Document generated on 08/03/2025 5:38 p.m.

M/S : médecine sciences

Régulation de p16^{INK4a}, sénescence et oncogenèse
Regulation of p16^{INK4a}, senescence and oncogenesis

Wei Wen Chien and Martine Ffrench

Volume 22, Number 10, octobre 2006

Biophotonique et imagerie

URI: https://id.erudit.org/iderudit/013821ar

See table of contents

Publisher(s)

SRMS: Société de la revue médecine/sciences
Éditions EDK

ISSN

0767-0974 (print)
1958-5381 (digital)

Explore this journal

Cite this article

Chien, W. W. & Ffrench, M. (2006). Régulation de p16^{INK4a}, sénescence et oncogenèse. *M/S : médecine sciences*, *22*(10), 865–871.

Article abstract

The transcriptional regulation of p16^{INK4a} is essential for cellular aging and oncogenic stress response. This regulation involves p16^{INK4a} transcriptional activators such as proteins Ets1 and 2 or E47. The binding of these proteins to *INK4a* promoter can be inhibited by proteins Id-1 or -4 after heterodimer formation. The transcriptional inhibition of p16^{INK4a} includes also the transcriptional repression by Bmi-1, and an epigenetic regulation which appears complex and remains incompletely understood. Actually, *INK4a* promoter and exon1 present a CpG island which can be methylated on cytosines by DNA methyltransferases. This DNA methylation is preceded by the lysine 9 histone H3 methylation and by the deacetylation of histone H4 both involved in gene silencing. Indeed, RNA Helicase A might protect *INK4a* against methylation of CpG island. Furthermore, chromatin remodelling involving SWI/SNF complex, antagonist to Bmi-1, might activate *INK4a* expression. The analysis of *INK4a* regulation mechanisms and the comprehension of the epigenetic modulation of its expression may allow us to develop a rational use of new anti-neoplastic agents.

Tous droits réservés © M/S : médecine sciences, 2006

This document is protected by copyright law. Use of the services of Érudit (including reproduction) is subject to its terms and conditions, which can be viewed online.

https://apropos.erudit.org/en/users/policy-on-use/

This article is disseminated and preserved by Érudit.

Érudit is a non-profit inter-university consortium of the Université de Montréal, Université Laval, and the Université du Québec à Montréal. Its mission is to promote and disseminate research.

https://www.erudit.org/en/

MEDECINE/SCIENCES 2006 ; 22 : 865-71

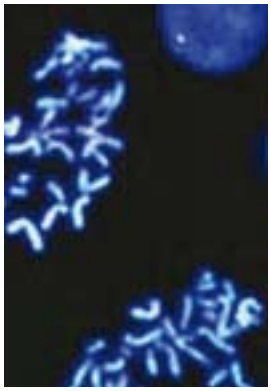
Régulation de p16^{INK4a}, sénescence et oncogenèse

Wei Wen Chien, Martine Ffrench

> La régulation transcriptionnelle de l'expression de p16^{INK4a} constitue un pivot essentiel lors du vieillissement cellulaire et de la réponse à un stress, en particulier oncogénique. Cette régulation, complexe, implique des facteurs activateurs (protéines Ets1 et -2, protéine E47), dont la liaison sur le promoteur du gène *INK4a* peut être inhibée par les protéines Id-1 ou -4. L'inhibition transcriptionnelle de p16^{INK4a} repose également sur le répresseur transcriptionnel Bmi1, ainsi que sur une régulation épigénétique complexe, dont le mécanisme est seulement partiellement connu : le promoteur et l'exon 1 de *INK4a* présentent tous deux un îlot CpG, qui peut être méthylé après qu'une méthylation de l'histone H3 et une désacétylation de l'histone H4 soient intervenues, tous ces événements participant à l'extinction du gène. À l'inverse, le gène *INK4a* serait protégé de la méthylation de ses ilôts CpG par l'hélicase A de l'ARN, et le remodelage chromatinien faisant intervenir le complexe SWI/SNF, antagoniste de Bmi1, activerait l'expression de *INK4a*. L'analyse de la complexité des différents mécanismes de régulation de *INK4a* et une meilleure compréhension des modulations épigénétiques de son expression devraient permettre de développer l'utilisation rationnelle de nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses. <

La protéine p16^{INK4a}, un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines (CDK4 et CDK6) de la phase G1 du cycle cellulaire [1], est impliquée dans l'activité transcriptionnelle de la cellule à plusieurs titres : inhibition de la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb), inhibition directe de NFκB [2], régulation de l'activité de Myc [3] et inhibition de CDK7, démontrée *in vitro* [4]. Les conséquences d'une dérégulation de l'expression du gène *INK4a* peuvent donc être multiples, comme en témoignent la très fréquente association de sa délétion [5] ou de son inactivation par méthylation [6] avec les processus cancéreux, ou encore l'apoptose rapide provoquée par son hyperexpression [7-9].

Article reçu le 23 septembre 2005, accepté le 23 décembre 2005.



W.W. Chien : Laboratoire de cytologie analytique, Faculté de médecine, EA3737, 69373 Lyon Cedex 08, France.
M. Ffrench : Laboratoire d'hématologie, CHLS, 165, chemin du Grand Revoyer, 69495 Pierre-Bénite Cedex, France.
martine.ffrench@chu-lyon.fr

Protéines p16^{INK4a} et p14^{ARF}

Le locus *INK4a/ARF* humain, situé sur le chromosome 9 en 9p21, comporte deux gènes, *INK4a* et *ARF*, qui expriment respectivement les transcrits α et β : ces transcrits codent pour les protéines p16^{INK4a} et p14^{ARF} (p19^{ARF} chez la souris), distinctes sur les plans structural et fonctionnel [10].

Si l'expression de p16^{INK4a} ne varie pas au cours du cycle cellulaire [11], elle est augmentée dans certains cas d'inhibition fonctionnelle de pRb [12], au cours de la sénescence réplicative [11] ou, encore, lors de l'activation de certaines voies oncogéniques induisant une sénescence prématurée [13]. La protéine p14^{ARF}, quant à elle, s'associe à MDM2 et régule le cycle cellulaire par stabilisation indirecte de p53, qui active le gène de p21^{CIP1}, un autre inhibiteur de CDK [14]. Les voies p16^{INK4a}/pRb et p14^{ARF}/p53/p21 sont également impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN [15].

