

L'analyse des mutations du gène p53 dans les cancers humains : le lien entre l'épidémiologie et la carcinogenèse

**Thierry Soussi
Karim Dehouche
Christophe Bérout**

La constitution de bases de données répertoriant les altérations génétiques est un outil précieux et indispensable à des analyses telles que la recherche de corrélation génotype/phénotype ou l'étude des mécanismes qui sont à l'origine de ces altérations. L'analyse des mutations du gène *p53* est un paradigme dans ce domaine. L'examen des événements mutationnels permet d'effectuer une archéologie moléculaire afin de définir leur origine. La possibilité de voir une relation directe entre la survenue d'un type particulier de cancer associé à l'exposition à un carcinogène et un événement mutationnel précis déjà étudié dans des expériences animales permet de confirmer les modèles cellulaires et animaux.

Un lien causal direct entre l'exposition à un carcinogène et la survenue d'un cancer chez l'homme a toujours été très difficile à établir [1]. La limite des modèles animaux et cellulaires associée à des barrières technologiques importantes et à l'absence de système expérimental adéquat ont été autant de freins pour les études d'épidémiologie moléculaire chez l'homme. Depuis quelques années, certains de ces obstacles ont pu être franchis et il est désormais

possible d'analyser l'étiologie moléculaire de certains cancers en analysant les profils des mutations retrouvées dans les tumeurs humaines. D'un point de vue technologique, c'est l'utilisation de la PCR (*polymerase chain reaction*) qui permet d'analyser rapidement la séquence d'un échantillon biologique provenant d'un très petit spécimen. Par ailleurs, la découverte des altérations du gène *p53* dans les cancers humains a aussi été un élément important dans l'évolution de ce champ d'activité.

ADRESSES

T. Soussi, K. Dehouche : Institut Curie, Laboratoire de génotoxicologie des tumeurs, 26, rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France. C. Bérout : Hôpital Necker-Enfants Malades, Inserm U. 383, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

Ce gène occupe une place à part dans le monde des gènes suppresseurs de tumeurs. Selon, le modèle de Knudson, il est nécessaire que les deux allèles d'un gène suppresseur de tumeur soient altérés pour que la fonction de régulation négative de la prolifération cellulaire soit perdue [2]. Dans la plupart des cas, ce modèle est confirmé par les observations expérimentales. Les tumeurs ne contiennent plus qu'un seul allèle muté, le second allèle ayant été perdu lors d'un remaniement génétique qui a conduit à la délétion d'une partie plus ou moins importante du chromosome (perte d'hétérozygotie). Pour la plupart des gènes suppresseurs de tumeurs les altérations inactivant l'allèle restant sont des microlésions (insertions ou délétions) qui perturbent le cadre de lecture et ont principalement un effet qualitatif sur l'expression de la protéine qui est généralement tronquée, instable ou même absente (BRCA1, APC ou hMLH1) [3] (*m/s* 1996, n° 11, p. 1271, 1998, n° 1, p. 114). Plus récemment, il a été démontré que l'expression de plusieurs gènes suppresseurs de tumeur (*p16*, *hMLH1*) (*m/s* 1995, n° 9, p. 1346, 1998, n° 10, p. 1124) est inactivée par méthylation du promoteur de transcription. Dans le cas du gène *p53*, la situation est totalement différente dans la mesure où plus de 90% des mutations sont des mutations de type faux-sens [4] (*m/s* 1998, n° 8-9, p. 973).

L'explication la plus rationnelle pour rendre compte de ce profil particulier est la notion de fonction oncogénique associée à la *p53* mutante. Non seulement les mutations inactiveraient la fonction de régulateur négatif de la prolifération cellulaire de la *p53* mais il y aurait participation de la *p53* mutante au phénotype transformé [5]. Cette activité oncogénique n'est pas encore bien définie à l'heure actuelle. Le phénomène est rendu plus complexe par l'observation d'une hétérogénéité importante dans le comportement des diverses *p53* mutantes [6, 7].

Épidémiologie moléculaire et mutations du gène *p53*

Afin d'utiliser un gène particulier pour l'étude de l'origine des processus mutagènes dans la population humaine, celui-ci devra posséder des propriétés particulières: (1) il devra être muté dans un grand nombre de type de cancers (*figure 1*); (2) la fréquence des mutations devra être élevée; (3) le gène devra être altéré essentiellement par mutations ponctuelles; et (4) l'analyse moléculaire du gène doit être relativement aisée (gène de petite taille). Pour l'instant ces caractéristiques peuvent être retrouvées pour deux gènes, l'oncogène *Ha-ras* et le gène *p53*. L'un des inconvénients du gène *ras*, est le faible nombre de codons [3] qui

peuvent être la cible des mutations. Pour le gène *p53*, plus de 300 codons sur les 393 peuvent être modifiés. De plus, le gène *p53* est altéré dans plus de 50% des cancers. Il est donc possible d'entreprendre des études d'épidémiologie moléculaire dans le but de rechercher des signatures spécifiques de certains carcinogènes et d'évaluer leur implication dans l'apparition du phénomène néoplasique.

A l'heure actuelle (juin 2000), plus de 1 600 publications ont fait état de mutations du gène *p53* dans divers types de cancers humains [8]. Une base de données des mutations du gène *p53* a été établie (*figure 1*). Elle contient 12 000 mutations du gène *p53* provenant de patients atteints de plus de 50 types de cancers différents [8]. L'analyse de ces mutations peut être effectuée à divers niveaux: au niveau de la position de l'acide aminé muté sur la protéine *p53* et au niveau des événements mutationnels qui ont altéré le gène *p53* lui-même (*figures 2 à 5*).

Mutations ou variations?

Il est bien sûr important de montrer que ces mutations sont véritablement délétères et inactivent la fonction de la *p53*. Diverses observations prouvent qu'il s'agit véritablement de mutations acquises: (1) elles ne sont présentes que dans le tissu tumoral et absentes du tissu sain d'un même patient; (2) l'analyse de la séquence du gène *p53* d'un grand nombre de tissus sains montre qu'il n'y a que très peu de polymorphismes dans le gène *p53* humain; (3) ces altérations ne sont retrouvées que dans les domaines hautement conservés de la *p53*, c'est-à-dire les régions fonctionnellement importantes de la protéine; (4) l'analyse des propriétés de diverses *p53* mutantes fréquemment rencontrées dans des cancers humains, montre que celles-ci ont perdu leur activité biologique. Il s'agit donc de véritables mutations qui inactivent principalement la fonction de fixation à l'ADN de la protéine *p53*. Néanmoins, il est important de garder à l'esprit que des études récentes font apparaître une hétérogénéité au niveau des propriétés des *p53* mutantes [6, 7]. Certains mutants ne sont que partielle-

