

Loss of *p16^{Ink4a}* confers susceptibility to metastatic melanoma in mice

Paul Krimpenfort^{*†}, Kim C. Quon^{*†}, Wolter J. Mooi[‡], Ate Loonstra^{*} & Anton Berns^{*}

Le locus CDKN2A code deux protéines différentes (INK4A et ARF) en utilisant deux cadres de lecture dans les exons 2 et 3. Des mutations germinales dans ce locus prédisposent à l'apparition de mélanomes et d'autres tumeurs et ce locus est la cible de mutations dans de nombreuses tumeurs spontanées chez l'homme, mais la contribution respective des deux protéines codées par CDKN2A doit être étudiée. Il est connu que l'inactivation spécifique de p19ARF prédispose les souris au développement tumoral, indiquant que cette protéine a un rôle anti-oncogène. Pour préciser le rôle de p16INK4A, ce locus est spécifiquement invalidé pour abolir sélectivement l'expression de cette protéine au sein du locus CDKN2A.

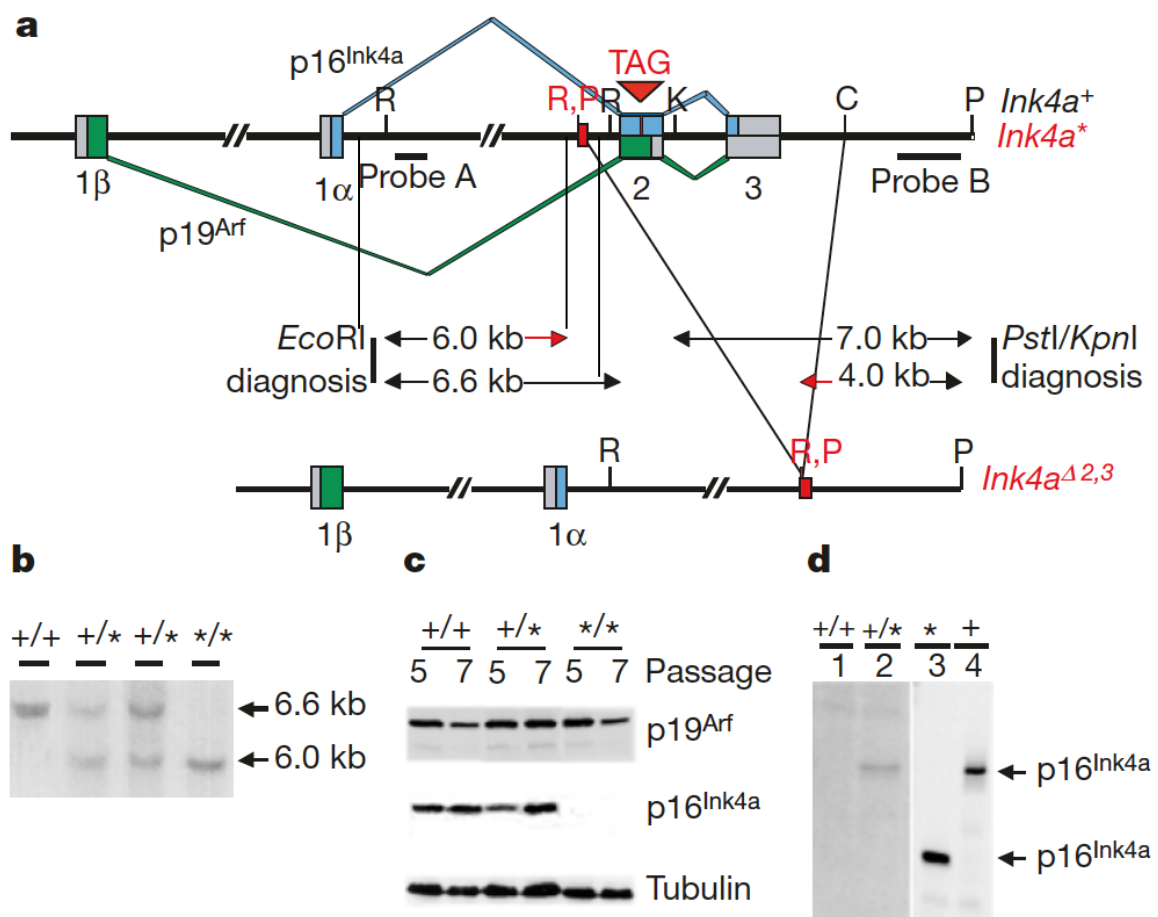


Figure 1

La boîte rouge sur la figure 1a représente une boîte lox P ; R : site EcoRI. Dans la figure 1b, un Southern blot de l'ADN de queue de souris réalisé afin de vérifier la transmission de l'allèle *Ink4a*^{*} dans la lignée germinale. Le Southern a été réalisé avec la sonde A après digestion par EcoRI. figure 1C : les protéines présentes dans des fibroblastes préparés à partir de souris de génotype indiqué au dessus des puits (+, génotype sauvage, * génotype mutant, *ink4a*^{*} de la figure 1a) au passage 5 ou 7. Le western blot est réalisé avec des anticorps reconnaissant