Chez la souris, l'invalidation du gène *INK4a*, à l'inverse de celle du gène *ARF*, ne provoque pas l'apparition de tumeurs spontanées [16]. Chez l'homme, en revanche, les données expérimentales suggèrent que le gène *INK4a*, plus que le gène *ARF*, serait un répresseur de tumeur majeur [17-19]. Par ailleurs, dans un contexte de prédisposition familiale au mélanome, les fibroblastes diploïdes humains (FDH), qui présentent une délétion homozygote de 19 nucléotides dans l'exon 2 du locus *INK4a/ARF*, expriment une protéine p16^{INK4a}

non fonctionnelle et une protéine p14^{ARF} fonctionnelle : or ces fibroblastes résistent à la sénescence prématurée induite par l'oncogène Ras [18]. Chez l'homme, le contrôle de l'expression de p16^{INK4a} constitue donc un pivot essentiel, aussi bien pour la régulation du vieillissement cellulaire que pour la réponse à un stress, en particulier oncogénique.

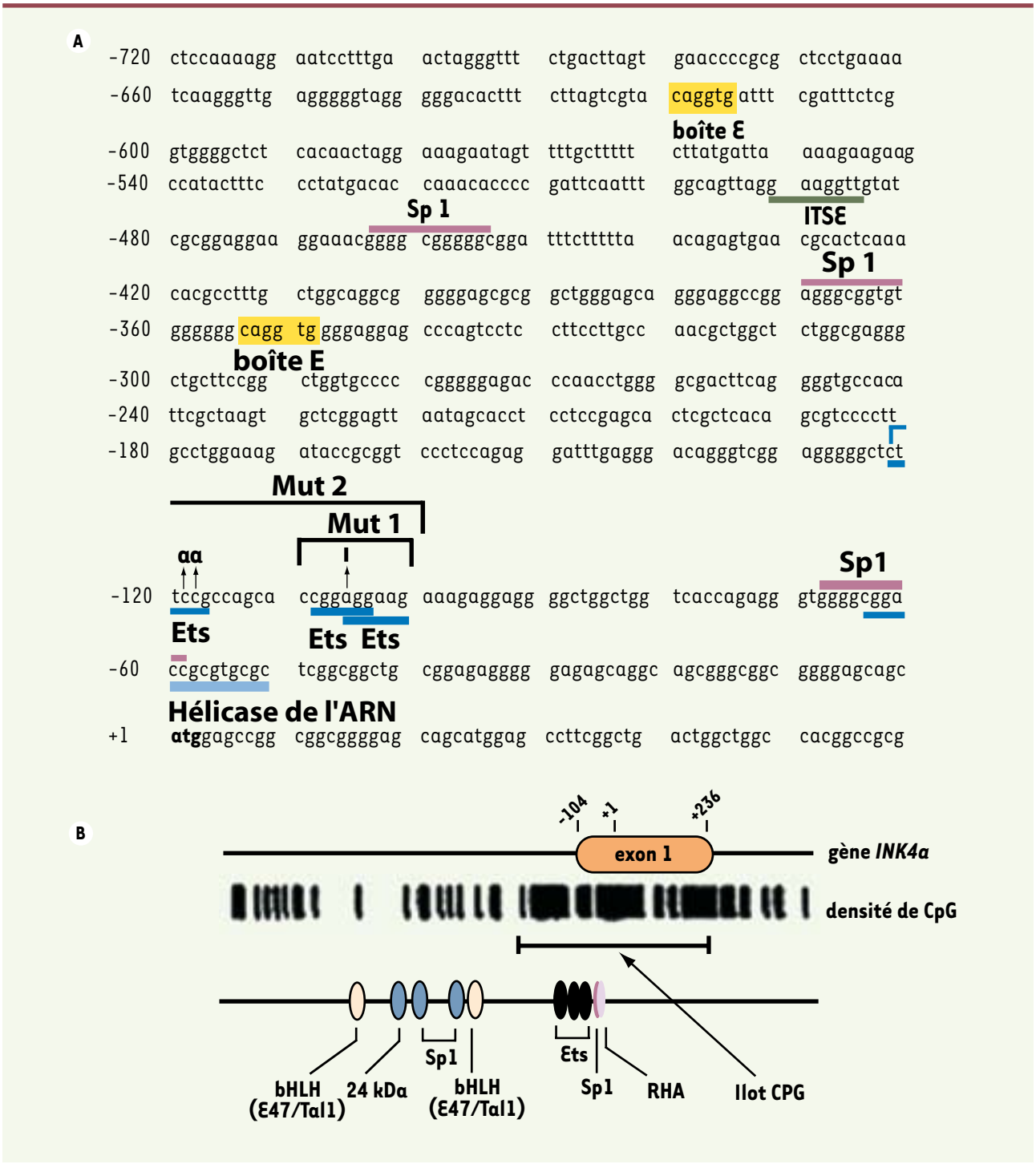


Figure 1. ***Le promoteur de INK4a. A.*** Séquence de la région promotrice de *INK4a* (GenBank : X94154) et sites consensus de fixation de ses facteurs régulateurs : sites Ets [23], boîtes E [25], sites de Sp1 [44], site de RHA [44] et site de ITSE [48]. ***B.*** L'extrémité 5' de *INK4a* présente un îlot CpG incluant l'exon 1 et 139 pb en amont de celui-ci. L'exon 1 comporte 340 pb : +1 indique le premier nucléotide de traduction ; les 104 premiers nucléotides de l'exon 1 correspondent à une région non codante ; les extrémités de l'exon 1 sont annotées –104 et +236 (GenBank : U12818) [6].

L'analyse séquentielle du promoteur de *INK4a* montre différents sites consensus pour la fixation de facteurs de transcription *(Figure 1A)*. Par ailleurs, le promoteur et l'exon 1 de *INK4a* présentent un îlot CpG [6] qui recouvre un certain nombre de ces sites consensus *(Figure 1B)* ; sa méthylation, anormale, induit l'extinction du gène.