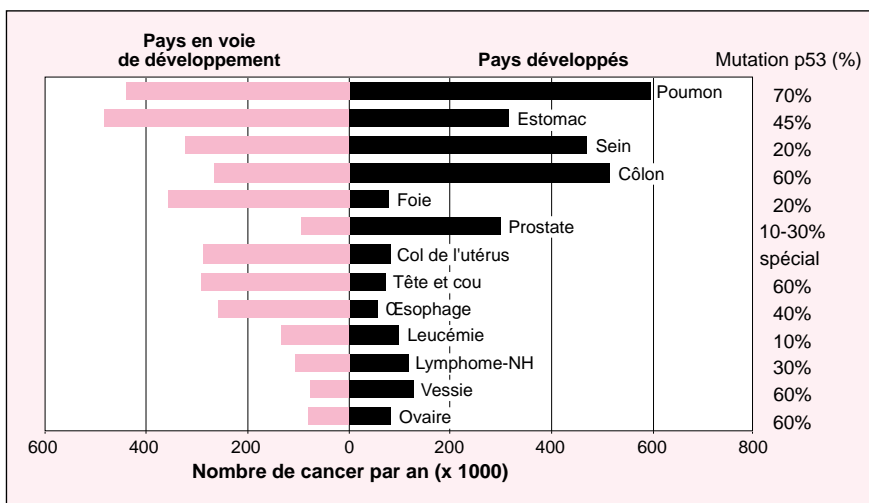


Figure 1. Fréquence des cancers dans le monde et relation avec le taux de mutation du gène *p53*. Dans les cancers du col de l'utérus, la protéine E6 des papillomavirus inactive la fonction biologique de *p53*.

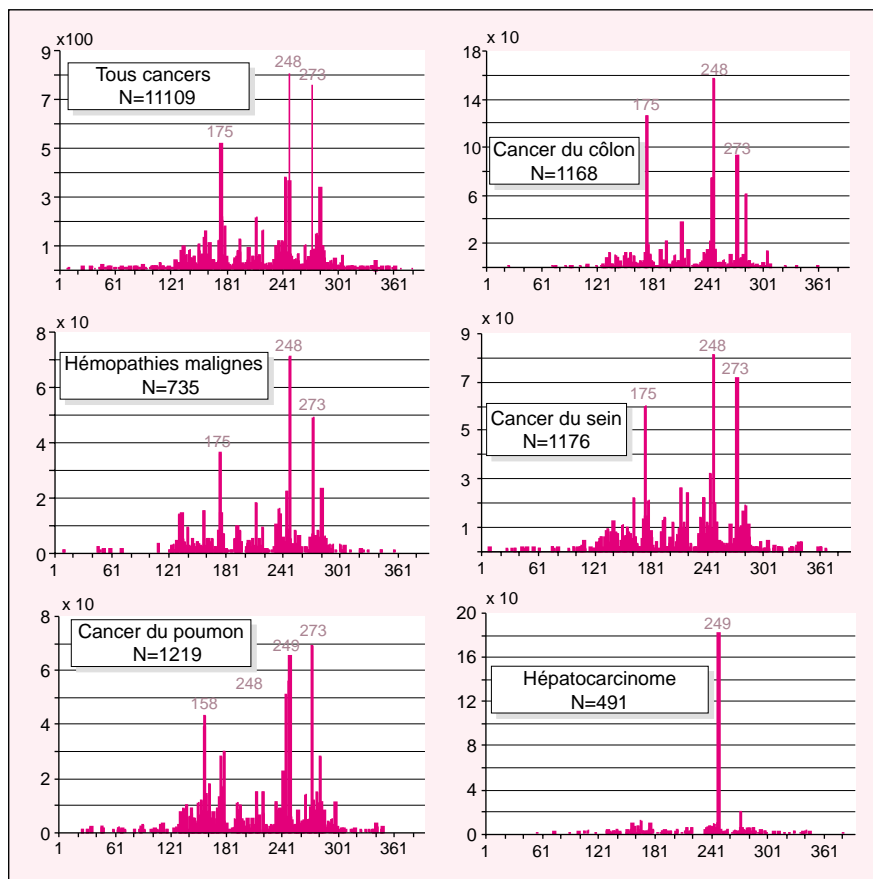


Figure 2. **Répartition des mutations le long de la molécule p53.** Les codons 175, 248 et 273 sont les trois points chauds de mutations retrouvés dans tous les cancers. Les points chauds aux codons 157 et 158 sont spécifiques du cancer bronchique associé au tabagisme alors que le point chaud au niveau du codon 249 est spécifique du cancer du foie associé à l'exposition à l'aflatoxine B1.

ment défectifs et conservent une activité de transactivation résiduelle. Cette hétérogénéité pourrait être liée à une variabilité dans le pronostic associé à ces mutations dans un cancer donné [9, 10].

Répartition des mutations du gène p53

L'analyse présentée dans la figure 2 montre que 90 % des mutations sont regroupées dans la région centrale de la p53. Celle-ci contient quatre des cinq domaines hautement conservés au cours de l'évolution des p53. La cristallographie de la protéine p53 complexée à l'ADN a montré que cette région est essentielle à l'interaction p53-ADN [11]. Néan-

moins, il est possible que cette répartition soit légèrement biaisée car la plupart des travaux ont exclusivement étudié la séquence de cette partie du gène p53. Sept codons correspondent à 30 % des mutations. Mis à part le codon 249, les six autres codons contiennent un dinucléotide CpG et la majorité des événements mutationnels retrouvés au niveau de ces codons est une transition de type G:C->A:T (excepté pour les cancers bronchiques, voir plus loin). L'analyse de la répartition des mutations fait apparaître des associations particulières entre certains types de cancers et des événements mutationnels (figure 2): (1) dans le cancer du poumon, il y a peu de mutations au niveau du codon 175 et un nombre important de mutations est concen-

tré dans la région 151-159 avec un point chaud sur les codons 157 et 158; (2) dans les hépatocarcinomes, plus de 80 % des mutations sont regroupées au niveau du codon 249; (3) les codons 175 et 273 ne sont pas retrouvés altérés dans les cancers de la peau. Nous verrons plus loin que ces variations peuvent être dues à l'implication de divers carcinogènes. On peut se demander pourquoi certains domaines de la p53 (domaines de transactivation, d'oligomérisation, signaux d'export ou d'import nucléaires) ne sont jamais retrouvés mutés dans les cancers. Des études de mutagenèse ont montré que de simples mutations ponctuelles pouvaient facilement compromettre l'oligomérisation ou la localisation cellulaire de la p53. Comme il est peu vraisemblable que ces régions soient moins « mutables », il est possible que ces fonctions soient conservées par nécessité pour la fonction oncogénique dominante de la p53.