spécifiquement la protéine p19Arf, ou p16Ink4a. En contrôle, un anticorps reconnaissant la tubuline. Figure 1d : immunoprécipitation à l'aide d'anticorps anti Ink4a des protéines marquées après une incubation courte des cellules avec de la méthionine 35S (puits 1 et 2). Puits 3 et 4, immunoprécipitation des protéines traduites en lysat de réticulocyte programmés avec de l'ARN codant la forme sauvage ou mutante de p16Ink4a, comme indiqué au dessus des puits, et incubés avec de la méthionine 35S.

Question 1 : interprétez les résultats. Quelles sont les protéines produites par l'allèle CDKN2a* ? quelle est la différence entre la détection des protéines par western blot ou par immunoprécipitation ?

Question 2 : quelle est la fonction des protéines p16Ink4a et p19Arf ? Quelle phase du cycle cellulaire est ciblée ?

Les cellules mutées dans les voies biochimiques qui contrôlent pRB1 ou p53 présentent des défauts dans la régulation de la prolifération cellulaire. Pour étudier ce point, des fibroblastes issus de souris de différents génotypes sont cultivés *in vitro* et le nombre de cellules déterminé aux temps indiqués (en jours après ensemencement, Figure 2a). La répartition des cellules dans les différentes phases du cycle est étudiée grâce à leur contenu en ADN et les résultats sont présentés en figure 2b. Une tentative pour établir des cultures immortalisées est présentée en Figure 2c, et la croissance des fibroblastes selon les passages, comparée à celle de ceux issus de souris invalidées pour Arf. La réponse des cellules à la transformation cellulaire est également étudiée, après transfection de vecteurs codant l'oncogène HRas muté (G12V), l'oncogène Myc ou la somme des deux. Le nombre de foyers de cellules en prolifération obtenus après transfection des cellules à basse densité et comptés après coloration des boîtes, est indiqué figure 2d.