Bien qu'une régulation post-transcriptionnelle de *INK4a* ait été décrite [20], l'analyse conjointe de l'ARNm et de la protéine montre que c'est essentiellement au niveau transcriptionnel qu'intervient sa régulation [11, 12, 21] : l'étude de la transcription d'*INK4a* devrait donc permettre de déterminer les facteurs impliqués dans sa régulation, et donc dans la sénescence cellulaire, facteurs dont le dérèglement serait à l'origine du développement de tumeurs.

Facteurs activateurs et inhibiteurs de la transcription d'*INK4a*

Activateurs de la transcription

Protéines Ets1 et Ets2

Ets1 et Ets2 (Ets1/2) activent le promoteur de *INK4a* en réponse à l'activation de la voie Ras/Raf/MEK : de fait, l'activation des oncogènes Ras [13] ou Raf [22], ou celle de MEK [23], induit une sénescence prématurée, avec augmentation de l'expression de $p16^{INK4a}$; l'hyperexpresion des facteurs transcriptionnels Ets1/2 par la voie Ras/Raf/MEK induit la transcription de *INK4a*, un blocage en phase G1 du cycle cellulaire et la sénescence prématurée des fibroblastes humains [23]. Ets1/2 activent le promoteur de *INK4a* en se liant directement à leurs sites consensus Ets : ainsi, les mutations Mut 1 et Mut 2 qui affectent les sites consensus Ets au niveau du promoteur du gène *INK4a* *(Figure 1A)* empêchent l'induction de son activité par Ets2 [23].

L'activité du promoteur de *INK4a*, normalement induite par Ets2 [24], est inhibée par la protéine LMP1 du virus d'Epstein-Barr : Ets2 ne s'associe pas au promoteur de *INK4a*, et s'accumule dans le cytoplasme alors que sa localisation normale est nucléaire et cytoplasmique. Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de $p16^{INK4a}$ et la sénescence prématurée provoquée par l'oncogène Ras dans les FDH se trouvent inhibées par l'expression ectopique de LMP1.

Protéine bHLH E47

Les facteurs de transcription hélice-boucle-hélice basique (bHLH) possèdent un domaine HLH de dimérisation protéique, ainsi qu'un domaine riche en acides aminés basiques pour leur association avec l'ADN. Les protéines E, bHLH de classe A, sont exprimées de façon ubiquitaire et capables de former des homodimères. Les protéines bHLH de classe B, exprimées avec une spécificité tissulaire, forment des hétérodimères avec les protéines bHLH de classe A. Les dimères de protéines bHLH régulent la transcription des gènes en s'associant, par leur domaine basique, avec une séquence spécifique de l'ADN (CANNTG), nommée boîte E. Le promoteur de *INK4a* présente deux boîtes E *(Figure 1A)*.

Une surexpression de la protéine E47, bHLH de classe A, inhibe la prolifération de certaines lignées tumorales humaines et active le promoteur de *INK4a*, tandis que la délétion des deux boîtes E abroge cet effet [25]. Par ailleurs, l'inhibition de l'expression de E47 par interférence par l'ARN (utilisation de *siRNA*) induit une diminution significative de l'expression de $p16^{INK4a}$ dans les FDH jeunes, et retarde leur sénescence réplicative [26]. À l'inverse, l'expression ectopique d'une protéine bHLH de classe B, Tal1, inhibe l'activité du promoteur du gène *INK4a* induite par la protéine E47, en formant avec elle des hétérodimères [27].

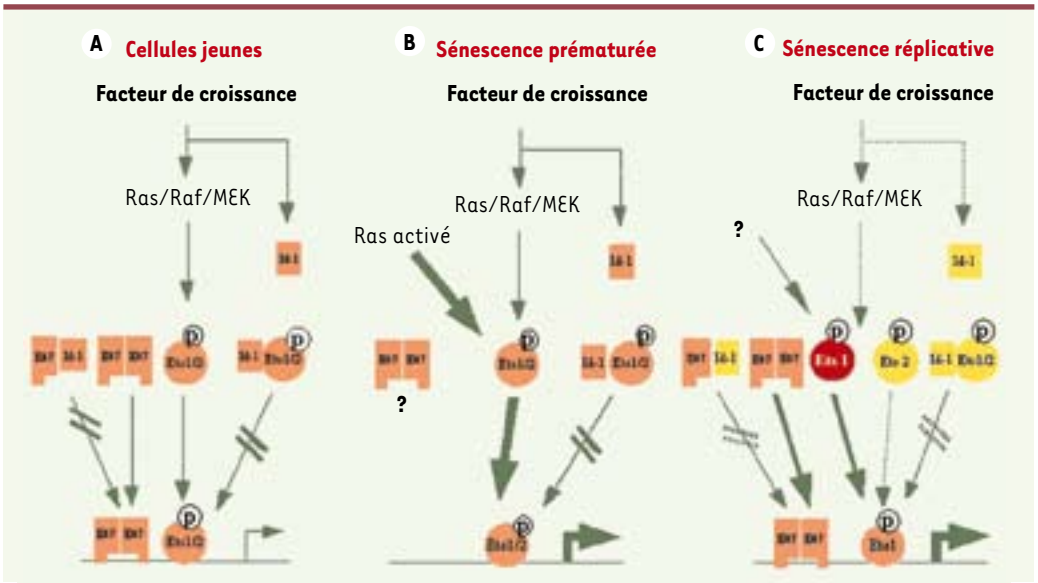


Figure 2. ***Rôle de Id-1, Ets1/2 et E47 sur la transcription de INK4a dans les fibroblastes humains. A.*** Les cellules jeunes présentent une expression relativement faible de INK4a. Sous l'influence de signaux de prolifération, Id-1 contrebalance, par formation d'hétérodimères, la fonction activatrice des protéines Ets 1/2 (phosphorylées) et E47 [23, 26]. ***B.*** L'activation de la voie Ras/Raf/MEK entraîne une sénescence prématurée, accompagnée d'une forte expression de *INK4a via* une forte activation de Ets1/2 [13, 23]. ***C.*** Au cours de la sénescence réplicative, l'augmentation de l'expression de Ets 1 s'accompagne d'une diminution de l'expression de Id-1, le tout aboutissant à une augmentation de l'expression de *INK4a* [23, 26]. La transition de couleurs (du jaune à l'orange puis au rouge) reflète l'importance de l'expression protéique ; l'épaisseur des flèches reflète l'importance de l'activation ; ⊣/↛ : absence d'activation ; ↱ : transcription.