Le profil des mutations du gène p53

L'analyse de toutes les mutations ponctuelles qui modifient le gène p53 montre que 51 % sont des transitions G:C → A:T (figure 3). 59 % sont situées au niveau d'un dinucléotide CpG. Dans les cellules de mammifères, la cytosine présente dans ces dinucléotides est très fréquemment méthylée. La désamination spontanée d'une cytosine conduit à la formation d'un mésappariement U:G qui est efficacement réparé par une uracile ADN glycosylase. En revanche, la désamination d'une 5-méthylcytosine conduit à un mésappariement T:G dont la réparation, par une voie peu spécifique, peut conduire à une transition C->T. Par ailleurs, il a été montré que ce taux de désamination spontanée était supérieur pour les 5-méthylcytosines par rapport aux cytosines. L'ensemble des 42 dinucléotides CpG présents dans la séquence codante du gène p53 est méthylé et cela quel que soit le tissu considéré. En fait, les cinq codons hotspot 175, 245, 248, 273 et 282 contiennent un tel dinucléotide. Plus de 90 % des événements mutationnels au niveau de ces codons sont compatibles avec un phénomène de désamination sauf

pour les cancers associés au tabagisme (figure 3). L'analyse des événements mutationnels somatiques dans des cancers tels que le cancer du côlon, les hémopathies malignes ou les cancers du système nerveux montre que le taux de mutations au niveau de dinucléotides CpG est très élevé. La plupart des mutations qui

altèrent le gène *p53* dans ces cancers serait due à des processus endogènes liés à la déamination de la 5-méthylcytosine. Un phénomène semblable est observé pour les mutations germinales du gène *p53* qui sont retrouvées chez les patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni. Cela est également observé dans les muta-

tions germinales retrouvées dans d'autres maladies génétiques (gène de l'hémophilie) ou cancéreuses (VHL, PTEN) (m/s 1996, n° 6, p. 817, 1998, n° 11, p. 1267). Il n'est pas possible d'exclure formellement l'implication de carcinogènes qui pourraient également participer à la genèse de ces mutations. En particulier, il a été montré que les O6-méthyl guanine sont moins bien réparées au niveau de ces dinucléotides CpG. Il est également possible que certains carcinogènes aient une meilleure affinité pour les 5-méthylcytosines.

Hépatocarcinome et aflatoxine B1

En 1990, deux études faisaient état de mutations du gène *p53* dans des hépatocarcinomes (HCC) avec une prédominance de transversions G:C>T:A au niveau de la troisième base du codon 249 de la *p53* (Arg → Ser) [12, 13]. Dans un cas, la série de patients provenait du Mozambique tandis que la seconde provenait de la province de Qidong en Chine (figures 3 et 4). Ces deux régions sont connues pour la consommation de nourriture contaminée par des champignons tels *Aspergillus flavis* ou *Aspergillus parasiticus* qui sont producteurs d'aflatoxine B1. Il s'agit d'un carcinogène hépatique très puissant ayant un rôle important dans la genèse des HCC et qui agirait de façon synergique avec le virus de l'hépatite B (VHB). Des études d'épidémiologie effectuées à l'échelon mondial ont montré que cette mutation au niveau du codon 249 est strictement spécifique des pays dont la nourriture est contaminée par l'aflatoxine [14]. Dans des pays tels que le Mozambique, le Sénégal ou la province de Qidong en Chine, plus de 60 % des mutations ont été retrouvées au niveau du codon 249. Dans des pays soumis à une contamination modérée (Thaïlande, Taiwan, Mexique ou d'autres provinces de Chine), la prévalence des mutations au niveau du codon 249 est moins forte mais néanmoins significative (10-20 %). Dans les pays sans contamination (Europe et États-Unis), le taux de mutation du gène *p53* dans les HCC est faible et la mutation du codon 249 quasi inexistante. Cette relation dose-réponse

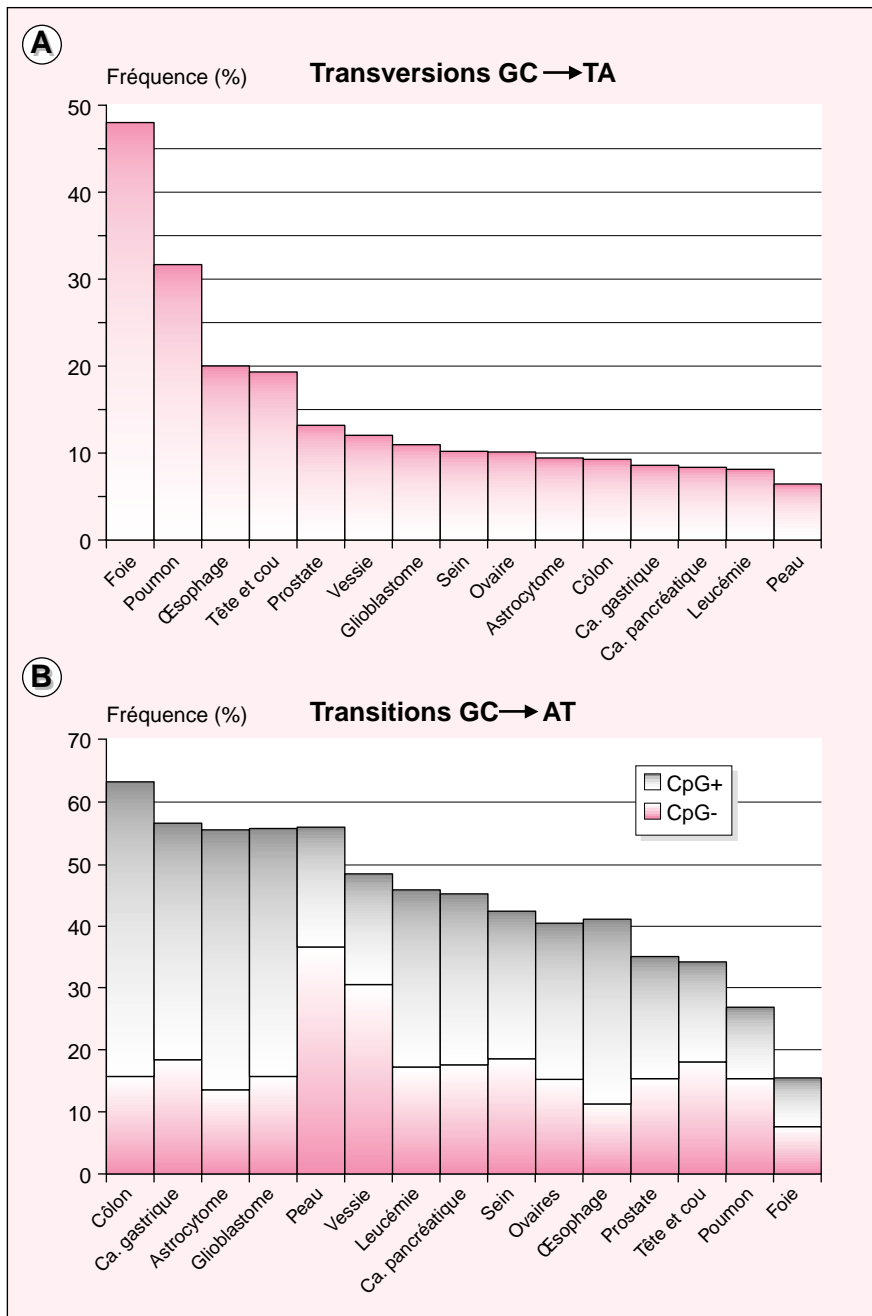


Figure 3. Fréquence des transversions G:C → T:A (A) et des transitions G:C → A:T (B). Les transitions touchant un dinucléotide CpG sont en rouge. Elles sont généralement dues à une désamination spontanée de la 5-méthylcytosine.

