

ANRIL ou l'étrange histoire d'un grand ARN non codant

Éric Pasmant, Ingrid Laurendeau, Audrey Sabbagh, Béatrice Parfait, Michel Vidaud, Dominique Vidaud, Ivan Bièche

UMR745 Inserm,
Université Paris Descartes, Faculté
des sciences pharmaceutiques et biologiques,
4, avenue de l'Observatoire,
75006 Paris, France.
Service de biochimie et génétique
moléculaire, Hôpital Beaujon, AP-HP,
100, boulevard du Général Leclerc,
92110 Clichy, France.
eric.pasmant@gmail.com

Cluster *p16/CDKN2A-p15/CDKN2B-p14/ARF* et prédisposition aux cancers

La prédisposition héréditaire au mélanome cutané malin est en partie liée à des mutations constitutionnelles du gène *p16/CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), également appelé *INK4a* (*inhibitor of cyclin-dependent kinase 4A*). Ce gène code pour une protéine inhibitrice des CDK4 (*cyclin-dependent kinase 4*) et CDK6 qui régulent le cycle cellulaire. Un syndrome héréditaire associant des prédispositions au mélanome et à des tumeurs du système nerveux a été décrit dans de rares familles, définissant le syndrome mélanome-astrocytome (OMIM 155755). Nous avons eu l'occasion d'étudier une famille présentant un tel syndrome et d'identifier chez les membres atteints une large délétion constitutionnelle incluant l'ensemble des gènes *p16/CDKN2A*, *p15/CDKN2B* et *p14/ARF* (*alternate reading frame*, phase de lecture alternative du locus *CDKN2A*) de ce locus en 9p21.3, suggérant un « syndrome des gènes contigus » [1].

ANRIL, un nouveau venu au locus *p16/CDKN2A-p15/CDKN2B-p14/ARF*

Cette étude nous a également permis d'identifier au sein de cette délétion constitutionnelle un grand ARN non codant que nous avons nommé ANRIL pour *antisens noncoding RNA in the INK4 locus* (OMIM 613149). Le gène ANRIL, constitué de 19 exons répartis sur 126 kb, est transcrit en un ARNm de 3 834 pb dans le sens opposé à celui des trois autres gènes du cluster (orientation anti-sens). ANRIL chevauche les

deux exons de *p15/CDKN2B* au niveau de son intron 1 (Figure 1A). La proximité (~300 pb) des sites d'initiation de la transcription d'ANRIL et de *p14/ARF* ainsi que la corrélation positive de leurs taux d'expression dans des tissus humains normaux et tumoraux suggèraient une régulation transcriptionnelle coordonnée de ces deux gènes (Figure 1A). La récente mise en évidence de la fixation de la protéine régulatrice CTCF (*CCCTC binding factor*) au niveau des séquences promotrices de ces deux gènes a permis d'expliquer la corrélation de *p14/ARF* et d'ANRIL, pourtant orientés en sens opposé [2]. CTCF est capable de se fixer sur des sites isolateurs de la chromatine¹ et de moduler l'activité transcriptionnelle des régions adjacentes.

Les études d'association génétique génome entier révèlent un lien entre ANRIL et diverses pathologies

De manière très surprenante, et alors que le rôle d'ANRIL restait à élucider, des études d'association génétique génome entier ou GWAS (*genome wide association study*) portant sur diverses maladies multigéniques ont montré que les SNP (*single nucleotide polymorphisms*) les plus significativement associés à l'infarctus du myocarde, aux anévrismes intracrâniens mais aussi au diabète de type 2 étaient situés au niveau du gène ANRIL (Figure 1B) [3, 4, 5]. Le lien entre ces maladies et le gène ANRIL

fut confirmé dans un second temps par des études d'expression qui montrèrent une corrélation entre l'augmentation du risque cardiovasculaire et le taux de transcrits d'ANRIL dans les lymphocytes du sang périphérique [6]. Ces études d'expression ont permis de confirmer la corrélation transcriptionnelle de *p16/CDKN2A*, *p15/CDKN2B*, *p14/ARF* et ANRIL, mais également d'appréhender la complexité de la régulation transcriptionnelle d'ANRIL avec l'identification d'au moins huit variants d'épissage [7]. Parmi les quatre gènes du cluster, le taux d'expression d'ANRIL montrait la plus forte association aux événements cardiovasculaires [8].

Quels rôles pour ANRIL ?