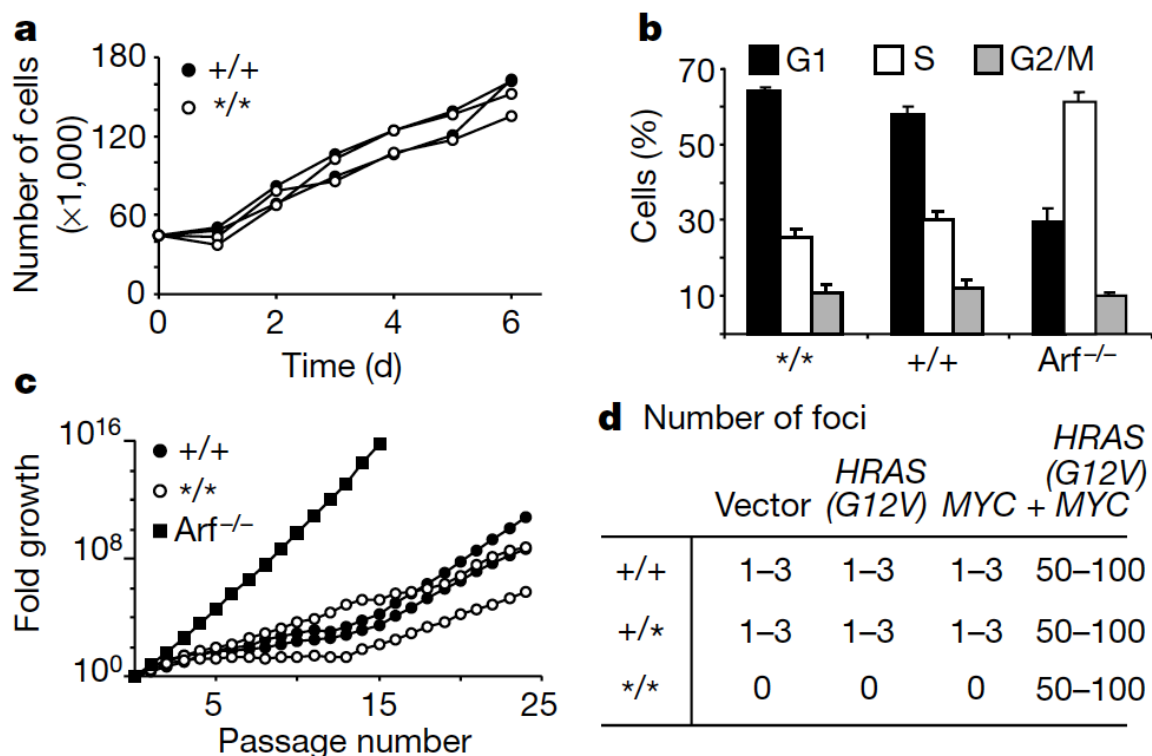


Figure 2

Question 3 : interprétez les résultats ; quelle est l'incidence de l'allèle hypomorphe (la protéine codée par l'allèle mutant n'a plus d'activité détectable) de Ink4a sur le cycle cellulaire (comparez les cellules */* et +/+ en 2b)?

Question 4 : pourquoi les fibroblastes issus de souris invalidées pour Arf deviennent t'ils facilement immortels (Fig. 2c) ?

Question 5 : Pourquoi les oncogènes utilisés seuls sont ils incapables de transformer ces fibroblastes ?

Afin d'étudier l'effet de l'allèle hypomorphe *Ink4a*^{*/*} *in vivo*, afin notamment d'évaluer les rôles anti-oncogènes respectifs de p19Arf et p16Ink4A, la longévité et le développement de tumeurs spontanées sont étudiés chez les souris de génotype défini dans la figure 3a. L'allèle *delta2,3* correspond à la délétion des exons 2 et 3 dans le locus *CDKN2A* et correspond au schéma présenté dans la figure 1a. Ce locus ne permet plus l'expression ni de la p19Arf, ni de la p16Ink4a. Cet allèle est présent soit avec l'allèle sauvage (+/*delta2,3*) soit avec l'allèle hypomorphe. Ce type de situation est fréquemment observé dans les tumeurs humaines, où la perte de l'un des allèles *CDKN2A* se combine avec une mutation stop dans l'autre allèle. Avec le génotype (+/*delta2,3*), on s'attend à une diminution du taux des protéines p19Arf et p16Ink4a ; avec l'allèle hypomorphe (**/delta2,3*), p19Arf est diminué et p16Ink4a est absent. Toutes les souris de génotype **/delta2,3* développent des tumeurs (sarcomes, lymphomes, carcinomes et mélanomes métastatiques) avec un temps de latence de 17 mois et meurent alors que les souris sauvages survivent (figure 3a).

Pour savoir si l'allèle p16Ink4a hypomorphe accélère la transformation tumorale, des souris préparées à développer des leucémies (expression de Myc sous le contrôle des séquences promotrices des gènes codant les immunoglobulines) sont croisées avec les souris dont le génotype *CDKN2A* est indiqué sur la figure 3b. La courbe de survie de ces souris est présentée figure 3b.