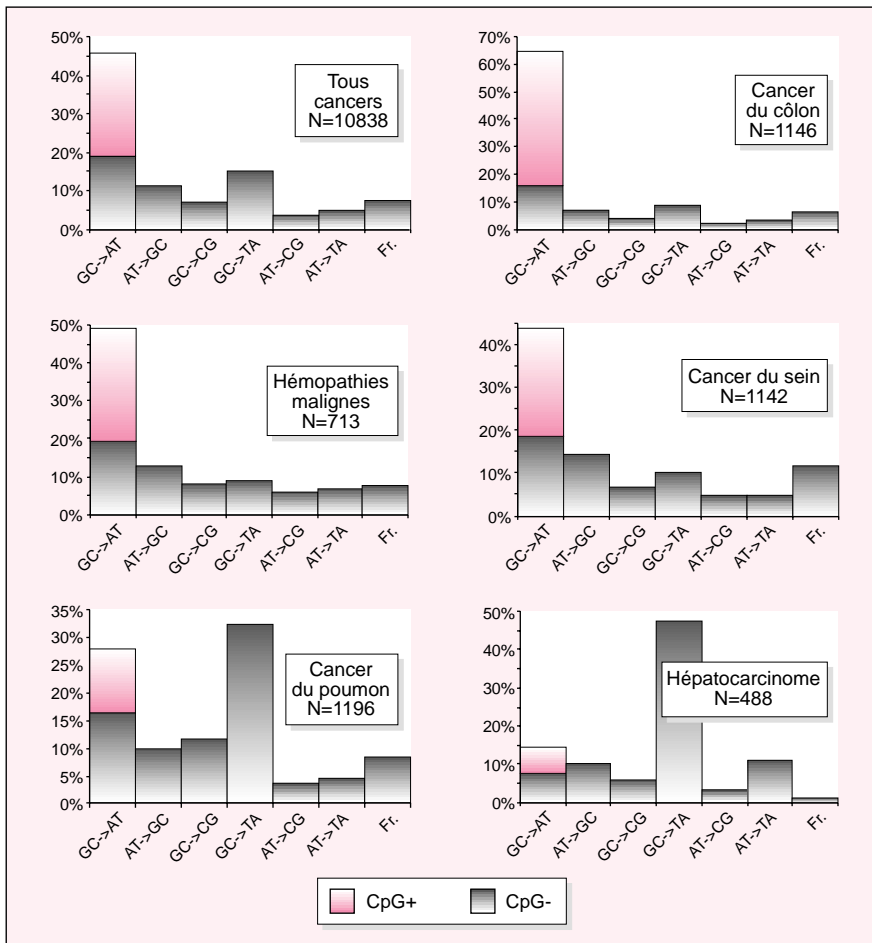


Figure 4. **Fréquence des événements mutationnels dans divers types de cancers.** Fr. : mutations frameshift.

entre le degré de l'exposition à l'aflatoxine et la fréquence des mutations au niveau du codon 249 est un argument très fort pour établir une relation de cause à effet entre les deux [14]. Par ailleurs, la détection de cette mutation dans des cellules provenant de zones non tumorales du foie de ces patients suggère non seulement la spécificité de cette association, mais aussi la précocité de cette lésion génétique [15]. Il reste néanmoins à montrer que ces mutations peuvent être retrouvées dans le foie sain de personnes exposées à l'aflatoxine B1.

In vitro, l'aflatoxine B1 est capable d'induire la formation d'adduits au niveau du codon 249 sur de l'ADN isolé [16]. En revanche, le traitement de cellules avec de l'aflatoxine B1 induit également des adduits au niveau d'autres codons vitaux pour la fonction de la protéine p53 (248 ou 273) [17]. Aucune explication ne

peut être donnée actuellement pour rendre compte du fait que ces mutations ne sont pas retrouvées dans les HCC. Par ailleurs, une étude sur des singes chez lesquels le gène p53 est identique à celui de l'homme, a montré qu'aucune mutation du gène p53 n'était présente dans des HCC induits par l'aflatoxine B1. Encore une fois, nous nous retrouvons dans une situation où les analyses faites au niveau tumoral et leur association avec des données épidémiologiques sont très fortes, mais pour laquelle les analyses *in vitro* ou chez des modèles animaux sont contradictoires. On peut également se poser la question de l'association entre le VHB et p53 dans ce type de cancer. L'inactivation du gène p53 par la protéine X de ce virus n'est pas clairement démontrée et il existe de nombreux HCC ayant à la fois une mutation du gène p53 et une infection par le VHB. Seules des analyses

d'épidémiologie corrélant exposition à l'aflatoxine B1, mutation du gène p53 et infection par le VHB pourront confirmer ou infirmer cette relation de cause à effet.

Cancer broncho-pulmonaire et tabac

L'analyse des événements mutationnels qui altèrent le gène p53 dans le cancer du poumon fait apparaître une majorité de transversions G:C → T:A qui n'apparaît pas dans les autres types de cancers (figures 3 et 4). Par ailleurs, l'analyse de la répartition de ces altérations fait apparaître un point chaud particulier qui n'est pas retrouvé dans d'autres types de cancers (région A' définie en 1992, codon 150-160 avec une préférence pour les codons 157 et 158) (figure 1) [18].

