

Compte rendu du 6^e atelier sur le gène et la protéine p53 (Tibérias, Israël, 1^{er}-5 novembre 1992)

D'abord d'un impact limité à un petit cercle d'adeptes, la protéine p53 (*m/s n° 8, vol. 6, p. 821*) est maintenant l'objet d'un intérêt très large de la communauté scientifique internationale, aussi bien d'ailleurs auprès des fondamentalistes que des cliniciens cancérologues. Cette évolution reflète bien celle de la place qu'on lui reconnaît dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Longtemps considérée comme une simple bizarrerie de laboratoire, l'absence complète de cette protéine dans des cellules notoirement transformées, comme les cellules HeLa et quelques autres, s'explique maintenant par sa double personnalité : celle d'un oncogène conventionnel, attestée par les expériences classiques de transfection et qui sont le fait des formes mutées, les seules initialement connues ; celle d'un anti-oncogène, dans sa forme « sauvage », dont l'absence contribue au processus de tumorigénèse.

Très étudiées par les cliniciens, les mutations ou l'absence de la p53 représentent l'altération somatique la plus commune de toutes les tumeurs humaines et de nombreux rapports à cette réunion n'ont fait que renforcer cette statistique en l'enrichissant d'explications mécanistes (Harris, Bethesda, USA). Il apparaît en effet clairement que certaines de ces mutations sont spontanées, comme celles du cancer du côlon et du sein, tandis que d'autres portent la signature d'agents mutationnels de l'environnement, physiques comme l'irradiation UV dans les cancers de la peau (Daya-Grosjean, Villejuif, France) ou chimiques comme l'aflatoxine dans des populations bien particulières d'hépatocarcinome primaire d'Afrique méridionale et d'Asie du Sud-Est (Ozturk, Lyon, France), alors que les mêmes tumeurs d'origine géographique différente (Japon, Europe, Amérique du

Nord, Moyen-Orient) ne présentent pas ces caractéristiques (*m/s n° 3, vol. 8, p. 289*) (Debuire, Villejuif, France). L'implication du virus HBV ne dispense pas de l'acquisition d'une mutation p53 pour le développement de ces tumeurs (Ozturk, Lyon, France). Certaines mutations observées dans le cancer du sein, sont, elles aussi, évocatrices d'un effet de l'environnement, encore que la nature du mutagène en cause ne fasse l'objet d'aucune suspicion précise.

Une étude systématique chez le rat ou la souris (P. May, Villejuif, France) *in vivo* a bien montré la variabilité des mutations et des types de tumeurs obtenus selon l'agent chimique utilisé ou l'environnement génétique de la souche animale et a souligné la nécessité de relativiser l'interprétation des résultats épidémiologiques chez l'homme.

Quoi qu'il en soit de ces mécanismes causaux, le répertoire des sites mutationnels est très large et plusieurs laboratoires ont entrepris d'en caractériser les effets individuels. Il en est ressorti : (1) que les mutations n'entraînent pas systématiquement la perte de fonction (Soussi, Paris, France), d'où l'intérêt du test fonctionnel développé par Th. Frébourg (Charlestown, USA). Ce test est fondé sur l'effet de la coexpression de p53 sauvage et de l'allèle muté isolé de la tumeur par PCR sur un gène rapporteur évalué par colorimétrie ; (2) qu'elles ne sont pas toujours dominantes-négatives (c'est-à-dire qu'elles ne inhibent pas nécessairement la fonction onco-suppressive de l'allèle normal). C'est le cas notamment pour certaines mutations héritées, observées dans le syndrome de Li-Fraumeni, qui restent phénotypiquement récessives face à une p53 normale (*m/s n° 10, vol. 6, p. 1006 ; n° 7, vol. 8, p. 733*) (Bargonetti, Bhatia, New York, USA ;

Frébourg, Charlestown, USA) ; et (3), enfin, que des cas ont été rapportés où la localisation de la p53 normale (Moll, Princeton, USA) ou mutée (Lawrence, Grenoble, France) cessait d'être nucléaire pour devenir cytoplasmique (*m/s n° 8, vol. 8, p. 874*), une situation évidemment incompatible avec un rôle dans le contrôle de la transcription. Chez le xénope, p53 est stockée de façon stable dans le cytoplasme de l'ovocyte (Méchal, Paris, France).