Inhibiteurs de la transcription

Protéines HLH Id

À la différence des protéines bHLH, les protéines HLH Id (Id-1,2,3,4) ne possèdent pas de domaine basique d'association avec l'ADN.

Ainsi, Id-1 est nécessaire à la progression des FDH jeunes en G1 [28], et différentes observations indiquent un rôle potentiel inhibiteur de Id-1 sur p16^{INK4a} : l'expression de Id-1 est négativement corrélée à celle de p16^{INK4a} au cours de la sénescence cellulaire [23,26] ; les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) *Id-1*$^{+/+}$ expriment faiblement p16^{INK4a}, tandis que les MEF invalidés pour Id-1 (*Id-1*$^{-/-}$) l'expriment fortement [29] ; l'hyperexpression de la protéine Id-1 retarde la sénescence réplicative et inhibe l'expression de p16^{INK4a} dans les cellules humaines [30, 31] ; enfin, l'augmentation de l'expression d'Id-1 est corrélée avec la diminution de l'expression de p16^{INK4a} dans les mélanomes de stade précoce [32].

Il semble que les protéines Id inhibent la transcription de *INK4a* en se liant aux protéines bHLH ou Ets : en formant des hétérodimères avec E47 par leur domaine HLH, elles inhibent son association avec l'ADN au niveau des boîtes E [33] ; par ailleurs, Id-1 s'associe également à Ets2 [23], la formation des hétérodimères Id/Ets2 diminuant significativement l'activation du promoteur de *INK4a* par Ets2 lorsque les sites consensus Ets ne sont pas mutés [23]. L'ensemble de ces données suggère donc que la protéine Id-1 inhibe la transcription d'*INK4a* en empêchant E47 et Ets2 de se lier à leurs sites consensus au niveau du promoteur du gène.

Protéine Bmi1

Bmi1 est un répresseur transcriptionnel appartenant au groupe *Polycomb* (PcG). Les MEF invalidés pour Bmi1 (*Bmi1*$^{-/-}$) présentent un phénotype de sénescence prématurée, avec augmentation de l'ARNm de *INK4a* et de *ARF* par rapport aux MEF l'exprimant (*Bmi1*$^{+/+}$) ; l'expression induite de Bmi1 dans les MEF *Bmi1*$^{-/-}$ corrige ce phénomène [34]. Les MEF *Bmi-1*$^{-/-}$ *INK4a*$^{+/+}$ présentent également un phénomène de sénescence prématurée, non observé dans les MEF *Bmi1*$^{-/-}$ *INK4a*$^{-/-}$: le gène *INK4a* est donc une cible du facteur Bmi1, qui régule négativement sa transcription [34].

Une diminution de l'expression de Bmi1 est observée au cours de la sénescence réplicative des fibroblastes humains, et son hyperexpression provoque une diminution de l'expression de p16^{INK4a} [35]. Le facteur Bmi1 humain possède en son extrémité aminoterminale un domaine en doigt RING (RF), impliqué dans l'interaction protéique, et un domaine central porteur d'une triple hélice-boucle (HT), ces deux domaines étant tous deux nécessaires à l'inhibition de l'expression de *INK4a*. De plus, différentes données expérimentales montrent que, chez l'homme, Bmi1 régule la prolifération et la sénescence cellulaire par inhibition de la voie p16^{INK4a}/pRb, mais non de la voie p14^{ARF}/p53 [35] ; cependant, le mécanisme de cette inhibition est encore très mal connu [36].

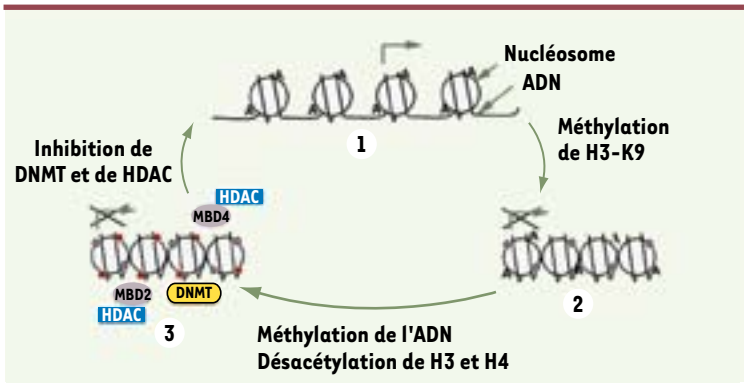


Figure 3. ***Régulation épigénétique de* INK4a *par modifications post-traductionnelles des histones et méthylation de l'ADN. 1.*** L'absence de méthylation de l'îlot CpG de *INK4a* et l'acétylation (A) des histones H3 ou H4 autorisent la transcription du gène [40]. ***2.*** La méthylation de l'histone 3 sur sa lysine 9 (H3-K9, ○) inhibe la transcription de INK4a et précède la méthylation de l'ADN (•) [40]. ***3.*** La méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones entraînent un blocage spécifique de la transcription lié à l'action des complexes répresseurs MBD2/4 (protéines associées aux îlots CpG méthylés) et à la désacétylase d'histone (HDAC) [41-43]. L'inhibition des méthyltransférases de l'ADN (DNMT) et des HDAC rend au promoteur ses capacités transcriptionnelles [37-39, 41].

Régulation transcriptionnelle d'INK4a au cours de la sénescence cellulaire

Dans les fibroblastes diploïdes humains jeunes, l'expression de p16^{INK4a} est faible ; en réponse à l'activation de la voie Ras/Raf/MEK, Id-1 contrebalance l'action de Ets1/2 et de E47 sur le promoteur de *INK4a* [23, 26] *(Figure 2A)*.

Lors de la sénescence prématurée provoquée par l'activation de l'oncogène Ras, la forte activation de Ets1/2 entraîne une augmentation de l'expression de p16^{INK4a} *(Figure 2B)* [13, 23].