La question du lien physiopathologique entre ANRIL et le risque cardiovasculaire restait entière lorsque de nouvelles études d'association ont identifié ANRIL comme locus de susceptibilité à certains cancers incluant gliomes et carcinomes basocellulaires (Figure 1B) [9]. Ces résultats étaient donc en accord avec l'étude *princeps* qui avait conduit à l'identification d'une délétion d'ANRIL au sein d'une famille associant une prédisposition aux mélanomes mais également aux tumeurs du système nerveux. La susceptibilité aux différentes maladies retrouvée par GWAS pourrait être conférée par des SNP distincts au niveau du gène ANRIL (Figure 1B) [10]. Une possible explication du lien entre ANRIL et ces pathologies si diverses est venue d'une étude ayant trait au déclin des fonctions autorépliquatives des cellules souches au cours du vieillissement [11].

¹ Les sites isolateurs (ou insulateurs) de la chromatine séparent les différents éléments *enhancers* et *silencers* en empêchant leur communication avec les promoteurs [15].

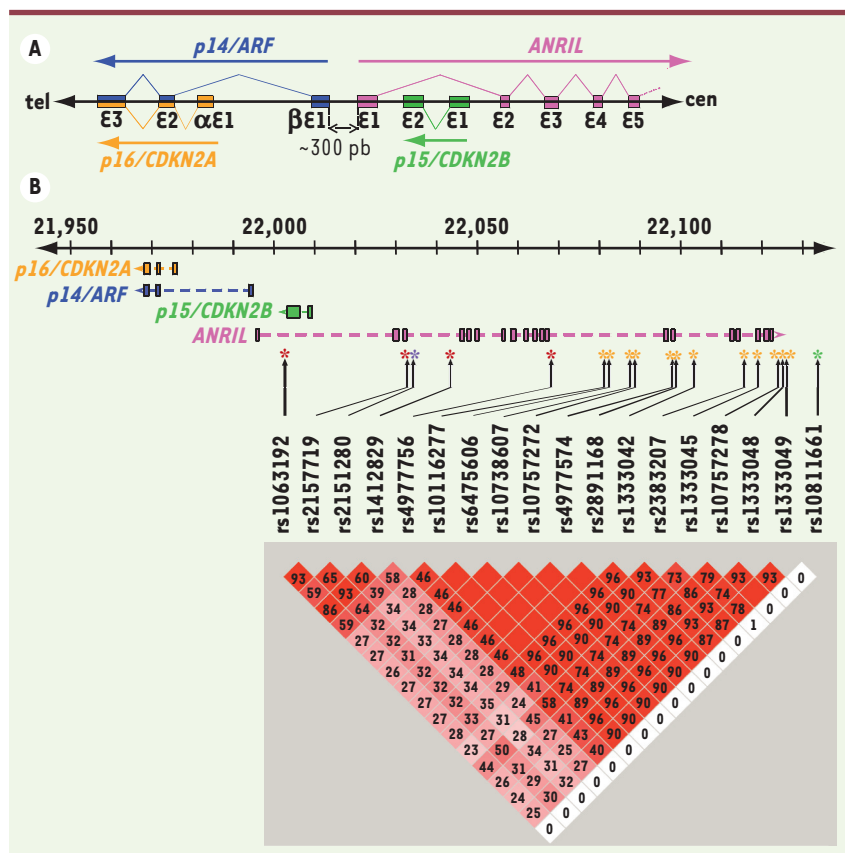


Figure 1. Cluster des gènes *p16/CDKN2A-p15/CDKN2B-p14/ARF-ANRIL*. A. Organisation transcriptionnelle des gènes *p16/CDKN2A*, *p15/CDKN2B*, *p14/ARF* et *ANRIL* au locus 9p21.3. B. Localisation de 18 SNP du locus 9p21.3 utilisés dans les études de GWAS (génomme humaine hg19/GRCh37). Les SNP en déséquilibre de liaison (DL) sont associés en blocs. Ces groupes distincts sont retrouvés comme marqueurs de susceptibilité à diverses maladies : gliome (astérisques rouges ; rs1063192, rs2157719, rs1412829 et rs4977756), carcinome basocellulaire (astérisque violet ; rs2151280), risque cardiovasculaire (nombreux SNP en fort déséquilibre de liaison dans la région 3' d'*ANRIL* et marqués par un astérisque orange) et diabète de type 2 (astérisque vert ; rs10811661). Les profils de DL entre les SNP du locus ont été évalués dans l'échantillon européen de HapMap. Le DL entre chaque paire de SNP, mesuré par l'indice r^2 , varie entre 0 et 100 % (100 % représentant un DL complet entre deux SNP). Plus la valeur r^2 est élevée, plus la couleur des carrés est foncée. Il est à noter que le SNP rs10811661 associé avec le diabète de type 2 est totalement indépendant des autres SNP du locus ($r^2 < 1\%$).