Les analyses épidémiologiques démontrent de façon indiscutable que le cancer bronchique, très rare au début du siècle, s'est développé de façon parallèle à la consommation de tabac avec un décalage homme/femme consécutif à un tabagisme plus tardif dans la population féminine. La fumée de cigarette contient plus de 3 000 substances différentes dont plusieurs ont une activité carcinogène chez l'animal. On retrouve notamment le benzo-a-pyrène, un agent mutagène qui est également présent en grande quantité dans les suies de combustion du charbon et était impliqué dans le cancer du scrotum des ramoneurs. Expérimentalement, le benzo-a-pyrène forme des adduits avec les guanines et la persistance de ces adduits engendre des transversions G:C vers T:A. Il y a de nombreux arguments qui indiquent que les transversions retrouvées au niveau du gène p53 sont dues aux carcinogènes du tabac: (1) seul le cancer du poumon (et dans une mesure moindre les cancers ORL et les cancers de l'œsophage également associés au tabagisme) ont un taux aussi élevé de transversion G:C → T:A; (2) il y a une relation linéaire entre le taux de ces transversions et la quantité de cigarettes fumées; (3) les patients non fumeurs atteints de cancer bronchique ne présentent pas cette fréquence élevée de transversions; (4) le traitement de cellules bronchiques humaines avec du

benzo-a-pyrène induit l'apparition d'adduits spécifiques au niveau du codon 157 du gène *p53* [19]. Il s'agit d'une région riche en guanine qui est certainement un point chaud pour la formation de ces adduits. Le benzo-a-pyrène ne semble pas être le seul coupable car une étude plus récente montre que d'autres hydrocarbures polycycliques présents dans le tabac sont capables de former des adduits au niveau des points chauds de mutations du gène *p53* [20].

Une étude portant sur des mineurs exposés au radon et atteints de cancer bronchique fait apparaître un *hot spot* de mutation au niveau du codon 249 (16 mutations sur 29) [21]. L'événement mutationnel est différent de celui observé dans les HCC car il touche la seconde base du codon 249 (AGG → ATG). Ce résultat suggère que le radon pourrait être responsable de cette signature particulière car cet événement mutationnel n'est retrouvé que dans moins de 1 % des autres cancers pulmonaires. Néanmoins, ce résultat est à prendre avec précaution car il n'a pu être reproduit par plusieurs autres équipes. Il a été suggéré que cette mutation au niveau du codon 249 pourrait être due à une mycotoxine analogue à l'aflatoxine B1, synthétisée par un champignon fréquemment retrouvé dans les bronches des mineurs étudiés.

Récemment, une étude a été effectuée sur des patients atteints de cancers bronchiques de Silésie. Cette région de Pologne est très fortement polluée du fait d'une importante industrialisation [22]. Il y a une forte proportion de transversions G:C → T:A au niveau du codon 298 qui n'avait pas été identifiée dans d'autres types de cancer. Par ailleurs, le taux global de transversions G:C → T:A est significativement plus élevé chez ces patients non fumeurs par rapport à ceux provenant d'autres régions.

Cancer cutané et rayons ultraviolets

Les relations entre exposition au soleil et cancers de la peau (mélanome, carcinomes basocellulaire ou spino-cellulaire) ont été largement établies depuis plus de 30 ans. Plus de 90 % des cancers spino-cellulaires

ont une altération du gène *p53* [23]. Le profil des événements mutationnels retrouvés dans ce type de cancer est unique et n'est retrouvé dans aucune tumeur interne. On observe une prédominance de transitions C → T au niveau de dimères de pyrimidine (figure 5). Il est bien démontré que les rayons ultraviolets (UV), agents étiologiques impliqués dans la majorité des cancers cutanés, agissent directement sur ces dimères de pyrimidines. Particulièrement caractéristiques de l'action des UV, les mutations en tandem CC → TT ne sont retrouvées que dans ce type de

cancer (figure 4). L'ensemble de ces résultats (prédominance des lésions CC → TT sur le brin non codant du gène *p53*) a pu être confirmé expérimentalement dans des modèles d'animaux porteurs de tumeurs induites par des rayons UV.

L'analyse de kératoses actiniques, lésions précancéreuses à l'origine de ces cancers spino-cellulaires, fait également apparaître un très fort taux de mutations du gène *p53* (60 %) avec un profil mutationnel identique à celui observé dans les carcinomes. Une observation importante, faite simultanément par plusieurs équipes,

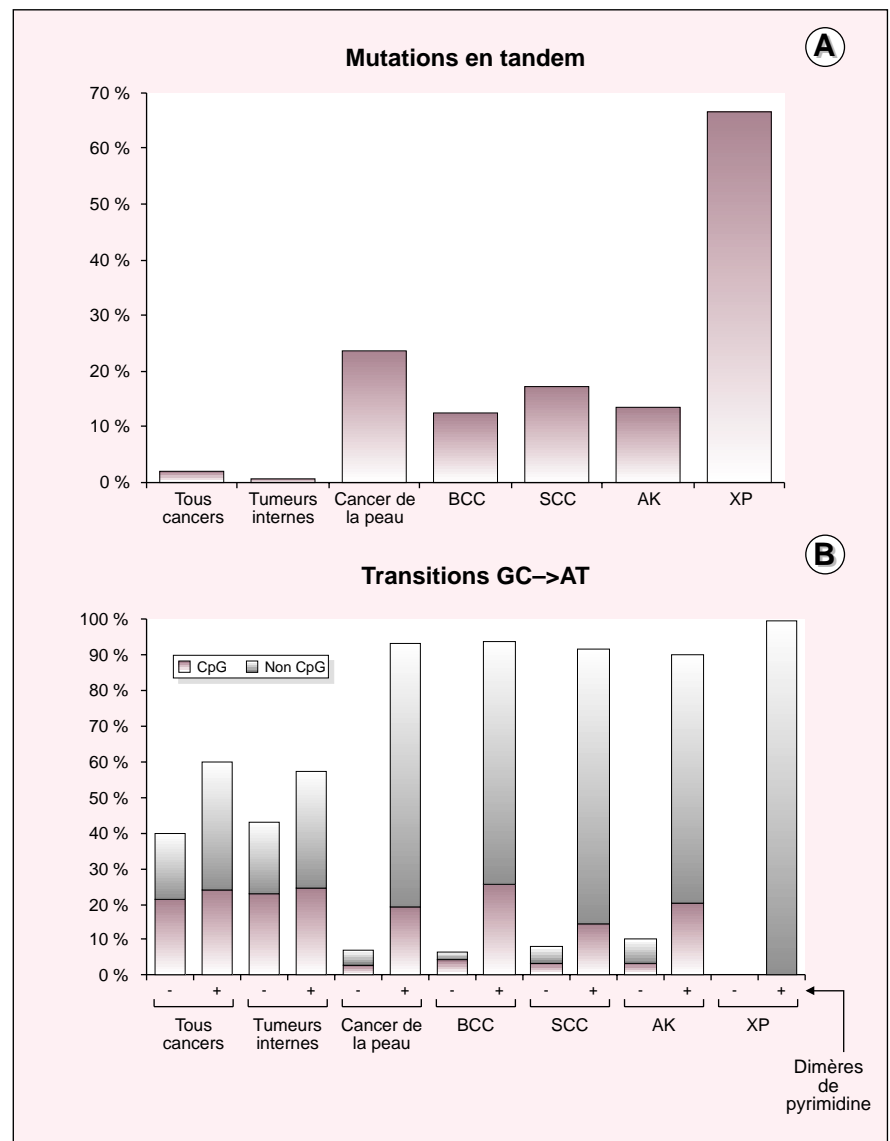


Figure 5. Événements mutationnels inactivant le gène *p53* dans les cancers de la peau. A. Fréquence des mutations en tandem. B. Transition G:C → A:T au niveau des dimères de pyrimidine. BCC: cancers baso-cellulaires; SCC: cancers spino-cellulaires; AK: kératose actiniques; XP: xeroderma pigmentosum.