Au cours de la sénescence réplicative, l'expression de E47 ne varie pas, celle de Ets1 augmente, tandis que l'expression de Id-1 et de Ets2 diminue ; parallèlement, l'expression de p16^{INK4a} augmente. L'absence de MEK activé dans les FDH sénescents suggère que l'activation de Ets2, qui intervient dans les FDH jeunes en réponse à l'activation de la voie Ras/Raf/MEK, n'est pas ici responsable de l'hyperexpression de p16^{INK4a} : celle-ci pourrait être liée à une augmentation, non encore expliquée, de Ets1, associée à une diminution de l'expression d'Id-1 et à une diminution de l'interaction entre Id-1 et E47 [23, 26] *(Figure 2C)*.

Régulation épigénétique de l'expression de *INK4a*

Méthylation des îlots CpG

Le promoteur et l'exon 1 du gène *INK4a* présentent un îlot CpG [6] *(Figure 1B)* dont la méthylation, sur les résidus cytosine, inhibe la transcription du gène. Cette méthylation d'*INK4a* est retrouvée dans de très nombreuses tumeurs [6] ; *INK4a* pourrait donc être une cible privilégiée pour les traitements modulateurs de la méthylation, ou de l'acétylation. Les méthyltransférases de l'ADN (DNMT) sont importantes aussi bien pour la méthylation post-réplicative de l'ADN contenant des îlots CpG hémiméthylés (DNMT1) que pour sa méthylation *de novo* (DNMT3A/3B) ; de fait, la transcription de *INK4a* peut être réactivée dans différentes lignées tumorales humaines en inhibant les DNMT, par la 5-aza-2'désoxycytidine (5-aza-CdR) [37], ou spécifiquement l'enzyme DNMT1, par des oligonucléotides antisens ou des *siRNA* [38, 39].

Méthylation de l'histone H3

Les cellules HCT116 de cancer du côlon présentent un allèle sauvage de *INK4a* (*INK4a*^{wt}) inhibé par méthylation de l'ADN,

et un allèle muté (*INK4a*^{mut}), non méthylé, produisant une protéine tronquée inefficace. L'invalidation des gènes codant pour les méthyltransférases de l'ADN DNMT1 et DNMT3B, par recombinaison homologue ciblée dans ces cellules, lève l'inhibition de *INK4a*^{wt} ; pourtant, au passage 22 après l'invalidation des deux gènes, *INK4a*^{wt} est à nouveau complètement inhibé, alors même que l'ADN n'est pas méthylé. En fait, la déméthylation de l'ADN est suivie de modifications post-traductionnelles des histones, par méthylation et acétylation ; or la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 est capable de provoquer l'extinction de *INK4a*^{wt}. Cette modification précède la méthylation de *INK4a*^{wt} et la désacétylation de H4 (toutes deux sont observées au passage 87), qui serviraient à maintenir la chromatine dans un état de répression spécifique [40] *(Figure 3)*.

Rôle des protéines MBD2/4

Différentes protéines (MBD1/2/3/4, MeCP1/2) peuvent s'associer par leur domaine MBD (*methyl-CpG binding domain*) aux îlots CpG méthylés [41, 42]. En absence d'acétylation de H3 et de H4, MBD2 (et MBD4) s'associent au promoteur méthylé de *INK4a* et recrutent des corépresseurs et des désacétylases d'histone (HDAC), entraînant ainsi une inhibition de la transcription du gène [42, 43].

Dans différentes lignées tumorales humaines, le traitement par la trichostatine A (TSA), un inhibiteur d'HDAC qui favorise l'acétylation des histones H3 et H4, mais n'induit pas de changement dans l'association entre MBD2 et le promoteur de *INK4a,* n'augmente pas l'expression de *INK4a*. En revanche, une augmentation, certes modérée, de l'expression de *INK4a* est observée dans les lignées traitées par la 5-aza-CdR, qui provoque une diminution de l'association entre MBD2 et le promoteur de *INK4a*, et une faible augmentation de l'acétylation des histones H3 et H4. Dans le même sens, un traitement combiné par 5-aza-CdR et TSA conduit à une forte induction de l'expression de *INK4a*. Les modulations de la méthylation de l'ADN et de l'acétylation des histones coopèrent donc pour réguler l'expression de *INK4a* [41].

Intervention de l'hélicase A de l'ARN

Le promoteur de *INK4a* comporte trois boîtes GC, sites consensus de fixation du facteur de transcription Sp1. Le rôle de Sp1 dans la protection de l'îlot CpG d'*INK4a* contre la méthylation a été examiné : les résultats montrent que le degré de méthylation du promoteur d'*INK4a* n'influe pas sur la liaison de Sp1 [44]. Lors de cette analyse, une liaison de l'hélicase A de l'ARN humain (RHA) sur le promoteur d'*INK4a* a été mise en évidence, au niveau d'une séquence 5'-CGGACCGCGTGCGC-3' située en aval et chevauchant le site consensus de Sp1 *(Figure 1A)* ; l'intensité de cette liaison est inversement proportionnelle au degré de méthylation du promoteur, et pourrait être modulée par l'acétylation de la RHA ; de plus, l'expression de RHA exogène peut augmenter l'activité du promoteur de *INK4a*. Le facteur Sp1 seul n'est donc pas suffisant pour protéger des îlots CpG de la méthylation ; il est possible que la RHA augmente l'accessibilité du promoteur d'*INK4a* aux activateurs de la transcription tels que Sp1, le protégeant ainsi contre la méthylation de son îlot CpG [44].

