

Kinases dépendantes des cyclines : rôle biologique et implications dans la pathologie humaine

Dariusz Wolowiec
Martine Ffrench

Les kinases dépendantes des cyclines (Cdk) occupent une place importante dans la régulation du cycle mitotique des cellules eucaryotes. La chronologie de leur activation est déterminée par leurs modifications post-traductionnelles (phosphorylations/déphosphorylations), et par l'association à une cycline, qui constitue la sous-unité régulatrice du complexe enzymatique. Les Cdk participent à la régulation du cycle cellulaire par la phosphorylation de la protéine Rb, des interactions avec des facteurs de transcription et la phosphorylation de l'histone H1 et d'autres composants de l'appareil mitotique. Une dérégulation des Cdk peut contribuer au développement d'un processus néoplasique, comme le suggèrent les interactions observées entre certaines Cdk et des oncoprotéines virales, et la délétion fréquente, dans des lignées néoplasiques et des tumeurs *de novo*, des gènes codant pour leurs inhibiteurs, p16^{INK4} et p15^{INK4B} ou encore p21^{WAF1/CIP1}. En revanche, c'est le déficit en la Cdk p58-GTA et non son hyperactivité, qui pourrait être impliqué dans la transformation néoplasique.

ADRESSE

D. Wolowiec: *médecin hospitalo-universitaire*. Service d'hématologie et de maladies prolifératives, Académie de médecine, Wrocław, Pologne. M. Ffrench: *praticien hospitalier*. Laboratoire central d'hématologie et cytogénétique, hôpital Édouard-Herriot et laboratoire de cytologie analytique, université Claude-Bernard, 69373 Lyon Cedex 08, France.

Le déroulement correct des phases successives du cycle mitotique des cellules eucaryotes est assuré, en grande partie, par une famille de kinases sérine-thréonine, dites kinases dépendantes des cyclines (*cyclin-dependent kinases*, Cdk). Leur structure primaire montre une homologie entre les espèces tout au long de l'échelle de l'évolution. L'acquisition de l'activité kinasique par les Cdk nécessite l'association d'une sous-unité régulatrice nommée cycline, dont l'expression cyclique

conditionne la chronologie de l'activation des Cdk.

Les cyclines sont divisées en deux groupes: cyclines mitotiques et cyclines G1. Les cyclines mitotiques, indispensables à la division de la cellule, regroupent les cyclines A et B (B1 et B2). Les cyclines dites cyclines G1 (chez l'homme, cyclines C, D1, D2, D3 et E) sont présentes dans les cellules dès la phase G1, et activent les Cdk engagées dans des étapes précoces du cycle cellulaire [1, 2]. La classe des cyclines comprend aussi d'autres protéines qui, par leur struc-

RÉFÉRENCES

1. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993; 73: 1059-65.
2. Lamas E, Zindy F, Sobczack J, Paterlini P, Wang J, Chenivresse X, Henglein B, Bréchet C. Cycline-A et cancer. *médecine/sciences* 1993; 9: 676-83.
3. Bai C, Richman R, Elledge SJ. Human cyclin F. *EMBO J* 1994; 13: 6087-98.
4. Okamoto K, Beach D. Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *EMBO J* 1994; 13: 4816-22.
5. Fisher RP, Morgan DO. A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 1994; 78: 713-24.
6. Draetta G, Brizuela L, Potashkin J, Beach D. Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeast encoded by *cdc2** and *suc1**. *Cell* 1987; 50: 319-25.
7. Lee MG, Nurse P. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* 1987; 327: 31-5.
8. Draetta G, Beach D. Activation of Cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell* 1988; 54: 17-26.
9. Wolowiec D, Deviller P, Simonin D, Souchietta G, Rimokh R, Benchaib M, Bryon PA, Ffrench M. Cdk1 is a marker of proliferation in human lymphoid cells. *Int J Cancer* 1995; 61: 381-8.
10. King RW, Jackson PK, Kirschner MW. Mitosis in transition. *Cell* 1994; 79: 563-71.
11. O'Connor PM, Ferris DK, Pagano M, Draetta G, Pines J, Hunter T, Longo DL, Kohn KW. G2 delay induced by nitrogen mustard in human cells affects cyclin A/Cdk2 and cyclin B1/cdc2-kinase complexes differently. *J Biol Chem* 1993; 268: 8298-308.
12. 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.

ture, ressemblent aux cyclines mitotiques et G1, mais dont le rôle dans le cycle cellulaire ne semble pas être restreint à un stade précis du cycle cellulaire. Il faut mentionner la cycline F, exprimée surtout en phases S et G2 du cycle [3], la cycline G, trouvée chez les rongeurs, que l'on pense placée sous le contrôle positif de l'anti-oncogène p53 [4], et la cycline H, partenaire de Cdk7, un membre de la famille Cdk discuté plus loin [5]. Dans cette revue, nous allons présenter la place des principales Cdk (Cdk1 à Cdk7) dans la régulation d'un cycle cellulaire normal et ensuite des données témoignant de leur implication probable en pathologie, surtout dans les affections prolifératives*.

Cdk1 : un modèle pour l'étude de l'activation des Cdk

La première Cdk décrite chez l'homme, Cdk1, est une protéine de 34 kDa, appelée initialement p34^{CDC2} pour son homologie avec le produit du gène *CDC2* (*cell division control 2*) de la levure *Schizosaccharomyces pombe* [6]. Elle a été identifiée et caractérisée dans les cellules humaines surtout par les équipes de Nurse [7] et de Draetta et Beach [6, 8]. Cdk1 est absente des cellules quiescentes. Dans les cellules qui prolifèrent, elle peut être détectée tout au long du cycle mitotique, mais son ARNm varie au cours du cycle, avec un minimum en phase G1 [5]. Dans de nombreux types cellulaires, la concentration de la protéine varie peu au cours de l'interphase [5, 7]. Notre équipe vient cependant de montrer que, dans les cellules lymphoïdes humaines, celle-ci suit les mêmes variations au cours du cycle cellulaire que celles de son ARNm [9]. L'activité enzymatique de Cdk1 ne se manifeste que pendant une période très courte à la transition phase G2-mitose, entraînant le déclenchement de celle-ci. Le mécanisme de son activation en tant que kinase peut être re-