concerne la mise en évidence de mutations du gène *p53* dans la peau saine de personnes exposées au soleil en absence de toute lésion cancéreuse. Selon une analyse de D. Brash *et al.*, 1 à 5 % de la peau exposée au soleil contient des îlots cellulaires (60-3 000 cellules) ayant une accumulation de protéine [24]. L'analyse moléculaire de ces clones montre qu'ils contiennent des mutations du gène *p53* dont le profil est identique à celles décrites dans les cancers cutanés. Ces îlots ne progressent pas vers un stade tumoral et régressent pour des raisons qui restent à découvrir. Ce phénomène a pu être reproduit *in vivo* chez des souris exposées de façon chronique aux UVB [25].

L'analyse du spectre des mutations du gène *p53* de cancers cutanés chez des patients atteints de xeroderma pigmentosum (XP) a aussi été très informative [26] (*m/s* 1998, n° 11, p. 1289). Le xeroderma pigmentosum est une maladie génétique transmise sur le mode récessif et non liée au sexe. Les patients atteints de xeroderma pigmentosum ont une sensibilité très importante aux rayons UV et sont caractérisés par une très forte fréquence de cancers de la peau dans les parties du corps exposées au soleil (x 2 000 par rapport à la population normale). Les gènes impliqués dans le xeroderma pigmentosum ont été récemment clonés. Ils sont impliqués dans le système de réparation de l'ADN lié à la transcription. Chez ces patients, l'ensemble des phénomènes décrits ci-dessus à propos des mutations du gène *p53* est amplifié: transitions localisées au niveau des dimères de pyrimidine sur le brin non codant et fréquence importante de transitions en tandem (*figure 4*). Dans une analyse plus récente, la nature des événements mutationnels inactivant le gène *p53*, a été étudiée chez des patients atteints de xeroderma pigmentosum provenant de différents groupes de complémentation. Des mutations du gène *p53* sont retrouvées dans 85 % des cancers de la peau des patients xeroderma pigmentosum [26]. Chez les patients XPC (déficients dans les mécanismes de réparation globaux du génome et plus particulièrement des régions non transcrites), la totalité des mutations est retrouvée au niveau du brin non codant avec 85 % de mutations en tan-

dem (33 % chez d'autres types de xeroderma pigmentosum). Ces observations montrent qu'en absence d'un système de réparation efficace, le taux de mutations du gène *p53* induits par les UV est particulièrement élevé. Une réparation préférentielle du brin codant du gène *p53* a été confirmée expérimentalement par Toranaletti et Pfeifer qui ont montré que la vitesse de réparation des dimères de pyrimidine était très variable au niveau du gène *p53*, avec une vitesse particulièrement lente au niveau des codons fréquemment mutés dans les cancers de la peau [27].

L'ensemble de ces travaux montre que les mutations du gène *p53* sont des événements très précoces dans la carcinogenèse cutanée mais nécessitent d'autres événements génétiques pour une expansion de la tumeur. La mise en évidence que certaines substances présentes dans des crèmes de protection solaire atténuent le taux de mutation du gène *p53* devrait nous permettre de mieux développer ce type d'agents.

Les mutations du gène *p53* dans le cancer du sein

L'analyse des mutations du gène *p53* dans les cancers du sein montre une très grande hétérogénéité au niveau de la fréquence des mutations, de la proportion de délétions et d'insertions ainsi qu'au niveau de la fréquence de transversions. Cette hétérogénéité est liée à l'origine géographique des patientes ainsi qu'à des différences ethniques [28-30]. En particulier, plusieurs études portant sur les femmes du Middle West aux États-Unis montrent que près de 40 % des mutations du gène *p53* sont des insertions ou des délétions. Au Japon, une étude a montré que le taux de mutations du gène *p53* pouvait atteindre 80 % dans la région nord du pays alors qu'il est de 20 % dans la région sud [29]. Ces différences pourraient être expliquées par une variabilité importante dans les divers facteurs de risques tels que les facteurs hormonaux, génétiques et alimentaires. Des variations dans le métabolisme des xénobiotiques pourraient être à l'origine de cette diversité mais à l'heure actuelle aucune étude concluante n'a été publiée.

Environ 5 à 10 % des cancers du sein et des cancers de l'ovaire surviennent dans un contexte de prédisposition familiale due à des mutations germinales de gènes tels que *BRCA1*, *BRCA2* (*m/s* 1997, n° 6-7, p. 874) ou d'autres gènes à découvrir. En 1994, une première étude sur des cancers du sein familiaux suggérait que le profil des mutations du gène *p53* pouvait être différent dans ce type de tumeurs. Plusieurs études ont analysé le profil des mutations du gène *p53* en fonction des altérations germinales de *BRCA1* et *BRCA2*. Ce type d'analyse est d'autant plus important que le produit de ces deux gènes semble être également impliqué dans la réparation de l'ADN. Les résultats sont relativement hétérogènes, comme pour les cancers du sein sporadiques, mais plusieurs tendances semblent émerger: (1) la fréquence des mutations du gène *p53* est plus élevée dans les cancers du sein et de l'ovaire ayant une mutation du gène *BRCA1* ou du gène *BRCA2*; (2) on observe un taux élevé de microdélétions ou d'insertions; (3) Il n'y a pas de point chaud de mutation particulier, mais on retrouve de nombreuses mutations rares ou uniques, suggérant un mécanisme de mutagenèse différent ou la sélection de *p53* ayant une fonction particulière. Une étude récente sur l'activité biologique montre effectivement que certaines de ces *p53* mutantes ont conservé leur capacité de transactivation, mais sont incapables d'inhiber la transformation de cellules embryonnaires de rat induite par les oncogènes *ras* et *E7* [31].

Un point important qui ajoute un degré de complexité à ce type d'étude est l'hétérogénéité des mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2*. Il s'agit de grands gènes avec des mécanismes de mutation très hétérogènes (délétion totale ou partielle, mutation faux sens ou non-sens). Une activité résiduelle partielle ou un effet dominant négatif de la part d'une protéine tronquée pourrait être à l'origine de d'une hétérogénéité importante sur la fonction de *p53*. Récemment, une étude sur le cancer du sein médullaire, a mis à jour un nouvel aspect des altérations du gène *p53*. Dans ce cancer, de très bon pronostic, la fréquence de mutations du gène *p53* est de 100 % [32]. Ce travail

prend tout son intérêt avec l'observation que ce type de tumeur est largement surreprésenté dans les populations présentant une altération du gène *BRCA1* (15-20 % contre 1-3 % pour la population normale) [33].