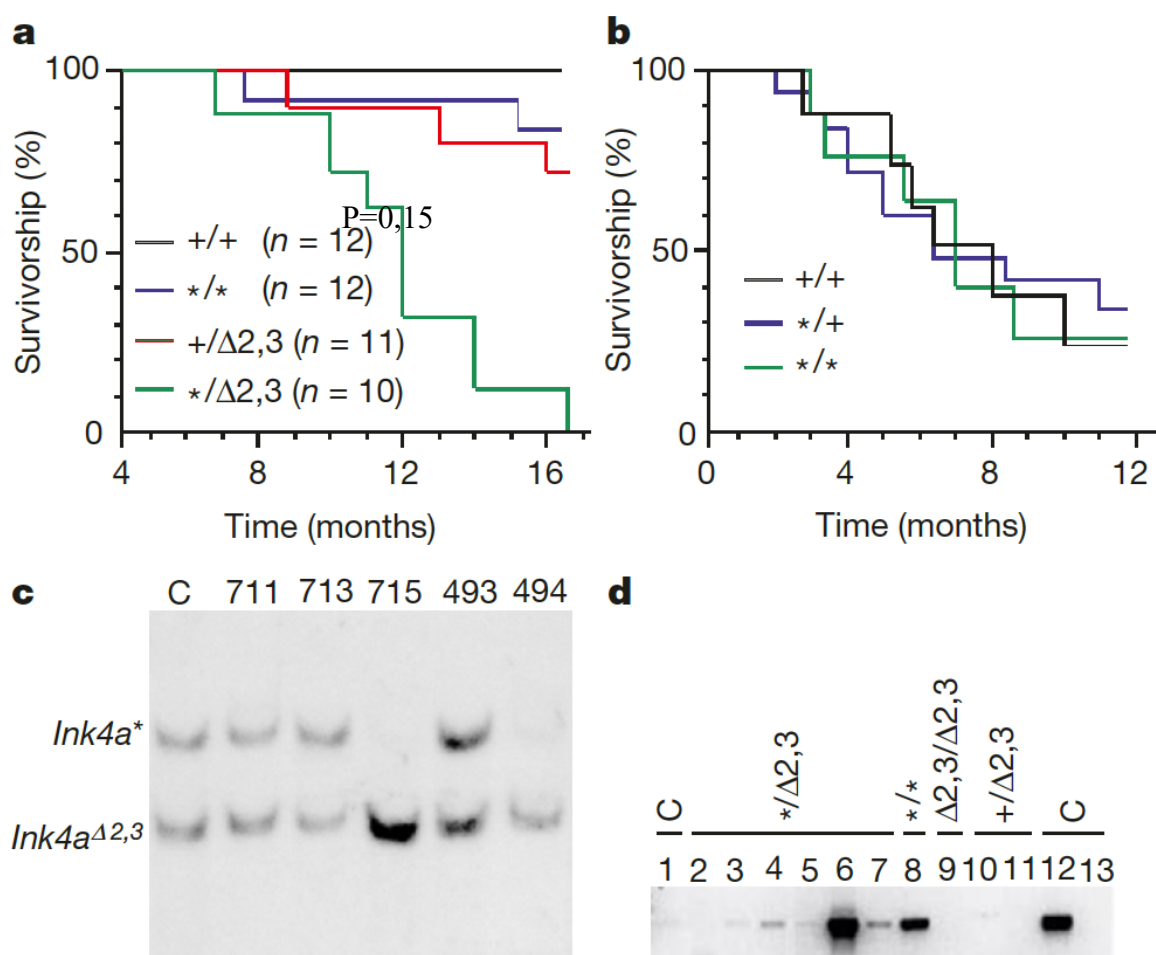


Figure 3

Afin de savoir quel est le génotype *CDKN2A* dans les tumeurs récoltées à partir des souris présentées figure 3a, un Southern blot est réalisé à la suite de la digestion des ADN tumoraux par *Eco*R1 (souris 711, 713, 715, 493 et 494, toutes **/delta2,3*) suivi d'une hybridation avec la sonde A de la figure 1a (puits C, ADN de queue de souris **/delta2,3*, figure 3c). L'analyse de l'expression de l'ARN Arf (figure 3d) est réalisée par RT-PCR sur le l'ARN extrait de : C, souris normale, puits 2 à 4 tumeurs spontanées ; puits 5 à 10, ARN extraits de tumeurs obtenues après traitement des souris avec un produit cancérigène, le DMBA (dymethyl-benzentracène), afin d'accélérer de développement tumoral. Puits 12, fibroblastes issus de souris de génotype *CDKN2A* sauvage transfectées avec l'oncogène *HRAS-G12V*. Puit 13, pas d'ARN. Le génotype des différentes souris utilisées est indiqué au dessus des puits.

Question 6 : quelle conclusion tirez vous du rôle de p16 vis à vis de la tumorigenèse ? protecteur ou pas ? sachant que les cellules de souris exprimant myc sous le contrôle des séquences de promotion des gènes d'immunoglobulines sont extrêmement sensibles à l'apoptose comment interprétez vous les résultats de la figure 3b ?

Question 7 : que déduisez vous du Southern réalisé avec l'ADN tumoral (figure 3c) afin de caractériser le locus CDKN2A ? p16^{ink4a} peut elle être considérée comme un anti-oncogène ?

Question 8 : que conclure des résultats de RT-PCR de la figure 3d ? Pourquoi faire une PCR avec de l'eau (puits 13) ?

Les mélanomes sont le type tumoral le plus fréquemment observé chez les patients qui présentent une mutation dans le locus CDKN2A. La figure 4 montre l'histologie de tumeurs pigmentées qui se sont développées après traitement des souris $\Delta 2,3$ avec du DMBA.