* Cet article n'aborde volontairement pas le rôle des cyclines dans la pathogénie de certaines tumeurs, même s'il est probable qu'elles agissent par l'intermédiaire d'une stimulation de l'activité de kinases Cdk. Lamas et al. ont abordé ce sujet dans *médecine/sciences* en 1993 [2].

présenté comme suit (figure 1): durant la phase S, Cdk1 s'associe à la cycline B synthétisée *de novo*. En même temps, Cdk1 est phosphorylée sur les thréonines 14 et 161 (Thr 14 et Thr 161), ainsi que sur la tyrosine 15 (Tyr 15). La phosphorylation de Thr 14 et de Tyr 15 empêche l'acquisition précoce, avant l'achèvement de la répliation de l'ADN, de l'activité kinase par le complexe Cdk1-cycline B. Cette activité kinase n'apparaît qu'au début de la mitose, lorsque la phosphatase codée par le gène *CDC25* déphosphoryle ces deux acides aminés, « débloquent » ainsi l'enzyme. Cdk1 activée phosphoryle de très nombreux substrats, dont l'histone H1, ce qui conduit à la formation des chromosomes métaphasiques. Cette capacité de phosphoryler l'histone H1 est utilisée comme mesure de l'activité enzymatique de Cdk1 et de la plupart des autres kinases de sa famille. On parle alors de kinase de l'histone H1 ou H1K. A la transition métaphase/anaphase, la cycline B subit une dégradation protéolytique, et la Thr 161 de Cdk1 est déphosphorylée. Cdk1 perd alors son activité kinase et la cellule peut achever la mitose [10]. Cdk1 peut être aussi activée par la cycline A avant l'activation par la cycline B, mais le rôle physiologique du complexe Cdk1-cycline A n'est pas connu [11]. Cette cascade de phosphorylations et déphosphorylations, qui conditionne l'activation de Cdk1, implique différentes kinases et phosphatases et a fait l'objet de nombreuses revues générales [10]. Le dernier membre connu de la famille des Cdk (Cdk7, qui sera décrite plus loin) a un statut particulier puisque cette kinase paraît impliquée dans l'activation de l'ensemble des autres Cdk. La régulation négative de l'activité de Cdk1 est également assurée par la famille des protéines nommées inhibiteurs des Cdk (*m/s n° 6-7, vol. 10, p. 744*) [12]. Dans les fibroblastes humains normaux, les complexes Cdk (1, 2, 4 ou 5) – cycline A, B ou D s'associent à une molécule de PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) et à une protéine de 21 kDa, nommée p21^{WAF1/CIP1} (*Cdk-interacting protein 1*) [13]. p21 est un inhibiteur des kinases: Cdk1-cycline B, Cdk2-cycline A ou E et Cdk4-cyclines D [14]. La transcription du gène *p21* est induite,

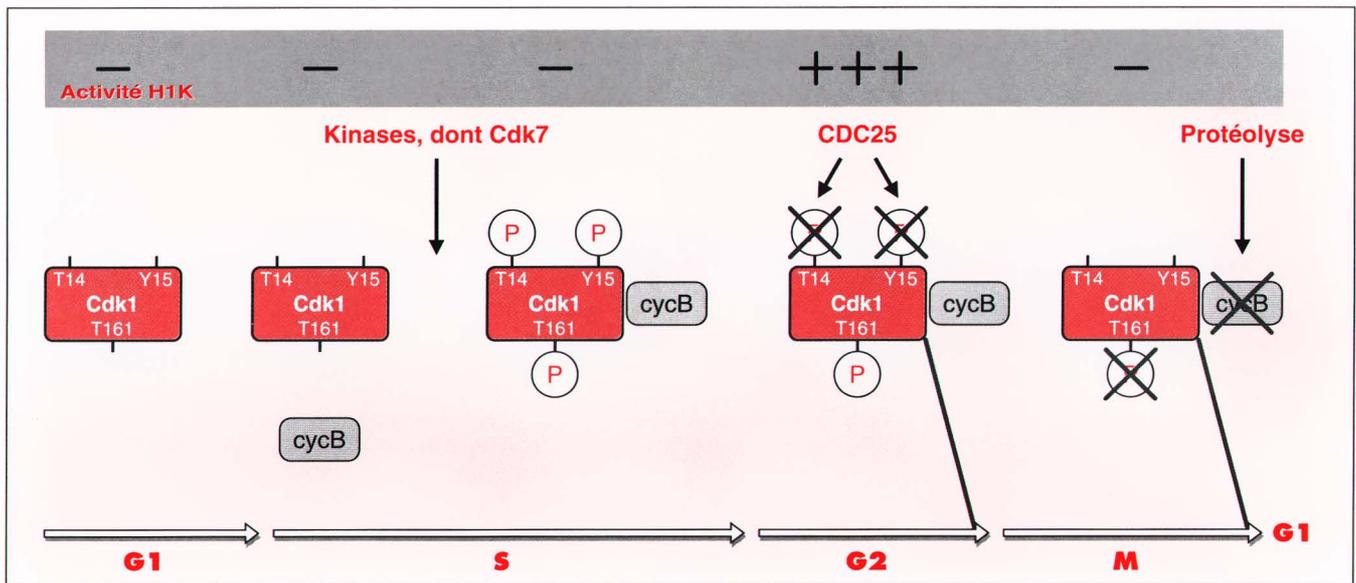


Figure 1. **Mécanisme d'activation du complexe Cdk1-cycline B comme kinase de l'histone H1 (H1K).** Pendant la phase S, une molécule de Cdk1 s'associe à une molécule de cycline B (cycB) nouvellement synthétisée, et en même temps subit des phosphorylations: activatrice sur la thréonine 161 (T161) et inhibitrices sur la thréonine 14 (T14) et la tyrosine 15 (Y15). Ce complexe Cdk1-cycline B n'a pas d'activité kinase. En fin de phase G2, T14 et Y15 sont déphosphorylées par une phosphatase Cdc25. Le complexe Cdk1-cycline B devient alors actif comme H1K et déclenche la mitose. A la transition métaphase/anaphase, la cycline B est protéolysée et T161 déphosphorylée, ce qui désactive Cdk1 et conditionne la fin de la mitose.

dans certains cas, par l'anti-oncogène p53 et nécessite la présence d'au moins un allèle fonctionnel de celui-ci [15]. Cdk1 est également sensible à l'action inhibitrice d'un autre facteur, nommé p27^{KIP1}, qui est une protéine thermostable découverte dans les cellules de poumon de vison inhibées par le contact ou par l'action de TGFβ (transforming growth factor) [16, 17].