Mutations du gène *p53* et autres cancers

Mis à part les divers types de cancers décrits ci-dessus, l'analyse moléculaire des mutations du gène *p53* a permis de mettre en évidence d'autres types d'hétérogénéités liés à l'exposition à des carcinogènes. La *figure 3* est très démonstrative à ce propos. Dans les cancers de la vessie, on observe un taux élevé de transition G:C → A:T mais celles-ci ne se situent pas au niveau de dinucléotides CpG. Cette observation suggère que l'origine de ces mutations est différente de celle des mutations observées dans les autres cancers tels que le côlon ou les hémopathies malignes. L'étiologie des cancers de la vessie est multiple avec un risque plus élevé chez les fumeurs ou les travailleurs exposés aux amines aromatiques. Les divers travaux publiés sur les cancers de la vessie sont trop hétérogènes pour évaluer un profil mutationnel avec un seul type d'exposition. Seules des études à plus grande échelle dans lesquelles on évaluera simultanément l'exposition et les mutations de *p53* pourront définir le spectre mutationnel en fonction d'agents étiologiques spécifiques. Ceci est d'autant plus important que le statut du gène *p53* semble être un élément décisionnel important dans le choix thérapeutique de ce cancer. Deux autres cancers ayant un taux élevé de transversions G:C → T:A sont les cancers de l'œsophage et ORL, tous deux associés au tabagisme et à l'alcool. Brennan *et al.* ont montré que ce taux de mutations du gène *p53* est directement lié à la consommation de tabac et d'alcool [34].

L'analyse du profil mutationnel du gène *p53* dans les cancers de l'œsophage fait apparaître une hétérogénéité entre les formes épidermoïdes (fréquentes) et les adénocarcinomes (plus rares). Le taux de mutations du gène *p53* dans ces deux formes est élevé (50 % pour les formes épidermoïdes et 70 % pour les adénocarcinomes), mais ces derniers ont une

fréquence plus importante de transition au niveau des îlots CpG par rapports aux premiers. En revanche, on observe une fréquence importante (30 %) de transversions A:T:T:A dans les formes épidermoïdes. Ce type d'événement est rare au niveau du gène *p53* [35]. L'ensemble de ces observations suggère que l'étiologie de ces deux formes de cancers passe par des voies différentes. En particulier, il reste à vérifier l'implication du tabac, de l'alcool ou d'autres facteurs étiologiques dans l'établissement de ces spectres mutationnels.

Plusieurs études ont porté sur l'analyse des mutations du gène *p53* dans les cancers du poumon liés à une exposition à l'amiante [36-40]. Aucune différence, tant au niveau de la fréquence que du spectre des événements mutationnels, n'a été retrouvée par rapport aux patients atteints de cancers bronchiques non exposés.

Conclusions et perspectives

Il est remarquable de voir la vitesse à laquelle l'épidémiologie moléculaire a évolué au cours de la dernière décennie. Il ne fait plus de doute maintenant qu'un grand nombre de cancers humains sont provoqués par des mutations induites par des carcinogènes exogènes. L'analyse des mutations du gène *p53* est un exemple frappant de cette archéologie moléculaire qui nous permet de définir l'origine des mutations pour certains cancers. Dans un futur proche, d'autres gènes pourront probablement être utilisés comme sonde pour ce type d'analyse. Par ailleurs, une meilleure connaissance des signatures moléculaires associées à l'exposition à des carcinogènes devrait nous permettre de mieux affiner ces études.

Il est important maintenant de définir quelles conséquences ces études peuvent avoir en terme de santé publique.

Le diagnostic précoce et la maladie résiduelle

Les mutations du gène *p53* sont des événements précoces dans la carcinogénèse humaine lorsqu'elles sont associées à une exposition à un carci-

nogène (cancer bronchique, de la peau ou du foie), alors qu'elles sont plus tardives dans d'autres cancers comme les hémopathies malignes, les cancers du colon et du sein. Le développement des nouvelles approches de diagnostic moléculaire donnera la possibilité de détecter simultanément un grand nombre d'altérations génétiques sur de multiples gènes (une puce à ADN permettra d'analyser plus de 10 000 mutations). Par ailleurs, la sensibilité de ces méthodes évoluera afin de permettre un diagnostic à partir d'un prélèvement ne contenant qu'un faible contingent de cellules tumorales (lésions pré-néoplasiques, cellules tumorales circulantes, selles ou urines). Par exemple, la recherche des mutations du gène *p53* dans des lésions précancéreuses de patients tabagiques n'est plus de la science-fiction [41].

De la même façon, la connaissance d'une altération du gène *p53* dans une tumeur donnée, peut servir comme « sonde » pour nous renseigner sur la totale disparition de la tumeur après traitement, et son éventuelle réapparition lors d'une rechute.

Dans certains cancers, la présence de points chauds de mutations est le reflet d'une affinité particulière d'un carcinogène pour cette séquence. Il n'est donc pas exclu d'envisager directement la détection spécifique d'adduits dans des tissus exposés et rechercher leur relation avec un développement tumoral. La destruction spécifique de telles cellules serait une grande avancée dans le traitement précoce des lésions précancéreuses.

La prévention

Au cas où les études antérieures n'auraient pas été suffisamment convaincantes, il est maintenant clair que les gènes humains sont directement la cible d'agents cancérigènes dont la responsabilité dans la genèse du processus tumoral ne fait plus de doute. Comme nous l'avons indiqué dans l'introduction, l'environnement est sans doute responsable de 90 % des cancers humains. Il est donc essentiel d'entreprendre une réelle politique de prévention basée sur les données obtenues à partir de l'épidé-

miologie moléculaire. Celle-ci peut être faite au niveau individuel pour les cancers liés au mode de vie et/ou de comportement et dont toute variation dépendra d'une démarche personnelle. Cela justifie de renforcer les campagnes de prévention vis-à-vis des agents cancérigènes dont le lien étiologique et le mécanisme de survenue pour des sites spécifiques de cancers est désormais bien connu sur le plan moléculaire. Il est important de se rendre compte que certains cancers, rares au début du siècle, ont vu leur prévalence décuplée en cette fin de siècle ■

Remerciements

Nous sommes reconnaissants à N. Basset-Seguïn, P. Beaune, S. Benhamou, K. Bensaad, M. Lebras, D. Marzin, J.C. Pairon, E. Sage, B. Salles, A. Sarasin ainsi qu'aux rapporteurs anonymes pour leur lecture critique de ce manuscrit. Les travaux concernant la création de cette base de données, du logiciel UMD et du site web ont été financés par l'ARC et la Fondation de France. La totalité des figures issues de l'analyse des mutations du gène *p53* n'a pas pu être incluse dans cette revue par manque de place. Elles sont accessibles sur notre site Internet: <http://perso.curie.fr/Thierry.Soussi/>

