

## Identification des gènes impliqués dans la translocation t(11;22) caractéristique du sarcome d'Ewing

Les translocations chromosomiques sont un mode fréquent d'activation oncogénique. Dans les tumeurs hématologiques, l'identification des gènes impliqués dans ces translocations a permis d'améliorer nos connaissances des mécanismes fondamentaux de la carcinogenèse, de développer de nouvelles méthodes diagnostiques et de proposer des voies de recherche thérapeutique originales. Dans les tumeurs solides, et plus particulièrement dans les sarcomes, des translocations chromosomiques ont aussi été décrites, mais jusqu'à présent aucun gène impliqué dans de telles translocations n'avait été isolé. En clonant les gènes remaniés par la translocation chromosomique caractéristique du sarcome d'Ewing, une équipe de l'Institut Curie (Paris, France) vient d'identifier deux nouveaux gènes impliqués dans des cancers humains.

Chez l'enfant et l'adulte jeune, le sarcome d'Ewing est, par ordre de fréquence, la deuxième tumeur primitive des os. Cette tumeur, dont les cellules, au microscope, apparaissent peu différenciées, a été rattachée à un ensemble hétérogène de cancers de l'enfant regroupés sous le terme de tumeurs à petites cellules rondes. Cependant, la mise en évidence de marqueurs de différenciation sur des lignées en culture de sarcome d'Ewing suggère que la cellule progénitrice dont dérive cette tumeur provient des cellules de la crête neurale. Ainsi, le sarcome d'Ewing pourrait être une forme indifférenciée d'une tumeur neuroectodermique appelée neuroépithéliome périphérique. Dès le début des années 1980, à la suite d'observations réalisées par des équipes françaises [1, 2], il avait été montré que les caryotypes du sarcome d'Ewing et du neuroépithéliome périphérique présentaient — dans plus de 90 % des cas — une anomalie du chromosome 22 qui se

traduisait le plus souvent par une translocation équilibrée avec le chromosome 11.

En l'absence de gène candidat évident, le clonage des gènes altérés par cette translocation a nécessité une approche par génétique inverse plus fréquemment et plus exactement appelée aujourd'hui clonage positionnel. Cette stratégie a consisté à dresser une cartographie de plus en plus fine du bras long du chromosome 22. Les premières cartes furent obtenues par hybridation *in situ* sur chromosome [3]. Les suivantes, validées par ces premières, furent établies grâce à un « panel » de cellules hybrides homme/hamster dont chaque lignée contenait un fragment différent de chromosome 22 humain [4]. De manière à prendre pied à

proximité du point de cassure de la translocation du sarcome d'Ewing, une technique originale d'isolement de sondes provenant d'une région prédéterminée du génome fut développée [5]. Celle-ci, fondée sur le criblage différentiel d'une banque de cosmides avec des séquences inter-ALU (obtenues par PCR) présentes dans certaines lignées du panel de cellules hybrides, devait identifier trois *loci* à proximité immédiate du point de cassure. Des données, obtenues par électrophorèse en champs pulsés et par hybridation *in situ* sur noyaux interphasiques en fluorescence bicolore, permirent de déterminer le point de départ le plus favorable pour l'isolement itératif de cosmides chevauchants, et entamer ainsi une « marche sur le chromosome ». Après

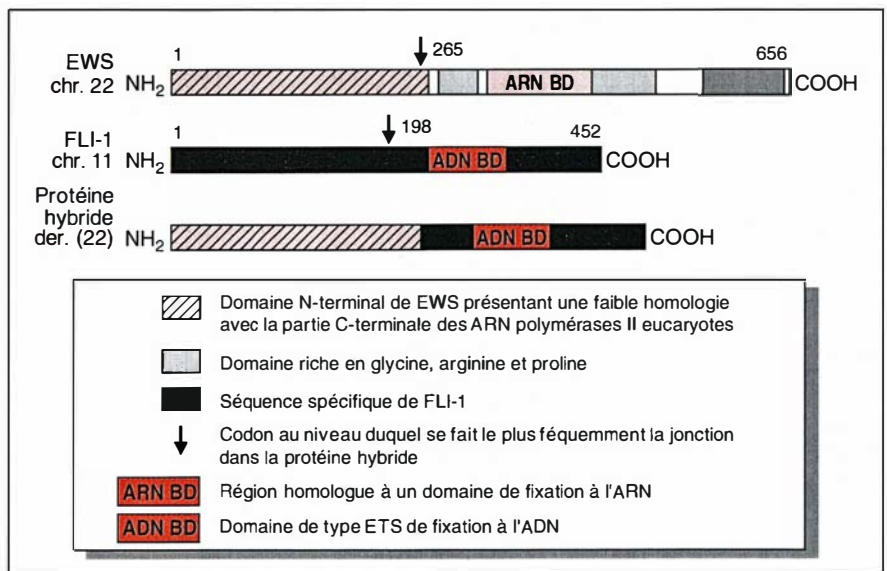


Figure 1. Représentation schématique des produits de traduction des gènes EWS et FLI-1 normaux et du résultat de leur fusion provoquée par la translocation chromosomique.

une marche de près de 300 kb, ce point de cassure fut franchi, ouvrant la possibilité d'isoler ce point de cassure sur le chromosome 11 et de mettre en œuvre, à la recherche des gènes altérés, des techniques d'identification de régions codantes [6].