N. Sharpless et R. DePinho ont en effet suggéré que la sénescence répliative² serait un mécanisme majeur à l'origine des pathologies liées au vieillissement, dont notamment l'athérosclérose, le diabète de type 2 et les cancers. Ainsi, l'implication d'*ANRIL* (du fait de sa position proche du locus *p16/CDKN2A-p15/CDKN2B-p14/ARF* et des résultats de l'étude GWAS) dans le vieillissement cellulaire pourrait apporter une séduisante hypothèse unificatrice expliquant l'association de divers facteurs de risques à cet ARN non codant. Des études fonctionnelles *in vitro* (lignées cellulaires) ou *in vivo* (modèles animaux) sont maintenant nécessaires pour prouver les rôles respectifs d'*ANRIL* dans la régulation du locus *p16/CDKN2A-p15/CDKN2B-*

p14/ARF et dans les différents processus physiopathologiques que lui ont assigné les études GWAS.

Les grands ARN non codants

L'identification d'*ANRIL* souligne également le rôle régulateur sans doute sous-estimé des grands ARN non codants alors que se développe intensément depuis quelques années l'étude d'une autre classe d'ARN non codants : les microARN [12]. Les nouvelles techniques d'analyse génomique permettront sans doute d'établir un répertoire de ces grands (> 200 nt) ARN non codants (dont le nombre est estimé à plusieurs milliers) et de mieux comprendre leurs mécanismes d'action [13]. De plus, il est troublant de constater que de nombreuses études GWAS révèlent des pics d'association dans des régions non codantes du génome, appelées « déserts de gènes », dont certains auteurs font l'hypothèse qu'ils pourraient abriter de grands ARN non codants [14]. ♦

The amazing story of *ANRIL*, a long non-coding RNA

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Pasmant E, Laurendeau I, Héron D, et al. Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. *Cancer Res* 2007 ; 67 : 3963-9.
2. Rodriguez C, Borge J, Court F, et al. CTCF is a DNA methylation-sensitive positive regulator of the INK4/ARF locus. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 ; 392 : 129-34.
3. McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 2007 ; 316 : 1488-91.
4. Helgadottir A, Thorleifsson G, Magnusson KP, et al. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat Genet* 2008 ; 40 : 217-24.
5. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, et al. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 2007 ; 316 : 1336-41.

² Selon les auteurs [11], les mécanismes qui suppriment le développement de cancers, comme l'apoptose et la sénescence, liés au raccourcissement des télomères et à l'activité de p53 et de p16^{INK4a}/CDKN2A, peuvent aussi avoir une conséquence néfaste en induisant le déclin de la fonction répliative de certaines cellules souches au cours du vieillissement.

6. Liu Y, Sanoff HK, Cho H, *et al.* INK4/ARF transcript expression is associated with chromosome 9p21 variants linked to atherosclerosis. *PLoS One* 2009 ; 4 : e5027.
7. Folkersen L, Kyriakou T, Goel A, *et al.* Relationship between CAD risk genotype in the chromosome 9p21 locus and gene expression. Identification of eight new ANRIL splice variants. *PLoS One* 2009 ; 4 : e7677.
8. Holdt LM, Beutner F, Scholz M, *et al.* ANRIL Expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010 ; 30 : 620-7.
9. Shete S, Hosking FJ, Robertson LB, *et al.* Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat Genet* 2009 ; 41 : 899-904.
10. Broadbent HM, Peden JF, Lorkowski S, *et al.* Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Hum Mol Genet* 2008 ; 17 : 806-14.
11. Sharpless NE, DePinho RA. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 ; 8 : 703-13.
12. Finoux AL, Chartrand P. Micro-ARN : oncogènes et suppresseurs de tumeurs. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 1049-54.
13. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs : insights into functions. *Nat Rev Genet* 2009 ; 10 : 155-9
14. Mattick JS. The genetic signatures of noncoding RNAs. *PLoS Genet* 2009 ; 5 : e1000459.
15. Fourel G, Gilson E. Empreinte parentale : insulateurs sur commande. *Med Sci (Paris)* 2001 ; 17 : 86-9.