RÉFÉRENCES

- Harris CC. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res* 1991; 51 (suppl): 5023-44.
- Knudson AG. Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122: 135-40.
- Fearon ER. Human cancer syndromes: Clues to the origin and nature of cancer. *Science* 1997; 278: 1043-50.
- Soussi T. The p53 tumour suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer. *Mol Med Today* 1996; 2: 32-7.
- Gottlieb TM, Oren M. p53 in growth control and neoplasia. *Bba-Rev Cancer* 1996; 1287: 77-102.
- Ory K, Legros Y, Auguin C, Soussi T. Analysis of the most representative tumour-derived p53 mutants reveals that changes in protein conformation are not correlated with loss of transactivation or inhibition of cell proliferation. *EMBO J* 1994; 13: 3496-504.
- Blandino G, Levine AJ, Oren M. Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. *Oncogene* 1999; 18: 477-85.
- Soussi T, Dehouche K, Bérout C. p53 Website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: Forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum Mutat* 2000; 15: 105-13.
- Goh HS, Yao J, Smith DR. p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1995; 55: 5217-21.
- Bergh J, Norberg T, Sjogren S, Lindgren A, Holmberg L. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med* 1995; 1: 1029-34.
- Cho YJ, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994; 265: 346-55.
- Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G-mutation to T-mutation of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern africa. *Nature* 1991; 350: 429-31.
- Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 1991; 350: 427-8.
- Montesano R, Hainaut P, Wild CP. Hepatocellular carcinoma: From gene to public health. *J Nat Cancer Inst* 1997; 89: 1844-51.
- Aguilar F, Harris CC, Sun T, Hollstein M, and Cerutti P. Geographic variation of p53 mutational profile in nonmalignant human liver. *Science* 1994; 264: 1317-9.
- Puisieux A, Lim S, Groopman J, Ozturk M. Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens. *Cancer Res* 1991; 51: 6185-9.
- Denissenko MF, Koudriakova TB, Smith L, TR OC, Riggs AD, Pfeifer GP. The p53 codon 249 mutational hotspot in hepatocellular carcinoma is not related to selective formation or persistence of aflatoxin B-1 adducts. *Oncogene* 1998; 17: 3007-14.
- Caron de Fromentel C, Soussi T. TP53 Tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chrom Cancer* 1992; 4: 1-15.
- Denissenko MF, Pao A, Tang MS, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 1996; 274: 430-2.
- Smith LE, Denissenko MF, Bennett WP, et al. Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 803-11.
- Hei TK, Bedford J, Waldren CA. p53 mutation hotspot in radon-associated lung cancer. *Lancet* 1994; 343: 1158.
- Rusin M, Butkiewicz D, Malusecka E, et al. Molecular epidemiological study of non-small-cell lung cancer from an environmentally polluted region of Poland. *Br J Cancer* 1999; 80: 1445-52.
- Brash DE. Sunlight and the onset of skin cancer. *Trends Genet* 1997; 13: 410-4.
- Jonason AS, Kunala S, Price GJ, et al. Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14025-9.
- Berg RJW, Vankranen HJ, Rebel HG, et al. Early p53 alterations in mouse skin carcinogenesis by UVB radiation: immunohistochemical detection of mutant p53 protein in clusters of preneoplastic epidermal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 274-8.
- Giglia G, Dumaz N, Drougard C, Avril MF, Daya Grosjean L, Sarasin A. p53 mutations in skin and internal tumors of xeroderma pigmentosum patients belonging to the complementation group C. *Cancer Res* 1998; 58: 4402-9.
- Tornaletti S, Pfeifer GP. Slow repair of pyrimidine dimers at p53 mutation hotspots in skin cancer. *Science* 1994; 263: 1436-8.
- Sommer SS, Cunningham J, McGovern RM, et al. Pattern of p53 gene mutations in breast cancers of women of the midwestern united states. *J Nat Cancer Inst* 1992; 84: 246-52.
- Blaszkyk H, Hartmann A, Tamura Y, et al. Molecular epidemiology of breast cancers in northern and southern Japan: The frequency, clustering, and patterns of p53 gene mutations differ among these two low-risk populations. *Oncogene* 1996; 13: 2159-66.
- Hartmann A, Blaszkyk H, Kovach JS, Sommer SS. The molecular epidemiology of P53 gene mutations in human breast cancer. *Trends Genet* 1997; 13: 27-33.
- Smith PD, Crossland S, Parker G, et al. Novel p53 mutants selected in BRCA-associated tumours which dissociate transformation suppression from other wild-type p53 functions. *Oncogene* 1999; 18: 2451-9.
- de Cremoux P, Salomon AV, Liva S, et al. p53 mutation as a genetic trait of typical medullary breast carcinoma. *J Nat Cancer Inst* 1999; 91: 641-3.
- Eisinger F, Jacquemier J, Charpin C, et al. Mutations at BRCA1: the medullary breast carcinoma revisited. *Cancer Res* 1998; 58: 1588-92.
- Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332: 712-7.
- Montesano R, Hollstein M, Hainaut P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer* 1996; 69: 225-35.
- Husgafvel-Pursiainen K, Karjalainen A, Kannio A, et al. Lung cancer and past occupational exposure to asbestos - Role of p53 and K-ras mutations. *Am J Respir Cell Molec Biol* 1999; 20: 667-74.

RÉFÉRENCES

37. Husgafvel-Pursiainen K, Kannio A, Oksa P, *et al.* Mutations, tissue accumulations, and serum levels of p53 in patients with occupational cancers from asbestos and silica exposure. *Environ Mol Mutagen* 1997; 30: 224-30.
38. Kannio A, Ridenpää M, Koskinen H, *et al.* A molecular and epidemiological study on bladder cancer: p53 mutations, tobacco smoking and occupational exposure to asbestos. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5: 33-9.
39. Nuorva K, Makitaro R, Huhti E, *et al.* p53 protein accumulation in lung carcinomas of patients exposed to asbestos and tobacco smoke. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 528-33.
40. Wang X, Christiani DC, Wiencke JK, *et al.* Mutations in the p53 gene in lung cancer are associated with cigarette smoking and asbestos exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4: 543-8.
41. Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, *et al.* Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 332-9.

Summary

Analysis of p53 gene mutations in human cancer: the link between epidemiology and carcinogenesis

The development of data base repertoires of these gene mutations is a valuable and indispensable tool in the search for genotype/phenotype correlations and in the study of mechanisms of mutagenesis. In this respect the analysis of the pattern of p53 mutations has become a paradigm. Indeed, the study of mutational events constitutes a true « mole-

cular » type of archeology and has the potential to elucidate the origin of the mutations. The possibility of uncovering a direct link between the development of a certain type of cancer following exposure to a carcinogen, and a specific mutation already documented in animal studies, opens important new perspectives in public health.

TIRÉS À PART

T. Soussi.