)* locus. *Cancer Res* 1995; 55: 2988-94.
21. Mao L, Merlo A, Bedgi G, Shapiro G, Edwards C, Rollins B, Sidransky D. A novel *p16^{INK4A}* transcript. *Cancer Res* 1995; 55: 2995-7.
22. Duro D, Bernard O, Della Valle V, Berger R, Larsen C. A new type of *p16^{INK4A}/MTS1* gene transcript expressed in B-cell malignancies. *Oncogene* 1995; 11: 21-9.
23. Quelle D, Zindy F, Ashmun R, Sherr C. Alternative reading frames of the *INK4a (MTS1, CDKN2)* tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995; 83: 993-1000.

■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ Les protéines **P16^{INK4a}** et **P19^{ARF}**, dont les structures sont complètement différentes, sont codées par le même gène **INK4α (MTS1/CDKN2)** et sont impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire. Le gène **INK4a** (pour *inhibitor of CDK4*), encore appelé **MTS1** ou **CDKN2**, fait partie d'un groupe de gènes codant pour des inhibiteurs de l'activité kinase de CDK4-cycline D comprenant p15, p16 et p18. Il est localisé sur le chromosome 9 en p21-22 et est lié au gène **INK4b** codant pour la protéine **P15^{INK4b}**. La non-expression de **P16^{INK4a}** normale (par délétion et/ou par mutation de façon homozygote) est fréquemment observée dans des cancers humains, ce qui permet de suggérer que **P16^{INK4a}** agit comme un suppresseur de tumeur. L'action majeure de **P16^{INK4a}** serait d'inhiber la phosphorylation de Rb, le produit du gène de susceptibilité au rétinoblastome, par la kinase CDK4. Cette inhibition de phosphorylation de Rb empêcherait la cellule de sortir de G1 et d'entrer en phase S. On avait montré que le gène **INK4a** comprenait trois exons (E1-E2-E3) codant pour la protéine **P16^{INK4a}**. Ce message a un cadre ouvert de lecture débutant dans E1, se poursuivant dans E2, le troisième exon ayant une petite région codante. Les publications du groupe de Christian Larsen [1], puis celles de Steven Stone et de Li Mao [2, 3] avaient décrit l'existence d'un message différent de celui de P16. En effet, ils avaient montré

l'existence d'un premier exon alternatif **E1β**, situé en 5' de **E1α**, entraînant la formation d'un message **E1β-E2-E3**. La particularité de ce nouveau message était d'avoir un cadre de lecture différent de celui du message **E1α-E2-E3**, dû à l'utilisation d'un codon de début de production AUG situé dans **E1β** et se terminant dans **E2**. Les protéines synthétisées devaient donc, bien que dérivant du même gène, être complètement différentes. Le groupe de Charles Sherr [4] vient de caractériser la nouvelle protéine, **P19^{ARF}** pour *alternative reading frame*. Le message **E1β-E2-E3**, exprimé notamment dans le colon, le cerveau, le cœur, la rate, le rein, code pour une protéine de 19 kDa. Le rôle essentiel de **P19^{ARF}** semble être d'arrêter la progression du cycle cellulaire aux points de transition G1/S et G2/M, **P19^{ARF}** agissant donc en inhibant la kinase CDK4, mais sans interaction directe avec elle. La plupart des mutations ponctuelles du gène **INK4a** modifient tout à la fois **P19^{ARF}** et **P16^{INK4a}**. De plus, de nombreuses mutations de **INK4a** provoquent un décalage du cadre de lecture, ce qui entraîne des anomalies de **P16^{INK4a}** et de **P19^{ARF}**.

[1. D Duro D, et al. *Oncogene* 1995; 11: 21-9.]
 [2. Stone S, et al. *Cancer Res* 1995; 55: 2988-94.]
 [3. Mao L, et al. *Cancer Res* 1995; 55: 2995-7.]
 [4. Quelle D, et al. *Cell* 1995; 83: 993-1000.]

m/s ANNIVERSAIRE EN VIDÉO-CASSETTES

1995 VIENT DE PARAÎTRE

ONTOGÉNIE DE L'HÉMATOPOÏÈSE APLASIE MÉDULLAIRE

ÉLIANE GLUCKMAN • LAURE COULOMBEL

Septembre 1995
 408 pages, broché
 ISBN : 2-7420-0103-4
Prix : 400 FF

Collection Colloques
 Co-édition Inserm
 John Libbey Eurotext

Éditions John Libbey Eurotext :
 127, avenue de la République
 92120 Montrouge - France
 Tél. : 33 (1) 46 73 06 60
 Fax : 33 (1) 40 84 09 99