La famille des Cdk et son rôle dans le cycle cellulaire

L'analyse du génome humain a permis d'individualiser, à ce jour, plus d'une dizaine de séquences codant pour des kinases proches structurellement de Cdk1 [18]. Elles ont toutes dans leur extrémité NH2 terminale une séquence xGxPxxxxREx*. Six d'entre elles sont mieux connues et ont été nommées Cdk2-Cdk7.

Cdk2 est une protéine découverte initialement par l'équipe de Philippe chez le xénope [19]. Sa masse moléculaire chez l'homme est de 33kDa. Son gène est localisé sur le chromosome 12 en 12q13 [20]. Elle acquiert une activité kinase en association avec la cycline A ou la cycline E [20, 21]. Comme Cdk1, Cdk2 subit des phosphorylations: activatrice sur la thréonine 160 et inhibitrice sur la thréonine 14 et la tyrosine 15. Le complexe Cdk2-cycline A développe une activité kinase dès la phase G1 tardive jusqu'à la métaphase, quand la cycline A est protéolysée. L'activité kinase du complexe Cdk2-cycline E se manifeste aussi dès la phase G1, atteint son maximum en début de phase S, puis disparaît [20, 21]. Cette kinase, probablement en association avec la cycline E, est indispensable à la mise en route de la réplication de l'ADN [23].

Cdk2 peut s'associer au facteur de transcription E2F, responsable de l'expression d'un certain nombre de gènes participant à la réplication de l'ADN. Dans des cellules en phase G1 tardive, certains auteurs ont trouvé Cdk2 dans un complexe avec la cycli-

ne E, E2F et une protéine p107, apparentée à pRb, produit du gène de susceptibilité au rétinoblastome. Durant la phase S, la cycline E est remplacée dans ce complexe par la cycline A [24]. Le complexe Cdk2-cycline A peut également se lier à E2F-1, un membre de la famille E2F, directement, sans l'intermédiaire de p107. Cdk2-cycline A, à la différence de Cdk2-cycline E, est capable de phosphoryler E2F-1, qui perd, de ce fait, son affinité pour l'ADN et son activité de facteur de transcription [25]. L'activité de Cdk2 est sensible à l'action inhibitrice de deux facteurs déjà mentionnés: p21^{WAF1/CIP1} et p27^{KIP1} [14, 16, 17].

Cdk3 est le membre le moins connu de la famille Cdk. La transfection de cellules des lignées Saos2 (ostéosarcome) et C33A (cancer du col de l'utérus) avec l'ADNc codant pour une Cdk3 non fonctionnelle a causé leur arrêt en phase G1. Il est donc possible que Cdk3 joue un rôle aux stades précoces du cycle cellulaire [26].

A la différence de la plupart des Cdk connues, Cdk4 ne montre pas d'activité H1K. Son gène est localisé sur le

* Code à une lettre des acides aminés: A: Ala; C: Cys; D: Asp; E: Glu; F: Phe; G: Gly; H: His; I: Ile; K: Lys; L: Leu; M: Met; N: Asn; P: Pro; Q: Gln; R: Arg; S: Ser; T: Thr; V: Val; W: Trp; Y: Tyr et x est n'importe quel acide aminé.

RÉFÉRENCES

13. Xiong Y, Zhang H, Beach D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 1992; 71: 505-14.
14. 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.
15. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-25.
16. Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. p27^{KIP1}, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994; 8: 9-22.
17. Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massagué J. Cloning of p27^{KIP1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994; 78: 59-66.
18. Meyerson M, Enders GH, Wu CL, Su LK, Gorika C, Nelson C, Harlow E, Tsai LH. A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J* 1992; 11: 2909-17.
19. Paris J, Le Guellec R, Couturier A, Le Guellec K, Omilli F, Camonis J, Mac Neill S, Philippe M. Cloning by differential screening of a *Xenopus* cDNA coding for a protein homologous to cdc2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1039-43.
20. Demetrick DJ, Zhang H, Beach DH. Chromosomal mapping of human CDK2, CDK4 and CDK5 cell cycle kinase genes. *Cytogenet Cell Genet* 1994; 66: 72-4.
21. Pines J, Hunter T. Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* 1990; 346: 760-3.
22. Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto T, Morgan DO, Franza BR, Roberts JM. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 1992; 257: 1689-94.
23. Tsai LH, Lees E, Faha B, Harlow E, Riabowol K. The cdk2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells. *Oncogene* 1993; 8: 1593-602.

chromosome 12 en 12q13, dans la même région que celui de Cdk2 [20]. Ses partenaires régulateurs sont les cyclines D (D1, D2 et D3) [27]. Dans les macrophages et les fibroblastes de rongeurs stimulés par un facteur de croissance, le complexe Cdk4-cycline D1 devient actif comme kinase à partir du milieu de la phase G1. Son activité est maximale à la transition G1/S et reste détectable jusqu'à la mitose [28]. Cette activité requiert une phosphorylation sur la thréonine 172.

Le substrat principal de Cdk4 *in vitro* et, comme le suggèrent les publications très récentes, probablement aussi *in vivo*, est la protéine Rb [29, 30]. Les interactions entre pRb et des complexes Cdk-cycline *in vivo* ne sont pas encore bien comprises, en partie du fait d'un grand nombre de combinaisons Cdk (2, 4, 6) – cyclines (A, D1, D2, D3, E) capables de la phosphoryler *in vitro*. Selon le modèle qui paraît actuellement le plus probable, les complexes Cdk2-cycline E,

