

Interaction entre l'inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines p21 et le PCNA : un lien entre le cycle cellulaire, la réplication et la réparation de l'ADN

**Corinne Cayrol
Bernard Ducommun**

Les inhibiteurs des protéine-kinases dépendantes des cyclines (CDK), ou CKI, contrôlent la prolifération cellulaire en réglant les transitions entre les différentes phases du cycle cellulaire. Ils modulent l'activité des CDK en réponse à des signaux intra ou extracellulaires. L'un de ces inhibiteurs, p21^{CIP1/WAF1}, est un médiateur de l'arrêt du cycle cellulaire induit par la protéine p53 en réponse à des lésions de l'ADN. Il se distingue des autres CKI par sa capacité d'interagir avec le PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), un facteur auxiliaire des ADN polymérase δ et ϵ nécessaire à la réplication et à la réparation de l'ADN. L'association, dans les cellules humaines non transformées, de p21 avec le PCNA et différentes CDK au sein de complexes quaternaires p21/PCNA/cycline/CDK permet d'établir un lien direct entre la régulation du cycle cellulaire et la maintenance de l'information génétique. Lorsque l'ADN est endommagé, p21 pourrait ralentir la progression du cycle cellulaire, *via* l'inhibition des complexes cyclines/CDK et de la réplication dépendante du PCNA.

ADRESSE

C. Cayrol : *chercheur postdoctoral*. B. Ducommun : *professeur de biologie cellulaire, responsable du groupe Bases moléculaires du contrôle de la prolifération*. Institut de pharmacologie et de biologie structurale du Cnrs, UPR 9062, Université Paul-Sabatier, 205, route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex, France.

Depuis une dizaine d'années, les connaissances sur les mécanismes moléculaires de contrôle du cycle cellulaire ont largement bénéficié des recherches réalisées dans de nombreux organismes modèles comme la levure, les invertébrés marins, le xénope ou la drosophile.

Les découvertes des kinases dépendantes des cyclines, les CDK, dont le chef de file est p34^{Cdc2}, et de leurs sous-unités régulatrices, les cyclines, ont ainsi été les résultats d'approches convergentes montrant l'universalité des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire. Les multiples complexes cyclines/CDK per-

mettent la progression dans le cycle et, en particulier, le passage des différents points de contrôle. La protéine Cdc2, en association avec la cycline A et la cycline B, assure la transition G2/M; les cyclines de type D, complexées aux kinases Cdk4 et Cdk6, interviennent au cours de la progression en fin de phase G1; les complexes cycline E/Cdk2 et cycline A/Cdk2, quant à eux, jouent un rôle clé dans la transition G1/S et le déroulement de la phase S [1]. Récemment, l'identification d'une nouvelle famille de régulateurs, les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CKI), a eu un impact majeur sur l'évolution des recherches dans ce domaine. En effet, elle a permis de mettre à jour des connexions moléculaires directes entre la « machinerie du cycle » et les voies de contrôle de la prolifération.

Aujourd'hui, au moins sept protéines appartenant à la famille des CKI ont été isolées chez les mammifères [2]. On peut les classer en deux catégories, selon leur analogie de séquence et leur mode d'action : (1) les membres de la famille p21 (p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1} et p57^{KIP2}) qui se lient aux complexes cyclines/Cdk et inhibent leur activité et, (2) ceux de la famille p16 (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} et p19^{INK4D}) qui entrent en compétition avec les cyclines pour la liaison aux CDK. L'une des caractéristiques de la protéine p21, qui la différencie des autres CKI est sa capacité de s'associer de façon stable au PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), un facteur auxiliaire des ADN polymérase δ et ε, nécessaire à la réplication et à la réparation de l'ADN [3]. On est actuellement en train de caractériser les modalités moléculaires de l'inhibition des complexes cyclines/Cdk par les protéines de la famille de p21 par des approches de biologie structurale [4], mais un grand nombre de questions restent posées concernant le rôle de cette interaction p21/PCNA au cours du cycle cellulaire, de la réplication et de la réparation de l'ADN. En particulier, le PCNA associé à différents complexes cyclines/CDK a-t-il une fonction dans le cycle cellulaire, indépendante de sa fonction au cours de la synthèse de l'ADN? De même, la protéine p21 qui est co-localisée avec le PCNA