Si la notion de trans-dominance négative a perdu de son caractère dogmatique, elle n'en reste pas moins la situation la plus fréquente par un mécanisme d'oligomérisation dont l'étude bénéficie grandement de la technique de cotraduction *in vitro* de messagers des formes sauvages et mutées mise au point par J. Milner (York, Angleterre).

La localisation des différentes propriétés ou fonctions de la p53 sur la structure primaire de la protéine est loin d'être claire, mais on peut en dégager les points suivants :

- le domaine N-terminal semble requis pour les fonctions de trans-activation transcriptionnelle (*m/s n° 8, vol. 6, p. 821*) ;
- c'est du domaine C-terminal que dépendent les fonctions de fixation à l'ADN, de transformation, d'oligomérisation, de dégradation dépendante de la protéine E6 du virus HPV (Milner, York, Angleterre ; Vousden, Londres, Angleterre), de localisation nucléaire et de fixation de la protéine de choc thermique HSP70. Tous ces sites sont largement chevauchants et la plupart de ces propriétés, en tout cas la transformation et la fixation à l'ADN, semblent dépendre de l'oligomérisation. Un fragment protéique minimal, couvrant les résidus 302 à 360 de l'extrémité C-terminale (qui va jusqu'à 390), a conservé les propriétés d'oligomé-

sation et de transformation, et agit en induisant la formation d'un oligomère inactif avec la protéine complète (Oren, Rehovot, Israël).

Les fonctions résidant dans ces deux domaines protéiques sont contrôlées par des phosphorylations intervenant sur de nombreux sites identifiés et effectuées du côté N-terminal par la caséine kinase I et la protéine kinase dépendante de l'ADN double-brin, du côté C-terminal par la caséine kinase II et la p34^{cdc2}.

La protéine ne peut se fixer à l'ADN qu'après modification de son extrémité carboxy-terminale (Lane, Dundee, Écosse) : par exemple la fixation d'un anticorps monoclonal spécifique ou de la HSP70, ou encore la déletion des derniers acides aminés, ou la phosphorylation de la sérine 386 par la caséine kinase II (Meek, Dundee, Écosse). Ce même résidu est le siège d'une liaison covalente à l'ARN ribosomique 5,8 S (Carroll, New York, USA), une observation très curieuse qui n'a pas reçu d'explication fonctionnelle. C'est aussi dans le domaine C-terminal qu'une activité de stimulation de la réassociation des deux brins de l'ADN a été localisée (Jenkins, Londres, Angleterre) alors qu'elle n'est pas détectée dans la protéine complète.

La p53 se trouve au cœur d'un réseau de régulation extrêmement complexe qui fait intervenir des interactions directes protéine-protéine ou des régulations géniques dont elle est la cible ou l'effecteur. Les partenaires d'interaction protéine-protéine de la p53 sont très divers. Elle interagit d'abord avec elle-même puisque la forme active est sans doute un tétramère. Les mutants sont en général capables d'entrer dans la constitution de ces oligomères en leur faisant perdre leur capacité à se fixer à l'ADN et à arrêter la prolifération (effet de trans-dominance négative). L'antigène T du virus SV40, la HSP 70, les protéines E1B de l'adénovirus et la protéine E6 du papillomavirus sont des partenaires classiques. Concernant cette dernière, G. Riou (Villejuif, France) n'observe pas la corrélation négative entre l'infection par HPV et la mutation de la p53 dans les cancers du col de l'utérus initialement rapportée par Vousden (*m/s* n° 8, vol. 8, p. 874) (Londres, Angleterre), mais celle-ci la confirme et note que

des mutations p53 peuvent apparaître dans des métastases de tumeurs HPV-positives. A ces partenaires classiques, il faut maintenant ajouter une longue liste de nouveaux :