Cdk4-cyclines D et Cdk6-cycline D (discuté plus loin) phosphorylent pRb, inhibant ainsi son activité antiproliférative. Il a été postulé que pRb sous forme déphosphorylée exerce une action antiproliférative par son association au facteur E2F et l'empêche ainsi de transactiver des gènes nécessaires à la réplication de l'ADN. La phosphorylation de pRb, en fin de phase G1, pourrait donc libérer E2F de l'action inhibitrice de pRb [29, 31, 32]. Il paraît envisageable que les Cdk, en phosphorylant pRb en fin de phase G1, rendent possible l'expression des gènes dépendants d'E2F, puis, en phosphorylant E2F lui-même pendant la phase S, inhibent cette expression. Ce mécanisme, hypothétique, assurerait une chronologie adéquate d'activation des gènes participant à la réplication de l'ADN. Les complexes Cdk4- et Cdk6-cycline D, non seulement modifient l'état fonctionnel de pRb, mais semblent placés eux-mêmes sous son contrôle. L'absence de ces complexes a été

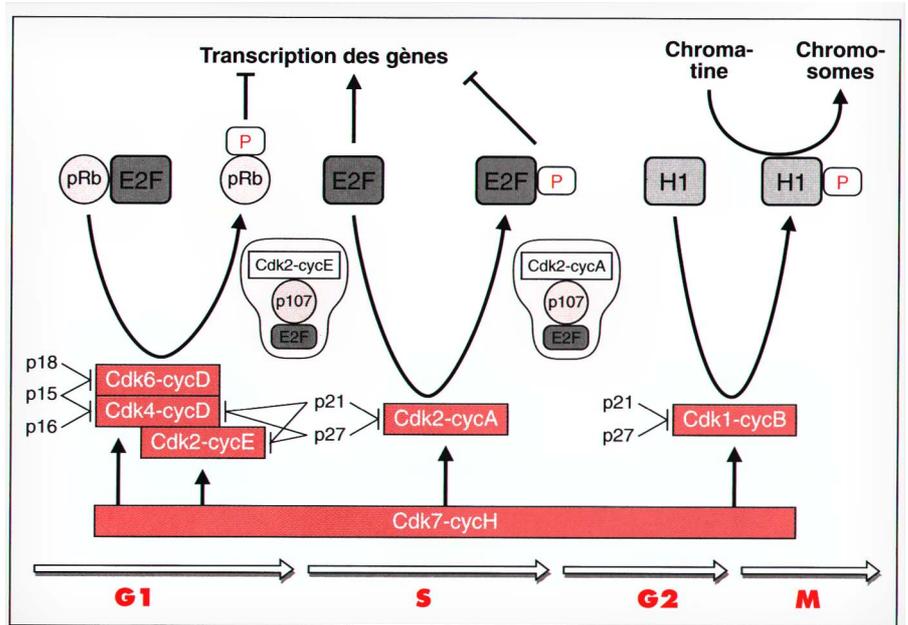


Figure 2. Principales Cdk et leur place dans la régulation du cycle cellulaire. Les Cdk, en association avec les cyclines (cyc), contrôlent des « points de transition » du cycle cellulaire en phosphorylant de nombreux substrats, dont pRb, une famille de facteurs de transcription E2F et l'histone H1. Les Cdk sont elles-mêmes placées sous le contrôle de différents facteurs cellulaires. En particulier, elles sont activées par une autre Cdk (Cdk7). La régulation négative est assurée par une famille d'inhibiteurs, dont : p15^{INK4B} (p15), p16^{INK4A} (p16), p18, p21^{WAF1/CIP1} (p21), p27^{KIP1} (p27).

constatée dans les cellules des lignées néoplasiques humaines, où pRb était absente ou inactivée, soit par une mutation, soit par une oncoprotéine (E6 et E7) de l'herpès virus HPV-16. Les kératinocytes transformés par un vecteur contenant la séquence codante pour E6 et E7 perdaient la capacité d'assembler ces complexes malgré l'expression adéquate de Cdk4, cycline D1 et pRb [33]. Il convient cependant de souligner que ce modèle, élaboré surtout sur des cellules néoplasiques, n'est peut-être pas universel. En effet, Lukas *et al.* [29] ont trouvé des complexes actifs Cdk4-cycline D1 dans les cellules embryonnaires ME de souris qui synthétisaient pRb ou, au contraire, étaient déficientes en cette anti-oncoprotéine. L'activité kinasique de Cdk4 vis-à-vis de pRb est inhibée par le facteur p21^{WAF1/CIP1} et deux protéines fortement apparentées entre elles: p16^{INK4} (*inhibitor of Cdk4*) et p15^{INK4B} (*m/s n° 6-*

7, vol. 10, p. 744). Contrairement à p21^{WAF1/CIP1} et p27^{KIP1}, qui s'associent aux complexes Cdk-cycline, p16^{INK4} n'est retrouvée que dans des complexes binaires avec Cdk4. Il est donc probable que p16^{INK4} dissocie les complexes Cdk4-cyclines D, ou bien empêche l'association entre Cdk4 et cyclines D [34, 35]. La transcription du gène de p16^{INK4} est inhibée par pRb, ce qui peut expliquer le phénomène déjà signalé de l'absence des complexes Cdk4-cyclines D dans certaines cellules n'exprimant pas la pRb fonctionnelle [36]. Cdk5 est une kinase différente des autres Cdk car on la soupçonne de jouer un rôle dans le métabolisme cérébral. Son gène, localisé sur le chromosome 7 en 7q36 [20], est exprimé dans différents tissus, mais le cerveau est l'organe le plus riche en ARNm correspondant [37]. Elle acquiert une activité H1K en association avec une protéine p35, dont l'expression est strictement restreinte au cerveau

[37]. Dans le cerveau embryonnaire de souris, la protéine et l'activité H1K qui lui est associée n'étaient décelables que dans les axones des neurones mûrs et non proliférants [38]. Il est à noter que Cdk5 phosphoryle *in vitro* la protéine cérébrale tau liée aux microtubules. Cette protéine prend alors une conformation pathologique, comme dans la maladie d'Alzheimer. Nous ne savons pas encore si Cdk5 phosphoryle tau *in vivo*, ce qui lui ferait jouer un rôle dans la pathogénie de cette maladie; cela paraît cependant probable [39]. Cdk6 est une protéine de 40 kDa formant des complexes avec les cyclines D1, D2 et D3. Son activité H1K est faible, mais elle montre, comme Cdk4, une activité importante de kinase de pRb. Après la stimulation des lymphocytes T par la phytohémagglutinine, cette activité se manifeste dès le milieu de la phase G1, ce qui témoignerait de sa fonction aux stades précoces du cycle cellulaire [31]. Son