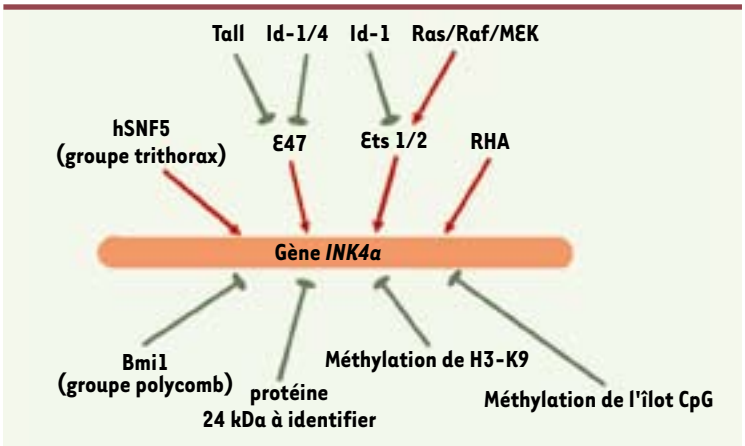


Figure 4. ***Mécanismes régulant la transcription de INK4a.***

Autres modifications épigénétiques

Le complexe SWI/SNF, qui appartient à la famille des facteurs du remodelage chromatinien dépendants de l'ATP, rend le génome plus accessible aux protéines associées à l'ADN en affaiblissant le contact entre les nucléosomes et l'ADN. Chez la levure, SWI/SNF modifie la structure du nucléosome en hydrolysant l'ATP grâce à sa sous-unité SWI2/SNF2-ATPase. Le complexe SWI/SNF humain (hSWI/SNF) contient, quant à lui, la protéine BRG1, homologue de SWI2/SNF2 [45]. Le gène *SNF5* humain (*hSNF5*), muté dans les tumeurs malignes rhabdoïdes (MRT) qui code pour une sous-unité du complexe hSWI/SNF, stimule *in vitro* l'activité BRG1 ; surexprimé de façon expérimentale dans les MRT, le facteur hSNF5 s'associe au promoteur de *INK4a* et y recrute BRG1, entraînant alors une activation de la transcription de *INK4a* [45].

Les membres du complexe SWI/SNF sont des activateurs, appartenant au groupe trithorax, qui contrebalancent l'action d'inhibiteurs appartenant, quant à eux, au groupe des protéines *Polycomb* (PcG), telle Bmi1 : hSNF5 et Bmi1 pourraient ainsi fonctionner de façon antagoniste pour la régulation de *INK4a*. De fait, les protéines PcG regroupent au moins deux complexes protéiques distincts, le complexe répresseur 1 de *Polycomb* (PRC1) et le complexe ESC-E(Z) [46]. La protéine E(Z) aurait la capacité de méthyler l'histone H3 sur sa lysine 27 (H3-K27), signal de recrutement du complexe PRC1 sur l'élément de réponse à PcG. En bloquant l'accessibilité des facteurs du remodelage chromatinien tels que SWI/SNF, le recrutement de PRC1 s'accompagnerait alors d'une inhibition de l'expression des gènes [46] : la méthylation de H3-K27 pourrait donc interférer avec les rôles, antagonistes, de hSNF5 et Bmi1, ce qui souligne encore la complexité de la régulation transcriptionnelle de *INK4a* *(Figure 4)*.

Conclusions

L'analyse du promoteur de *INK4a* montre l'existence d'éléments de réponse pour d'autres facteurs de transcription dont l'action

n'a pas encore été démontrée chez l'homme (JunB) [47], ou qui n'ont pas encore été identifiés (ITSE, *INK4a transcription silence element*) [48]. La dérégulation de nombreux mécanismes et facteurs participant à la régulation de *INK4a* a été associée au développement de divers types de tumeurs : méthylation aberrante du promoteur [6], inactivation du gène *hSNF5* par mutation impliquée dans des tumeurs malignes rhabdoïdes [45], dérégulation de Bmi1 qui, par son interaction avec c-myc, est impliquée dans la lymphomagenèse chez la souris [49] ; forte expression de Tal1 (*T-cell acute leukemia 1*), impliquée dans la leucémogenèse [27]. L'analyse de la complexité des différents mécanismes de régulation de *INK4a* et une meilleure compréhension des modulations épigénétiques de son expression devraient permettre de développer l'utilisation rationnelle de nouvelles thérapeutiques, telles que les siARN ou les inhibiteurs de méthylases ou de désacétylases d'histone. ◊

REMERCIEMENTS

Nous remercions les comités de la Ligue contre le cancer de Saône-et-Loire, du Rhône et de la Drôme pour leur soutien financier.

GLOSSAIRE

ARF : *alternative reading frame*
bHLH : hélice-boucle-hélice basique
Bmi1 : *B lymphoma Mo-MLV insertion region 1*
BRG1 : *brahma-related gene 1*
CDK : *cyclin-dependant kinase*
DNMT : *DNA methyl-transferase*
ERK : *extracellular signal-regulated kinase*
FDH : fibroblastes diploïdes humains
HDAC : *histone deacetylase*
INK4a : *inhibitor of CDK4*
ITSE : *INK4a transcription silence element*
LMP1 : *latent membrane protein 1*
MAPK : *mitogen-activated protein kinase*
MBD2/4 : *methyl-CpG binding domain 2/4*
MDM2 : *murine double minute 2*
MeCP1/2 : *methyl-CpG binding protein 1/2*
MEF : fibroblastes embryonnaires de souris
MEK : *MAPK-ERK kinase*
MRT : *Malignant rhabdoid tumor*
PcG : *Polycomb group*
PRC1 : *Polycomb repressor complex 1*
RHA : *RNA helicase A*
siRNA : *small interfering RNA*
SWI/SNF : *mating-type switch/sucrose nonfermenting*
TAL1 : *T-cell acute leukemia 1*

SUMMARY

Regulation of p16^{INK4a}, senescence and oncogenesis

The transcriptional regulation of p16^{INK4a} is essential for cellular aging and oncogenic stress response. This regulation involves p16^{INK4a} transcriptional activators such as proteins Ets1 and 2 or E47. The binding of these proteins to *INK4a* promoter can be inhibited by proteins Id-1 or -4 after heterodimer formation. The transcriptional inhibition of p16^{INK4a} includes also the transcriptional repression by Bmi-1, and an epigenetic regulation which appears complex and remains incompletely understood. Actually, *INK4a* promoter and exon1 present a CpG island which can be methylated on cytosines by DNA methyltransferases. This DNA methylation is preceded by the lysine 9 histone H3 methylation and by the deacetylation of histone H4 both involved in gene silencing. Indeed, RNA Helicase A might protect *INK4a* against methylation of CpG island. Furthermore, chromatin remodelling involving SWI/SNF complex, antagonist to Bmi-1, might activate *INK4a* expression. The analysis of *INK4a* regulation mechanisms and the comprehension of the epigenetic modulation of its expression may allow us to develop a rational use of new anti-neoplastic agents. ◊