- la protéine Mdm-2 (Momand, Finlay, Princeton, USA ; Kern, Baltimore, USA), codée par un gène identifié dans les chromosomes double minute de souris et qui interagit par sa région N-terminale avec la p53. Mdm-2 et les gènes viraux ci-dessus sont tous capables d'abroger l'activation transcriptionnelle par p53 ;
- le récepteur du virus d'Epstein-Barr (EBV-C3dR) (Frade, Paris, France) ;
- NF-IL-6 *alias* C/EBP β ou LAP (Margulies, New York, USA), encore qu'il ne soit pas très clair s'il s'agit d'une interaction directe ou fonctionnelle ;
- plusieurs protéines non encore identifiées obtenues par clonage systématique de protéines interagissant avec p53 ;
- enfin, deux communications (Shenk, Princeton, USA ; Aloni, Rehovot, Israël) ont décrit l'interaction de la forme sauvage de p53 avec la *TATA binding protein* (TBP), une sous-unité du facteur de transcription TFIID. Ces observations sont particulièrement intéressantes car elles pourraient contribuer à expliquer la répression transcriptionnelle exercée par p53 à l'encontre de nombreux gènes qui ne contiennent pas les séquences cibles caractéristiques. Il faut cependant remarquer que TBP est normalement en grand excès sur p53 et que cet effet inhibiteur ne devrait s'observer que dans des situations où p53 est abondante, comme après lésion de l'ADN ou au cours de la spermatogenèse (Rotter, Rehovot, Israël).

Au-delà de ces interactions directes protéine-protéine, p53 agit comme un activateur transcriptionnel sur de nombreux gènes, à commencer par son propre gène (Lozano, Houston, USA), grâce à une séquence contenant un motif NF- κ B (*m/s* n° 1, vol. 7, p. 67) qui est à elle seule capable, lorsqu'elle est oligomérisée, de conférer la réponse à p53 à un promoteur hétérologue. Cette auto-activation pourrait aboutir à des niveaux très élevés de protéine p53, n'était l'importance des régulations post-transcriptionnelles et notamment la dégradation de la protéine. On

pourrait voir là l'explication de certains cas de dominance de la protéine sauvage sur la protéine mutée par un simple effet de dose permettant l'inactivation de TBP (voir plus haut). Il faut noter à ce sujet l'observation de Lane (Dundee, Écosse) que des tissus normaux de membres d'une famille à cancer du sein expriment la p53 sauvage à un taux très élevé.

Plusieurs autres gènes subissent une activation transcriptionnelle au travers de séquences de réponse à la p53 caractérisées par des répétitions de motifs TGCCCT décrites par le groupe de Vogelstein (Baltimore, USA) (*m/s* n° 6, vol. 8, p. 612) :

- *mdm-2* dont la transcription est ici activée au travers d'un élément p53 situé dans le premier intron du gène (Momand, Princeton, USA). Si on se rappelle l'interaction neutralisante entre les protéines p53 et Mdm-2, on voit là une intéressante boucle d'autorégulation ;
- *thy-1* (Zambetti, Princeton, USA) ;
- *gadd-45* (*growth arrest and DNA damage inducible genes*), pour lequel l'élément p53 est dans l'intron 4 (Kastan, Baltimore, USA) (voir brève, p. 100 de ce numéro) ;
- la créatine kinase du muscle (Zambetti, Princeton, USA ; Simmons, Newark, USA) ;
- le gène *rad-6* (Kern, Baltimore, USA), impliqué dans la réparation de l'ADN et qui est l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine et intervient donc dans la dégradation des protéines ;
- le gène *mdr* (*multi-drug-resistance*) (Gottesman, Bethesda, USA) ;
- de nouveaux gènes inconnus.

L'effet de p53 sur la transcription n'est pas toujours activateur. Il peut aussi jouer le rôle d'un répresseur transcriptionnel (*m/s* n° 2, vol. 8, p. 184) vis-à-vis de gènes comme Rb (Zacksenhaus, Toronto, Canada) ou PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) (Jackson, Canberra, Australie). La régulation négative de cette protéine, qui est un cofacteur essentiel de l'ADN-polymérase δ , pourrait être un élément d'explication de l'effet antiprolifératif de p53 par blocage en G1.