Tableau I
PROPRIÉTÉS DES PRINCIPALES Cdk ET LEURS RÔLES CELLULAIRES

Cdk	m.m. (kDa)	Sous-unité régulatrice	Inhibiteur	Fonctions cellulaires principales
Cdk1	34	Cycline B Cycline A	p21 ^{WAF1/CIP1} p27 ^{KIP1}	Déclenchement de la mitose
Cdk2	33	Cycline A Cycline E	p21 ^{WAF1/CIP1} p27 ^{KIP1}	Régulation de la réplication de l'ADN (par l'intermédiaire de la famille E2F ?) Phosphorylation de pRb (Cdk2-cycline E)
Cdk3	36	?	?	Régulation de la phase G1 ?
Cdk4	34	Cyclines D	p21 ^{WAF1/CIP1} p27 ^{KIP1} p16 ^{INK4} P15 ^{INK4B}	Phosphorylation de pRb
Cdk5	35	p35 Cyclines D ?	p21 ^{WAF1/CIP1} ?	Participation au métabolisme cérébral ?
Cdk6	40	Cyclines D	p16 ^{INK4} p15 ^{INK4B} p18	Phosphorylation de pRb
Cdk7	42	Cycline H	?	Activation des autres Cdk
p58-GTA	50-110	?	?	Activité antiproliférative ?

RÉFÉRENCES

24. Lees E, Faha B, Dulic V, Reed SI, Harlow E. Cyclin E/cdk2 and cyclin A/cdk2 kinases associate with p107 and E2F in a temporally distinct manner. *Genes Dev* 1992; 6: 1874-85.
25. Xu M, Sheppard KA, Peng CY, Yee AS, Piwnica-Worms H. Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 8420-31.
26. van den Heuvel S, Harlow E. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* 1993; 262: 2050-4.
27. Matsushime H, Ewen ME, Strom DK, Kato JY, Hanks SK, Roussel MF, Sherr CJ. Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34^{INK3}/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* 1992; 71: 323-34.
28. Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 2066-76.
29. Lukas J, Bartkova J, Rohde M, Strauss M, Bartek J. Cyclin D1 is dispensable for G1 control in retinoblastoma gene-deficient cells independently of cdk4 activity. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2600-11.
30. Horton LE, Quiang Y, Templeton DJ. G1 cyclins control the retinoblastoma gene product growth regulation activity via upstream mechanisms. *Cell Growth Different* 1995; 6: 395-407.
31. Meyerson M, Harlow E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 2077-86.
32. Suzuki-Takahashi I, Kitagawa M, Saijo M, Higashi H, Ogino H, Matsumoto H, Taya Y, Nishimura S, Okuyama A. The interactions of E2F with pRB and with p107 are regulated via the phosphorylation of pRB by a cyclin-dependent kinase. *Oncogene* 1995; 10: 1691-8.
33. Bates S, Parry D, Bonetta L, Vousden K, Dickson C, Peters G. Absence of cyclin D/cdk complexes in cells lacking functional retinoblastoma protein. *Oncogene* 1994; 9: 1633-40.
34. 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.
35. Hannon GJ, Beach D. p15^{INK4B} is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 1994; 371: 257-61.
36. Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y. Transcriptional repression of the D-type cyclin dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res* 1994; 54: 6078-82.
37. Lew J, Huang QQ, Qi Z, Winkfein RJ, Aebersold R, Hunt T, Wang JH. A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 1994; 371: 423-6.
38. Tsai LH, Takahashi T, Caviness Jr VS, Harlow E. Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system. *Development* 1993; 119: 1029-40.
39. Baumann K, Mandelkow EM, Biernat J, Piwnica-Worms H, Mandelkow E. Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett* 1993; 336: 417-24.
40. Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y. Growth suppression by p18, a p16^{INK4/MTS1}- and p14^{INK4B/MTS2}-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* 1994; 8: 2939-52.
41. Darbon JM, Devault A, Taviaux S, Fesquet D, Martinez AM, Galas S, Cavadore JC, Dorée M, Blanchard JM. Cloning, expression and subcellular localisation of the human homolog of p40^{MO15} catalytic subunit of cdk-activating kinase. *Oncogene* 1994; 9: 3127-38.
42. Roy R, Bergmann E, Egly J. TFIIF (BTF2), à l'interface de trois processus cellulaires: transcription, réparation et cycle cellulaire. *médecine/sciences* 1995; 11: 879-82.
43. Xiang J, Lahti JM, Grenet J, Easton J, Kidd VJ. Molecular cloning and expression of alternatively spliced PITSLRE protein kinase isoforms. *J Biol Chem* 1994; 269: 15786-94.
44. Lahti JM, Valentine M, Xiang J, Jones B, Amann J, Grenet J, Richmond G, Look AT, Kidd VJ. Alterations in the PITSLRE protein kinase gene complex on chromosome 1p36 in childhood neuroblastoma. *Nature Genet* 1994; 7: 370-5.
45. Bunnell BA, Heath LS, Adams DE, Lahti JM, Kidd VJ. Increased expression of a 58-kDa protein kinase leads to changes in the CHO cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7467-71.
46. Lahti JM, Xiang J, Heath LS, Campana D, Kidd VJ. PITSLRE protein kinase activity is associated with apoptosis. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 1-11.

activité kinasique est inhibée par au moins deux protéines de la famille p16^{INK4}: p15^{INK4B}, déjà mentionnée, et p18, dont les propriétés sont encore mal connues [40].