RÉFÉRENCES

1. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclinD/CDK4. *Nature* 1993 ; 366 : 704-7.
2. Wolff B, Naumann M. INK4 cell cycle inhibitors direct transcriptional inactivation of NF-kappaB. *Oncogene* 1999 ; 18 : 2663-6.
3. Haas K, Staller P, Geisen C, *et al.* Mutual requirement of CDK4 and Myc in malignant transformation : evidence for cyclin D1/CDK4 and p16INK4A as upstream regulators of Myc. *Oncogene* 1997 ; 10 : 179-92.
4. Serizawa H. Cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4A inhibits phosphorylation of RNA polymerase II by general transcription factor TFIIH. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 5427-30.
5. Nobori T, Miura K, Wu DJ, *et al.* Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994 ; 368 : 753-6.
6. Merlo A, Herman JG, Mao L, *et al.* 5'pG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995 ; 1 : 686-92
7. Sandig V, Brand K, Herwig S, *et al.* Adenovirally transferred p16INK4/CDKN2 and p53 genes cooperate to induce apoptotic tumor cell death. *Nat Med* 1997 ; 3 : 313-9.
8. Kim M, Katayose Y, Rojanala L, *et al.* Induction of apoptosis in p16INK4A mutant cell lines by adenovirus-mediated overexpression of p16INK4A protein. *Cell Death Differ* 2000 ; 7 : 706-11.
9. Ausserlechner MJ, Obexer P, Geley S, *et al.* G1 arrest by p16INK4A uncouples growth from cell cycle progression in leukemia cells with deregulated cyclin E and c-Myc expression. *Leukemia* 2005 ; 19 : 1051-7.
10. Sharpless NE, DePinho RA. The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* 1999 ; 9 : 22-30
11. Hara E, Smith R, Parry D, *et al.* Regulation of p16^{CDKN2} expression and its implication for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol* 1996 ; 16 : 859-67
12. Li Y, Nicolas MA, Shay JW, *et al.* Transcriptional repression of the D-type cyclin dependent kinase inhibitor p16 by retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res* 1994 ; 54 : 6078-82.
13. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, *et al.* Oncogenic *ras* provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16^{INK4a}. *Cell* 1997 ; 88 : 593-602.
14. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53 : ARF-INK4a locus deletion impairs both the pRb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 1998 ; 92 : 725-34.
15. Shapiro GI, Edwards CD, Ewen ME, *et al.* p16^{ink4a} participates in a G1 arrest checkpoint in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 1998 ; 18 : 378-87.
16. Krimpenfort P, Quon K.C, Mooi WJ, *et al.* Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* 2001 ; 413 : 83-6.
17. Serrano M, Lee H, Chin L, *et al.* Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 1996 ; 85 : 27-37.
18. Brookes S, Rowe J, Ruas M, *et al.* INK4a-deficient human diploid fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence. *EMBO J* 2002 ; 21 : 2936-45.
19. Drayton S, Rowe J, Jones R, *et al.* Tumor suppressor p16INK4a determines sensitivity of human cells to transformation by cooperating cellular oncogenes. *Cancer Cell* 2003 ; 4 : 301-10
20. Gump J, Stokoe D, McCormick F. Phosphorylation of p16INK4A correlates with Cdk4 association. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 6619-22.

21. Mekki Y, Catallo R, Bertrand Y, *et al.* Enhanced expression of p16ink4a is associated with a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1999 ; 13 : 181-9.

22. Zhu J, Woods D, McMahon M, *et al.* Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev* 1998 ; 12 : 2997-3007.

23. Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJG, *et al.* Opposing effects of Ets and Id proteins on p16^{INK4a} expression during cellular senescence. *Nature* 2001 ; 409 : 1067-70.

24. Ohtani N, Brennan P, Gaubatz S, *et al.* Epstein-Barr virus LMP1 blocks p16^{INK4a}-pRb pathway by promoting nuclear export of E2F4/5. *J Cell Biol* 2003 ; 162 : 173-83.

25. Pagliuca A, Gallo P, De Luca P, *et al.* Class A helix-loop-helix proteins are positive regulators of several cyclin-dependent kinase inhibitors' promoter activity and negatively affect cell growth. *Cancer Res* 2000 ; 60 : 1376-82

26. Zheng W, Wang H, Xue L, *et al.* Regulation of cellular senescence and p16^{INK4a} expression by Id1 and E47 proteins in human diploid fibroblast. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 31524-32.

27. Hansson A, Manetopoulos C, Jönsson JI, *et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL inhibits the expression of the p16INK4A and pT genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 ; 312 : 1073-81.

28. Hara E, Yamaguchi T, Nojima H, *et al.* Id-related genes encoding helix-loop-helix proteins are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 2139-45.

29. Alani RM, Young AZ, Shifflett CB. Id1 regulation of cellular senescence through transcriptional repression of p16/INK4a. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 7812-6.

30. Nickoloff BJ, Chaturvedi V, Bacon P, *et al.* Id-1 delays senescence but does not immortalize keratinocytes. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 27501-4.

31. Tang J, Gordon GM, Nickoloff BJ, *et al.* The helix-loop-helix protein Id-1 delays onset of replicative senescence in human endothelial cells. *Lab Invest* 2002 ; 82 : 1073-9.

32. Polsky D, Young AZ, Busam KJ, *et al.* The transcriptional repressor of p16^{INK4a}, Id1, is up-regulated in early melanomas. *Cancer Res* 2001 ; 61 : 6008-11.

33. Pesce S, Benezra R. The loop region of the helix-loop-helix protein Id1 is critical for its dominant negative activity. *Mol Cell Biol* 1993 ; 13 : 7874-80.

34. Jacobs JJL, Kieboom K, Marino S, *et al.* The oncogene and polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *INK4a* locus. *Nature* 1999 ; 397 : 164-8.

35. Itahana K, Zou Y, Itahana Y, *et al.* Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and polycomb protein Bmi-1. *Mol Cell Biol* 2003 ; 23 : 389-401.