Une approche multidisciplinaire sur l'hématopoïèse fœtale et néonatale

■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Mutations de la protéine p16^{INK4}, mélanomes et cancers du pancréas.** La protéine p16^{INK4} empêche la progression du cycle cellulaire au-delà de la transition G1/S par son action indirecte sur la phosphorylation du produit de *Rb* (*m/s* n° 6-7, vol. 10, p. 744, n° 9, vol. 11, p. 1346) [1]. Son inactivation, le plus souvent du fait de la délétion du gène, mais aussi de mutations dans le gène ou ses séquences régulatrices, est très souvent observée dans les cancers humains [2]. Le gène *p16^{INK4}* est localisé sur le chromosome 9p21, une région qui a été impliquée dans les mélanomes familiaux. Cela suggérerait que *p16^{INK4}* était un gène suppresseur de tumeur, en particulier de mélanome. Est-il impliqué de la même manière dans d'autres tumeurs? Les résultats d'une étude sur la susceptibilité aux cancers portant sur dix-neuf familles avec mélanome familial ont été publiés très récemment dans le *New England Journal of Medicine* [3]. Parmi ces dix-neuf familles, dix avaient des mutations germinales de *p16* qui ségrégeaient avec les mélanomes (groupe I). Ces mutations inactivaient complètement la protéine comme l'indiquait le test *in vitro* d'inhibition de la kinase Cdk4. En revanche, dans les neuf autres familles (groupe II) l'activité fonctionnelle de p16 était normale, soit que p16 n'ait pas de mutation (cinq familles), soit qu'une mutation faux sens détectée n'ait pas de retentissement fonctionnel (quatre familles). Les membres de ces deux groupes de familles ont été suivis pendant 6 à 18 ans. Le groupe I comportait 56 individus atteints de mélanomes, le groupe II en comptait 40. Les mélanomes dans l'ensemble des familles étaient cliniquement très voisins, survenant en moyenne 18 ans plus tôt que dans la population générale. L'absence de fonction de p16 entraîne-t-elle l'apparition d'autres cancers? Pour répondre à cette question, une étude statistique a été conduite, prenant en compte les divers types de cancers attendus dans cette population (fondée sur le programme SEER, *surveillance, epidemio-*

logy and end results). Le risque de développer un cancer du pancréas est multiplié par 22 chez les sujets sans p16 fonctionnelle; il faut noter que les cancers du pancréas sont survenus dans quatre familles du groupe I chez lesquelles, en outre, les anomalies génétiques de p16 étaient différentes; aucune susceptibilité pour un autre type de cancer n'a été trouvée. En revanche, aucun des malades du groupe II n'a présenté de cancer du pancréas ni d'autre localisation dans une proportion différente de celle du groupe témoin. En dehors des rares familles prédisposées aux cancers par anomalie germinale de la protéine p53 (syndrome de Li Fraumeni) (*m/s* n° 10, vol. 6, p. 1006), les familles prédisposées aux mélanomes n'ont pas d'autre susceptibilité au cancer, à l'exception du cancer du pancréas dans le cas de mutation inactivante de p16. Les anomalies de p16 avaient, d'ailleurs, déjà été détectées dans des adénocarcinomes pancréatiques, avec mutations somatiques et délétions homozygotes dans la tumeur [4]; de même, a récemment été décrite une mutation de Cdk4, la cible de p16, dans une lignée cellulaire de mélanome [5]. En accord avec cette étude d'épidémiologie moléculaire Whelan *et al.* décrivent, par ailleurs, une famille chez laquelle on retrouve combinés des mélanomes et des cancers du pancréas d'un type particulier (cancer à cellules squameuses), ségrégeant avec une mutation inactivatrice de p16. Chez un malade de cette famille le mélanome était associé à un cancer à cellules squameuses de la langue [6].

[1. Thomas G. *médecine/sciences* 1995; 11: 336-48.]

[2. Kamb A, *et al. Science* 1994; 264: 236-40.]

[3. Golstein AM, *et al. N Engl J Med* 1995; 333: 970-4.]

[4. Caldas C, *et al. Nature Genet* 1994; 8: 27-32. Erratum: *Nature Genet* 1994; 8: 410.]

[5. Wöelfel T, *et al. Science* 1995; 269: 1281-4.]

[6. Whelan AJ, *et al. N Engl J Med* 1995; 333: 975-7.]