Cdk7 tient une place spéciale dans la famille Cdk. En effet, cette kinase, appelée aussi p40^{MO15}, phosphoryle Cdk1, Cdk2 et Cdk4 respectivement sur les résidus thréonine 161, 160 et 172, ce qui conditionne, comme il a été dit plus haut, leur activation comme H1K. Cdk7, contrôlant donc l'activité d'autres Cdk, partage avec elles un certain nombre de caractéristiques: (1) une analogie au niveau de la séquence des acides aminés (sans cependant avoir le motif xGxPxxxxREx, au lieu duquel on trouve NR-TALRE*) [41]; (2) la nécessité de former un complexe avec une cycline, la cycline H identifiée récemment [5]; (3) la nécessité de subir une phosphorylation sur une thréonine (Thr 170 chez l'homme) pour acquérir l'activité kinasique [5]. La thréonine 170 de Cdk7 est homologue des thréonines 161 de Cdk1, 160 de Cdk2 et 172 de Cdk4, toutes faisant l'objet de phosphorylations activatrices [5, 41]. Ni l'expression de la protéine Cdk7, ni son activité enzymatique ne varient au cours du cycle mitotique des cellules proliférantes, ce qui suggérerait un mécanisme particulier gouvernant son action sur les autres Cdk [41]*.

p58-GTA (*galactosyltransferase-associated*), découverte en association avec la galactosylotransférase et appelée actuellement p58^{CDCL1}, est un représentant d'un groupe comprenant au moins neuf protéines de 50-110 kDa. Elles sont issues probablement d'un épissage différentiel des transcrits de trois gènes différents, quoique fortement apparentés, nommés *PITSLRE A, B et C* [18, 43, 44]. Leur sous-unité régulatrice n'est pas connue. La séquence d'ADNc codant pour p58-GTA présente une analogie avec la famille *CDK*, et l'on retrouve le motif PITSLRE* dans l'extrémité NH2 de la chaîne peptidique [18, 45]. Leur sous-unité régulatrice n'est pas précisée. Une surexpression de la protéine p58-GTA dans les cellules CHO ralen-

* Rappelons aussi que Cdk7/p40^{MO15} est une des sous-unités du complexe TFIIF impliqué dans la transcription et la réparation de l'ADN [42].

tit la télophase et la phase G1 et entraîne des mitoses anormales [45]. Dans une autre étude, l'expression inadéquate de l'ADNc de p58-GTA dans les fibroblastes de CHO a provoqué l'apoptose. De manière similaire, le contenu cellulaire de la protéine p58-GTA et son activité enzymatique dans les cellules humaines T augmentent considérablement après la stimulation de l'apoptose par l'intermédiaire du récepteur Fas [46]. Il s'agit donc probablement d'une Cdk agissant sur le cycle cellulaire de manière totalement différente de la plupart des autres, c'est-à-dire favorisant non pas la prolifération, mais la mort cellulaire.

Nous avons passé en revue, de façon non exhaustive, quelques kinases de la famille Cdk. Leur place dans la régulation du cycle cellulaire est présentée de façon simplifiée sur la *figure 2* et dans le *Tableau I*. Bien que leur rôle soit probablement plus complexe qu'une simple activation des processus intracellulaires conduisant à la mitose ou à la méiose, l'activité de la plupart d'entre elles est nécessaire pour que la cellule accomplisse les étapes successives du cycle cellulaire, surtout les transitions G1/S et G2/M. On peut donc s'attendre à ce que leur hyperexpression soit associée à une activité proliférative excessive et à la transformation néoplasique de la cellule concernée, comme cela est observé lors de la dérégulation de certaines cyclines, surtout A, D1 et E [2].

Cdk et carcinogénèse : considérations expérimentales

L'hypothèse de la participation des Cdk à la pathogénèse des proliférations néoplasiques est étayée par les interactions observées entre certaines Cdk et des oncoprotéines virales, responsables de la transformation néoplasique des cellules infectées par le virus: E1A des adénovirus, antigène T de SV40 (*simian virus 40*) et E6/E7 de HPV (*human papilloma virus*). La transformation des cellules épithéliales de poumon de rat par l'antigène T de SV40 est suivie de l'augmentation importante (environ 20 fois), du contenu cellulaire de Cdk1 et cycline A [47]. De même, dans les kératinocytes humains transformés par les protéines

E6 et E7 de HPV 16 et 18, la concentration cellulaire des protéines Cdk1, cycline A et cycline B, augmente de 5 à 20 fois [48]. Dans ces deux observations, on n'a pas constaté d'augmentation comparable de l'expression des ARNm correspondants. Les oncoprotéines agiraient donc sur la traduction et/ou la régulation de la stabilité des protéines discutées, plutôt qu'au niveau de l'expression de leurs gènes. La dérégulation des protéines du complexe H1K pourrait donc constituer une étape de la carcinogénèse virale.

Expression anormale des Cdk dans les néoplasies

Comme il a été déjà signalé, des dérégulations des sous-unités régulatrices des Cdk, consistant en général en l'hyperexpression du gène, la synthèse accrue de la protéine, ou bien leur expression ectopique, ont été fréquemment observées dans des proliférations néoplasiques. Les rapports décrivant des troubles semblables au niveau des Cdk sont beaucoup moins nombreux. Yasui *et al.* ont étudié le contenu en protéine Cdk1 et l'activité H1K du tissu néoplasique de douze malades ayant un cancer de l'estomac et onze un cancer du côlon [49]. Chez presque tous les malades, la teneur en Cdk1 aussi bien que l'activité H1K étaient supérieures dans le tissu malin comparé à la muqueuse saine. Ces deux paramètres étaient corrélés entre eux; les auteurs n'ont cependant pas fourni la preuve que l'activité H1K mesurée était liée à Cdk1 et non pas à une autre Cdk. Il paraît possible que l'expression de Cdk1 dans ce matériel cellulaire traduise simplement une activité proliférative plus élevée du tissu néoplasique par rapport au tissu sain sans qu'il s'agisse d'une hyperexpression pathologique.

Une autre équipe, étudiant le contenu en ARNm et en protéine Cdk1 dans dix lignées cellulaires issues de cancers du sein, a montré que dans neuf d'entre elles celui-ci était augmenté par rapport au tissu sain correspondant. Cette augmentation accompagnait des anomalies quantitatives et qualitatives des ARNm et des protéines cycline A, B et E [50]. L'amplification modérée (3-5 fois)

du gène codant pour Cdk1 a été constatée dans trois cas sur vingt et un de leucémies de différents types cytologiques. Elle a été accompagnée d'une augmentation de l'ARNm correspondant et d'une activité proliférative élevée. Ce rapport mérite attention car il est le premier à montrer une liaison entre l'amplification du gène d'une Cdk et l'activation du cycle cellulaire, sans que l'on puisse conclure formellement à l'existence d'une relation de cause à effet entre ces deux phénomènes [51].