36. Dellino GI, Schwartz YB, Farkas G, *et al.* Polycomb silencing blocks transcription initiation. *Mol Cell* 2004 ; 13 : 887-93.

37. Costello JF, Berger MS, Huang HS, *et al.* Silencing of p16/CDKN2 expression in humain gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res* 1996 ; 56 : 2405-10.

38. Fournel M, Sapieha P, Beaulieu N, *et al.* Down regulation of human DNA-(cytosine-5) methyltransferase induces cell cycle regulators p16^{INK4a} and p21$^{WAF/Cip1}$ by distinct mechanisms. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 24250-6.

39. Robert MF, Morin S, Beaulieu N, *et al.* DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet* 2003 ; 33 : 61-5.

40. Bachman KE, Park BH, Rhee I, *et al.* Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer cell* 2003 ; 3 : 89-95.

41. Magdinier F, Wolffe AP. Selective association of the methyl-CpG binding protein MBD2 with the silent p14/p16 locus in human neoplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 4990-5

42. Kondo E, Gu Z, Horii A, *et al.* The Thymine DNA glycosylase MBD4 represses transcription and is associated with methylated p16^{INK4a} and *hMLH1* genes. *Mol Cell Biol* 2005 ; 25 : 4388-96.

43. Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, *et al.* MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* 1999 ; 23 : 58-61.

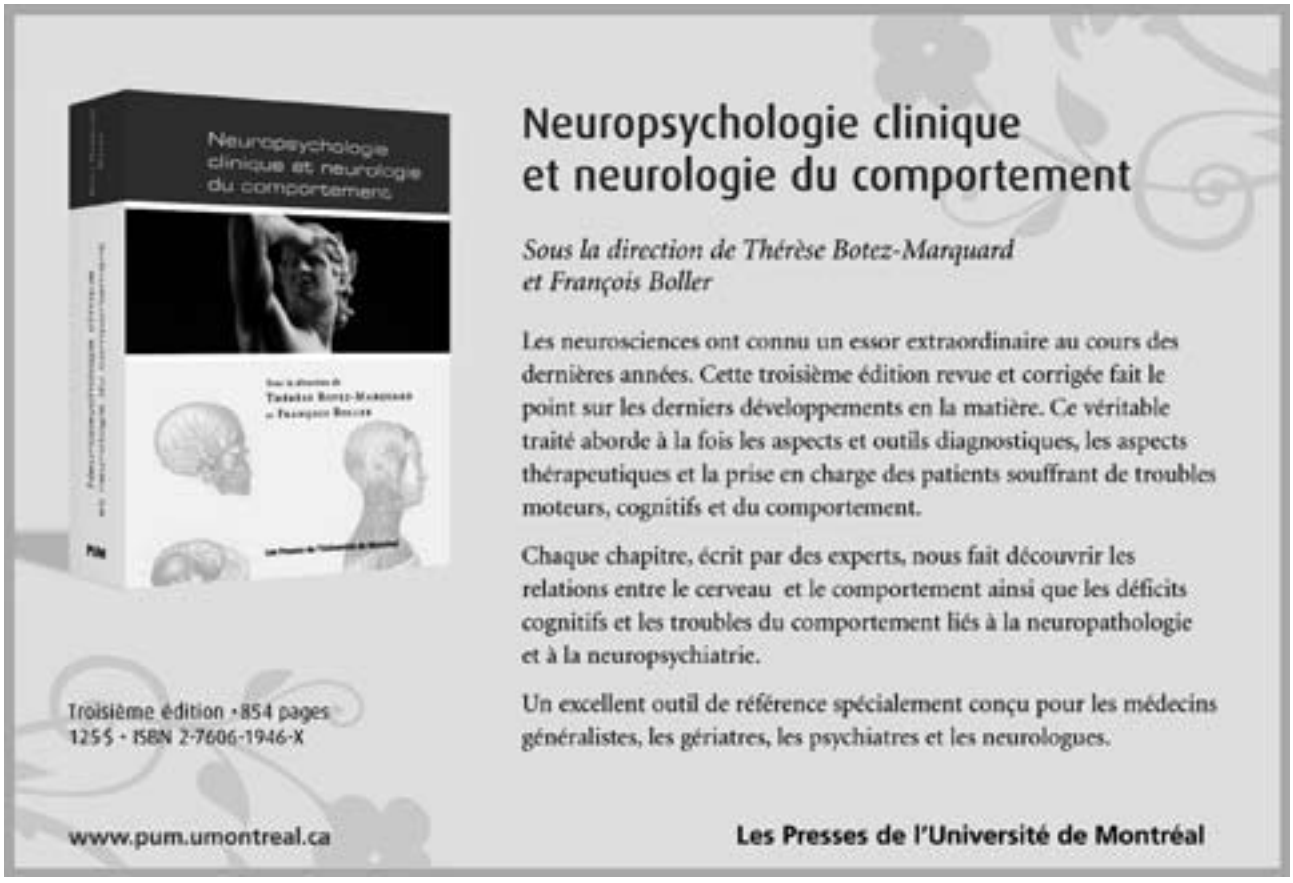
44. Myöhänen S, Baylin SB. Sequence-specific DNA binding activity of RNA helicase A to the p16^{INK4a} promoter. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 1634-42.

45. Oruetxebarria I, Venturini F, Kekarainen T, *et al.* p16^{INK4a} is required for hSNF5 chromatin remodeler-induced cellular senescence in malignant rhabdoid tumor cells. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 3807-16.

46. Cao R, Wang L, Wang H, *et al.* Role of histone H3 lysine 27 methylation in polycomb-group silencing. *Science* 2002 ; 298 : 1039-43.

47. Passegue E, Wagner EF. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J* 2000 ; 19 : 2969-79.

48. Wang W, Wu J, Zhang Z, *et al.* Characterization of regulation elements on the promoter region of p16^{INK4a} that contribute to overexpression of p16 in senescent fibroblasts. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 48655-61.

49. Jacobs JJ, Scheijen B, Voncken JW, *et al.* Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis *via* INK4a/ARF. *Genes Dev* 1999 ; 13 : 2678-90.

TIRÉS À PART
M. Ffrench