Si p53 contrôle beaucoup d'autres gènes, elle est à son tour la cible d'un certain nombre d'effecteurs. Beaucoup sont pour elle des partenaires directs d'interaction protéine-protéine, mais

deux exemples de contrôle génique ont été rapportés :

- le complexe Myc-Max et USF, qui activent le promoteur p53 *via* une séquence CACGTG reconnue par les membres de la famille bHLH (*basic sequence/helix loop helix domain*) (Reisman, Rehovot, Israël) ;

- le gène AT (Kastan, Baltimore, USA). Cette notion est fondée sur l'observation que des cellules de malades atteints d'*ataxia telangectasia* déficientes en ce gène ont une synthèse de l'ADN résistante aux radiations et n'induisent pas p53 après irradiation γ . Il est difficile d'intégrer cette profusion d'informations dans un modèle cohérent de la fonction de p53. Il émerge cependant clairement que beaucoup des effets (positifs ou négatifs) de p53 sur de nombreux gènes concourent à bloquer la prolifération cellulaire en arrêtant les cellules en phase G1. Les souris *knock-out* dont le gène p53 a été inactivé par recombinaison homologue (Donehower, Houston, USA) confirment cette notion. En effet, même les homozygotes -/- sont viables et normaux mais développent toutes des tumeurs et ne dépassent pas l'âge de 10 mois (*m/s n° 5, vol. 8, p. 492*). Les hétérozygotes ont aussi une fréquence accrue de tumeurs de types différents mais survivent plus longtemps que les précédentes. Les cellules de ces souris ne sont plus capables d'arrêter en G1 après irradiation mais récupèrent cette propriété par transfection de p53 normale. Ainsi l'inductibilité de p53 par lésion de l'ADN (Lane, Dundee, Écosse ; Kastan, Baltimore, USA) lui permettrait d'assumer son rôle de « gardien du génome » en arrêtant les cellules en G1 (G1 *checkpoint*) pour leur laisser le temps d'en effectuer la réparation, c'est-à-dire avant d'engager la réplication d'un ADN dont l'intégrité ne serait plus assurée (*m/s n° 9, vol. 8, p. 1002*). L'observation que les spermatoocytes primaires expriment p53 à un niveau élevé au stade pachytène de leur méiose (Rotter, Rehovot, Israël) corrobore l'interprétation ci-dessus puisque ce stade est caractérisé par une intense activité de réparation de l'ADN et la mort d'un nombre considérable de cellules. Elle suggère aussi un lien avec le phénomène d'apoptose (mort cellulaire programmée) que confirment les études sur les lymphomes B

(Wiman, Stockholm, Suède). La fréquence des mutations p53 est en effet considérable dans les lignées (60 %) ou les biopsies (30 %) de lymphomes de Burkitt qui, toutes, ont un oncogène *c-myc* activé par translocation. Dans tous ces cas, la mutation ou l'absence de p53 empêche l'apoptose, qui peut être restaurée par transfection d'une p53 normale.

Ce phénomène est à rapprocher de l'instabilité génomique qui caractérise beaucoup de types tumoraux. L'acquisition de cette instabilité, étudiée sur le système modèle de résistance au PALA par amplification du gène CAD de la synthèse des pyrimidines, montre qu'elle dépend d'un trait génétique récessif qui ségrège indépendamment des propriétés d'immortalisation ou de tumorigenèse et qu'il doit donc exister des gènes capables de prévenir ce phénomène (*m/s n° 5, vol. 8, p. 500*) (Tlsty, Chapel Hill, USA). p53 serait un bon candidat à une telle fonction puisqu'il agit sur le mode récessif et que sa transfection dans des fibroblastes Li-Fraumeni ou dans des cellules de souris *knock-out* qui amplifient à grande fréquence ramènent celle-ci à des valeurs normales. Il faut cependant remarquer que l'instabilité génomique s'établit en général dans les tumeurs avant les altérations de la p53, qui sont en règle tardives, et que cela implique donc l'existence d'autres voies de contrôle de cette instabilité ■

Philippe Jeanteur
Jean-Marie Blanchard

CRLC Val d'Aurèle, parc Euromédecine, 34094 Montpellier Cedex 2 et URA/Cnrs 1191 génétique moléculaire, université Montpellier II, sciences et techniques du Languedoc, place E.-Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France.

TIRÉS A PART

Ph. Jeanteur.