Cdk4 est une autre Cdk qui paraît impliquée dans la prolifération néoplasique. L'amplification de son gène ainsi que de certains gènes voisins (*MDM2* et *GLI*) a été observée dans deux lignées d'ostéosarcome. L'expression de l'ARNm et de la protéine de Cdk4 était également élevée [52]. L'analyse d'une série de 234 échantillons de tumeurs du cerveau de différents types histologiques a permis de détecter dans 19 d'entre eux une amplification de certains gènes de la région q13-14 du chromosome 12, allant de 8 jusqu'à plus de 70 fois. Dans 18 cas (12 glioblastomes sur 86, 5 astrocytomes anaplasiques sur 29 et 1 oligodendrogliome sur 17), c'étaient les gènes *CDK4* et *SAS* qui étaient concernés; chez 11 malades, le gène *MDM2* faisait, lui aussi, partie de la séquence amplifiée. L'amplification du nombre de copies de ces gènes était toujours accompagnée d'une augmentation, parfois très importante, de l'expression de l'ARNm correspondant [53]. Une autre étude a démontré une amplification du gène de Cdk4 dans le tissu tumoral de 7 cas sur 14 de glioblastomes et 3 cas sur 11 d'astrocytomes anaplasiques [54]. Notons que cette anomalie intéresse surtout des tumeurs d'une histologie plutôt agressive.

Les publications citées semblent confirmer l'hypothèse selon laquelle une activité excessive des kinases de la famille Cdk aboutit à une activité proliférative non contrôlée des cellules concernées, allant jusqu'à la transformation néoplasique. Plusieurs problèmes restent cependant à résoudre. Premièrement, nous ignorons si les anomalies de l'expression des Cdk sont primaires ou bien apparaissent secondairement, lors de la carcinogénèse. Deuxièmement, il n'a pas été démontré de façon formelle que

RÉFÉRENCES

47. Oshima J, Steinmann KE, Campisi J, Schlegel R. Modulation of cell growth, p34^{cdc2} and cyclin A levels by SV-40 large T antigen. *Oncogene* 1993; 8: 2987-93.
48. Steinmann KE, Pei XF, Stoeppler H, Schlegel R. Elevated expression and activity of mitotic regulatory proteins in human papillomavirus-immortalized keratinocytes. *Oncogene* 1994; 9: 387-94.
49. Yasui W, Ayhan A, Kitada Y, Nishimura K, Yokozaki H, Ito H, Tahara E. Increased expression of p34^{cdc2} and its kinase activity in human gastric and colonic carcinomas. *Int J Cancer* 1993; 53: 36-41.
50. Keyomarsi K, Pardee AB. Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1112-6.
51. Furukawa Y, Terui Y, Sakoe K, Ohta M, Kitagawa S, Miura Y, Saito M. Over-expression and amplification of the *CDC2* gene in leukaemia cells. *Br J Haematol* 1995; 90: 94-9.
52. Khatib ZA, Matsushime H, Valentine M, Shapiro DN, Sherr CJ, Look AT. Coamplification of the *CDK4* gene with *MDM2* and *GLI* in human sarcomas. *Cancer Res* 1993; 53: 5535-41.
53. Reifenger G, Reifenger J, Ichimura K, Meltzer PS, Collins VP. Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of *CDK4*, *SAS*, and *MDM2*. *Cancer Res* 1994; 54: 4299-303.
54. Schmidt EE, Ichimura K, Reifenger G, Collins VP. *CDKN2* (p16/MTS1) gene deletion or *CDK4* amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* 1994; 54: 6321-4.
55. 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.
56. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitian SV, Stockert E, Day III RS, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436-40.
57. Hebert J, Cayuela JM, Berkeley J, Sigaux F. Candidate tumor-suppression 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.
58. Chedid M, Micheli P, Lengel C, Huppi K, Givol D. A single nucleotide substitution at codon 31 (Ser/Arg) defines a polymorphism in a highly conserved region of the p53-inducible gene *WAF1/CIP1*. *Oncogene* 1994; 9: 3021-4.

l'hyperexpression cellulaire des gènes codant pour les Cdk aboutit à leur hyperactivité enzymatique. Troisièmement, enfin, le rôle causal de l'hyperexpression des *CDK* dans la pathogénie des proliférations néoplasiques n'a pas encore été prouvé sur un modèle de carcinogenèse expérimentale, comme par exemple sur des cellules ou des souris transgéniques exprimant de façon constitutionnelle et excessive des *CDK*.

Le problème de l'implication des Cdk dans la pathologie proliférative vient de se compliquer. Il a été constaté que le gène codant pour la kinase p58-GTA se trouve dans la région p36.3 du chromosome 1, qui est souvent l'objet d'une délétion dans les cellules de neuroblastomes, mélanomes familiaux, cancers du sein, du côlon et du rectum. La délétion des gènes codant pour la famille des kinases p58-GTA a été trouvée dans quelques lignées de neuroblastomes [44]. Rappelons, que p58-GTA, contrairement à la plupart des Cdk connues, aurait une fonction antiproliférative. Il n'est donc pas étonnant que ce soit son inactivation, et non pas son hyperexpression, qui participe au développement des tumeurs.

Anomalies de régulation de l'activité des Cdk dans les néoplasies

L'activité des Cdk peut être aussi perturbée dans des proliférations néoplasiques de façon indirecte du fait de la défaillance de leurs inhibiteurs. p16^{INK4} paraît particulièrement concerné par ce mécanisme.

Le gène codant pour cet inhibiteur est localisé dans la région p21 du chromosome 9, dont des anomalies, en particulier des délétions, ont été constatées dans plusieurs lignées cellulaires établies à partir des tumeurs de différentes origines, surtout des mélanomes familiaux (*m/s n° 2*, vol. 12, p. 225). Ce gène *INK4* a été aussi appelé *MTS1* (*multiple tumor suppressor 1*) ou *CDK4I* (*CDK4 inhibitor*) et, depuis sa description, de nombreuses publications en ont rapporté des anomalies dans beaucoup de tumeurs et surtout de lignées néoplasiques (*m/s n° 2*, vol. 12, p. 222 et p. 224) [55, 56]. Ces anomalies consistent le plus souvent en des délétions homozygotes, mais aussi en des mutations ponctuelles concernant particulièrement

l'exon 2. Des délétions concernant un ou deux exons du gène *MTS2* (*multiple tumor suppressor 2*), localisé dans la proximité du gène *MTS1* et codant pour la protéine p15^{INK4B}, ont été également décrites dans des tumeurs *de novo* [57].