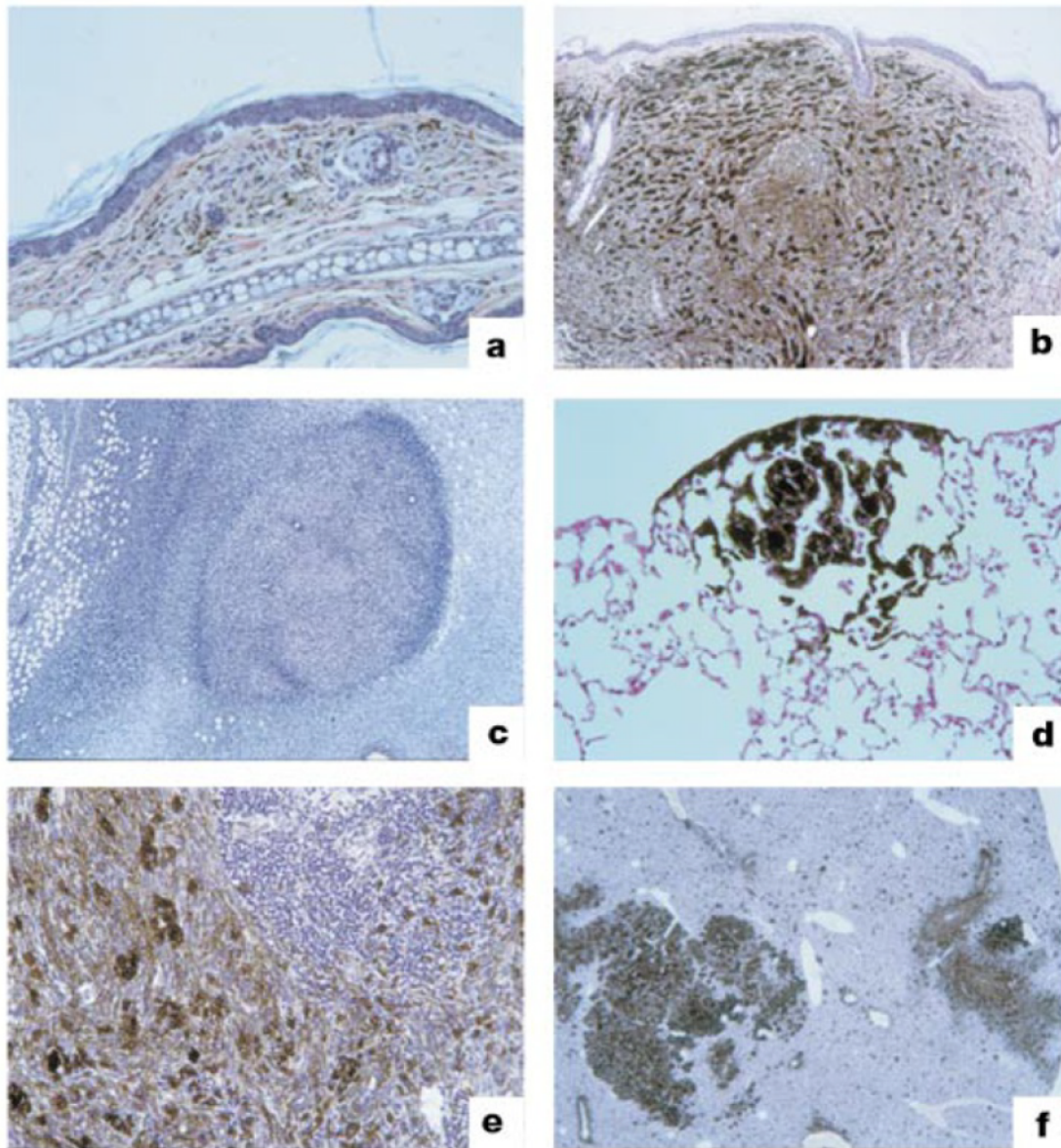


Figure 4

a) intradermal nevus bleu, montrant une accumulation de mélanocytes allongés. b) lésion cutanée pigmentée, présentant une densité cellulaire élevée et une forte prolifération. c) lésion non pigmentée d'un mélanome diffus invasif. d) métastase pulmonaire, e) métastase splénique ; f) métastase hépatique.

Question 9 : Quelle différence d'effets notez vous *in vitro* et *in vivo* pour p16^{Ink4a} ?