Un gène fut trouvé sur le site même du point de cassure de chaque chromosome [7]. Le gène du chromosome 22, appelé EWS, code pour une protéine qui possède, dans sa région N-terminale, des répétitions en tandem d'une séquence dégénérée, faiblement homologue à une séquence répétée en tandem, présente dans la partie C-terminale des ARN polymérase II eucaryotes. La partie C-terminale de EWS présente une région ayant une forte analogie avec la structure consensus *RNA-binding domain* connue pour interagir avec l'ARN et peut-être l'ADN simple brin. Le gène sur le chromosome 11 présente une très forte homologie avec le gène *Fli-1* murin, facteur de transcription appartenant à la famille ETS, et récemment isolé à proximité d'un site fréquent d'intégration d'un virus de Friend. Le produit de ce gène possède dans sa partie C-terminale un site de fixation à l'ADN.

Dans le sarcome d'Ewing et les tumeurs apparentées, les points de cassure chromosomique surviennent dans des introns et coupent chaque gène en deux. Le gène hybride reconstruit sur le dérivé 11 de la translocation ne semble pas être exprimé à un niveau substantiel. En revanche, sur le dérivé 22, la juxtaposition des séquences provenant des chromosomes 22 et 11 reconstruit un gène hybride dûment exprimé et codant pour une protéine dont la partie N-terminale est celle de EWS et dont la partie C-terminale possède le site de fixation à l'ADN de Fli-1.

Ces observations conduisent à des applications pratiques immédiates. Le diagnostic cytologique et anatomo-pathologique du sarcome d'Ewing est particulièrement difficile. Il est important cependant d'arriver à identifier avec certitude cette tumeur car son traitement est spécifique, et diffère de celui des autres tumeurs à petites cellules rondes de l'enfant, auxquelles il ressemble. La mise en évidence d'un gène chimérique permet de proposer

une nouvelle approche diagnostique fiable et rapide fondée sur l'utilisation de la technique *reverse transcriptase-PCR* (encore appelée RT-PCR). Ce travail a aussi des implications fondamentales importantes. Il démontre qu'un gène appartenant à la famille « ETS » des facteurs de transcription peut être altéré dans des tumeurs humaines. Ce résultat est d'autant plus surprenant que cette famille de gènes n'avait jusqu'à présent été impliquée que dans des tumeurs hématologiques animales induites par des rétrovirus. Cette observation fournit une piste précise de recherche, en suggérant que le mécanisme physiopathologique donnant naissance au sarcome d'Ewing passe par une altération de l'expression des gènes contrôlés par le facteur de transcription Fli-1. Enfin, parce que le gène hybride n'est présent dans aucune cellule normale de l'organisme, ce travail offre de nouvelles voies de recherche thérapeutique fondées sur l'inhibition spécifique de l'expression ou de la fonction de ce gène anormal.

G. T.

1. Aurias A, Rimbaud C, Buffe C, Duboussset J, Mazabraud A. Chromosomal translocations in Ewing's sarcoma. *N Engl J Med* 1983 ; 309 : 496-7.
2. Turc-Carel C, Philip L, Berger PM, Philip T, Lenoir GM. Chromosomal translocations in Ewing's sarcoma. *N Engl J Med* 1983 ; 309 : 497-8.
3. Zhang FR, Aurias A, Delattre O, et al. Mapping of human chromosome 22 by *in situ* hybridization. *Genomics* 1990 ; 7 : 319-24.
4. Delattre O, Azambuja CJ, Aurias A, et al. Mapping of human chromosome 22 with a panel of somatic cell hybrids. *Genomics* 1991 ; 9 : 721-7.
5. Zucman J, Delattre O, Desmaze C, et al. Rapid isolation of cosmids from defined subregions by differential Alu-PCR hybridization on chromosome 22 specific library. *Genomics* 1992 ; 13 : 395-401.
6. Zucman J, Delattre O, Desmaze C, et al. Cloning and characterization of the Ewing's sarcoma and peripheral neuroepithelioma t(11;22) translocation breakpoints. *Genes Chr Cancer* 1992 (sous presse).
7. Delattre O, Zucman J, Plougastel B, et al. Gene fusion with an ETS domain caused by chromosome translocation in human tumors. *Nature* 1992 ; 359 : 162-5.

■■■ Localisation anormale de la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase dans la maladie polykystique de la souris. Dans la polykystose rénale humaine, autosomique dominante, la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase est mal localisée dans l'épithélium des kystes (*m/s n° 9, vol. 6, p. 904*). Avner, Sweeney et Nelson (Seattle et Stanford, USA) ont analysé la localisation de la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase dans les cellules tubulaires rénales, chez des souris CPK qui développent une polykystose rénale ressemblant à la polykystose humaine autosomique récessive, et chez des souris témoins [1]. Dans le tube proximal, kystique ou non, les sous-unités  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  de l'enzyme ont une localisation normale au cours du développement (de la naissance au 21<sup>e</sup> jour), restreinte à la membrane basolatérale des cellules. Au contraire, la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase est localisée transitoirement à la membrane apicale et latérale dans environ 10 % des cellules du canal collecteur, surtout cortical, de souris normales, dans les premiers jours de la vie ; par la suite, l'enzyme prend sa position basolatérale définitive. Dans l'épithélium des kystes dérivant de canaux collecteurs, chez les souris CPK, la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase est apicale et latérale dans 20 à 40 % des cellules. Cette mal-localisation s'atténue un peu au cours du développement mais persiste au 21<sup>e</sup> jour. Ainsi la distribution apicale de la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase est transitoire au cours du développement normal et persistante dans les cellules épithéliales des kystes. Cela est particulier aux cellules du canal collecteur. Des études faites sur des cellules tubulaires rénales en culture ont montré que la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase était distribuée à la membrane apicale mais qu'elle y était inactive et disparaissait rapidement (*m/s n° 3, vol. 8, p. 287*). Il est possible que l'attachement au cytosquelette joue un rôle dans la fixation sélective de l'enzyme à la membrane. Pourquoi le routage de l'enzyme est-il anormal chez les souris CPK, et seulement dans les cellules du canal collecteur ?

[1. Avner ED, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 7447-51.]