Étant donné la fréquence des aberrations du gène *MST1* et/ou *MST2* dans les tissus néoplasiques, leur participation à la pathogénie de ces proliférations paraît très probable. Cependant, il n'a pas été établi quelles sont les conséquences *in vivo* de l'inactivation de ces gènes. En particulier, il reste à démontrer que le déficit de ces inhibiteurs aboutit à une hyperactivité de Cdk4 et, par conséquent, à l'inhibition de l'action antiproliférative de pRb.

p21^{WAF1/CIP1} est un autre inhibiteur qui peut être impliqué dans la carcinogenèse (*m/s n° 6-7*, vol. 10, p. 744) [12]. Comme il a été mentionné plus haut, l'expression de son gène est placée sous contrôle de p53. L'absence de la protéine p53 fonctionnelle, fréquemment rencontrée dans de nombreuses tumeurs, pourrait donc conduire à la transformation néoplasique par une expression insuffisante de cet inhibiteur, impliqué dans la régulation de plusieurs Cdk. Une observation a été déjà faite qui semble aller dans ce sens: Chedid *et al.* [58] ont trouvé, que dans 68 sur 74 lignées néoplasiques d'origine différente, l'expression de l'ARNm de p21^{WAF1/CIP1} était plus basse que dans le tissu contrôle. Cette observation demande cependant confirmation par d'autres études, qui préciseraient, en particulier, l'état de la protéine p53 dans les populations cellulaires n'exprimant pas le gène p21^{WAF1/CIP1}.

Conclusion

Pour résumer les données expérimentales et cliniques qui viennent d'être citées et qui concernent surtout les Cdk stimulant le cycle cellulaire, à savoir Cdk1, Cdk2, Cdk4, Cdk6 et probablement Cdk3, la notion de leur rôle probable dans la pathogénie des proliférations néoplasiques est étayée par les observations non seulement de leur hyperexpression, mais aussi du déficit de leurs inhibiteurs dans des cellules néoplasiques. Ce déficit pourrait résulter d'une mutation de leurs gènes ou

bien de l'inactivation de la protéine p53. Cependant, il paraît probable que les Cdk, du fait de leurs fonctions dans le métabolisme cellulaire dépassant la stimulation de la prolifération, soient impliquées dans la pathogénie d'autres maladies. Cela explique l'intérêt qui leur est porté non seulement par des scientifiques, mais aussi par un cercle de plus en plus large de médecins-chercheurs ■

Remerciements

Les auteurs remercient les organismes suivants: la Fondation de France contre la Leucémie, la Fondation pour la Recherche Médicale, les Ligues Régionales de Lutte contre le Cancer (Ardèche, Drôme, Rhône, Saône et Loire), l'Association pour la Recherche sur le Cancer, le Conseil Général du Rhône et les Hospices Civils de Lyon (soutien HCL PHRC 004), qui ont participé au financement du programme de recherche dans le cadre duquel cet article a été réalisé.

TIRÉS À PART

D. Wolowicz.

Note ajoutée aux épreuves

Depuis la rédaction de cette *synthèse*, une huitième Cdk a été identifiée dans un article paru en septembre 1995.

[Tassan JP, Jaquenoud M, Leopold P, Schultz SJ, Nigg EA. Identification of human cyclin dependent kinase 8 putative protein kinase partner for cyclin C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8871-5.]

Summary

Cyclin-dependent kinases: biological functions and involvement in human pathology

Cyclin dependent kinases (Cdks) is a family of serine-threonine protein kinases which plays a pivotal role in the eucaryote cell cycle regulation. The timing of their activation is determined by their post-translational modifications (phosphorylations/dephosphorylations), and by the association of a protein called cyclin, which is the regulatory subunit of the kinase complex. Cdks participate in the cell cycle regulation by phosphorylation of retinoblastoma susceptibility gene product (pRb) (Cdk4, Cdk6 and Cdk2), by interactions with transcription factors (Cdk2) and by phosphorylation of the histone H1 and other compounds of the mitotic apparatus (Cdk1). Cdk5 is probably not involved in the cell cycle regulation, but seems to participate in the cerebral metabolism. It was suggested that it plays a role in the pathogeny of Alzheimer's disease. p58-GTA is supposed to have an antiproliferative activity and to be involved in cellular death. The function of Cdk7 is to

activate other Cdks. A deregulation of Cdks, especially consisting of their hyperexpression, may contribute to the development of neoplastic disorders. This hypothesis is corroborated by observations of interactions between some Cdks and viral oncoproteins: E1A of adenovirus, T antigen of simian virus 40, E6/E7 of human papilloma virus. Involvement of Cdks in neoplastic disorders may result either from hyperexpression of their genes, as the Cdk4 gene in brain tumors, or from inactivation of their inhibitors. The inhibitors concerned are p16^{INK4} et p15^{INK4B}, whose genes are frequently deleted in cancer cell lines and fresh tumors, and p21^{WAF1/CIP1}, whose expression is p53-dependent and therefore may be impaired as a result of the inactivation of this oncoprotein. As for p58-GTA, contrarily to the cell cycle activating Cdks, it may be involved in the neoplastic transformation as a results of its deficiency.

Accès à la base de données internationale en immunogénétique : IMGT/LIGM-DB

La base de données IMGT/LIGM-DB (Immunoglobulines et Récepteurs T) qui, avec HLA-DB (Julia Bodmer, ICFR, Londres), appartient à la base de données internationale ImMunoGeneTics IMGT, est accessible, depuis le 10 juillet 1995, sur le serveur WWW du CNUSC (<http://imgt.cnusc.fr:8104>). IMGT/LIGM-DB contient à ce jour plus de 9 000 séquences (6 860 séquences d'immunoglobulines et 2 410 de récepteurs T) de 61 espèces différentes. Les fichiers à plat des séquences annotées (900) sont accessibles sur les serveurs ftp anonyme (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/imgt>) et WWW (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/imgt>) d'EMBL-EBI, depuis le 24 juin 1995.

Contact :

Pr. Marie-Paule Lefranc, Coordinateur de IMGT, Tél. : 67.61.36.34.
Fax : 67.04.02.31/45. E-mail : lefranc@ligm.crbm.cnrs-mop.fr