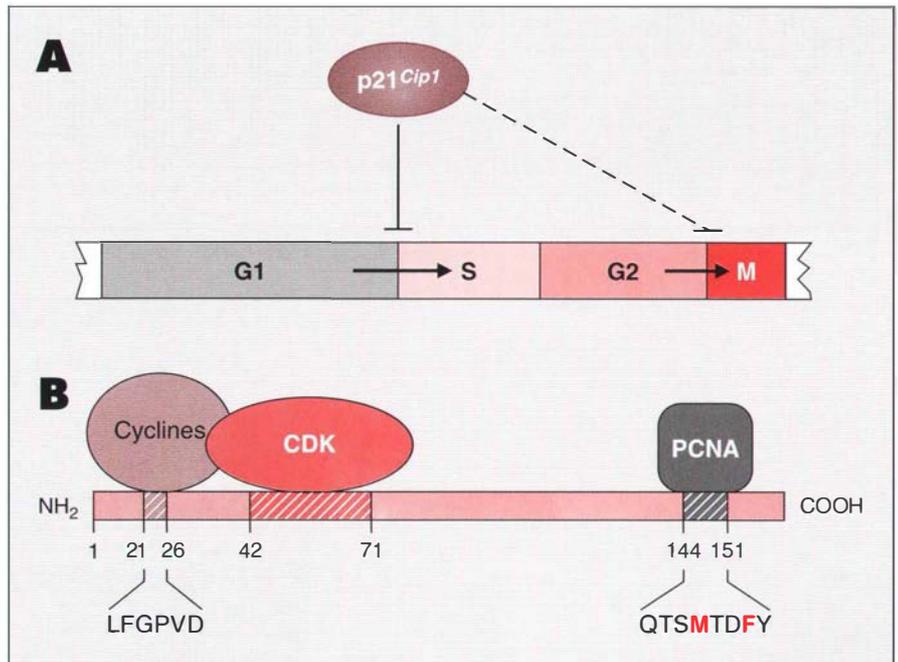


Figure 1. L'inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines, p21^{Cip1}. A. La protéine p21^{Cip1} arrête le cycle cellulaire à la transition G1/S en inhibant l'activité de complexes cyclines/CDK. Elle pourrait également être impliquée dans le contrôle de l'entrée en mitose. B. Représentation schématique des domaines d'interaction entre la protéine p21 et ses partenaires, le PCNA et le complexe cycline/CDK. La protéine p21 contient trois domaines fonctionnels indépendants : un motif de liaison aux cyclines (acides aminés 21 à 26) et un domaine de liaison aux CDK (acides aminés 42 à 71) dans la partie amino-terminale, et un motif de liaison au PCNA (acides aminés 144-151) dans la partie carboxy-terminale. Les acides aminés sont indiqués par le code à une lettre : A : Ala; C : Cys; D : Asp; E : Glu; F : Phe; G : Gly; H : His; I : Ile; K : Lys; L : Leu; M : Met; N : Asn; P : Pro; Q : Gln; R : Arg; S : Ser; T : Thr; V : Val; W : Trp; Y : Tyr.

dans les noyaux de cellules réparant intensivement leur ADN, joue-t-elle un rôle dans la réparation?

Dans cette revue, nous rappellerons les principales caractéristiques de p21, puis nous discuterons les modalités moléculaires de l'interaction p21/PCNA. L'association entre ces deux partenaires pourrait jouer un rôle essentiel dans la connexion entre la réplication, la réparation de l'ADN et la progression du cycle cellulaire.

L'inhibiteur des CDK p21

Les cibles préférentielles de p21 semblent être les complexes enzymatiques (cycline E/Cdk2, cycline A/Cdk2, et peut-être cycline D/Cdk4) impliqués dans la régulation de la transition entre les phases G1 et S (figure 1A) [5]. En effet, la

surexpression du gène de p21 provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 par inhibition de l'entrée en phase S [6]. La protéine p21 s'associe également, mais avec une plus faible affinité, aux complexes cycline B/Cdc2 et pourrait ainsi moduler, bien que cela n'ait pas été formellement montré, l'activité des kinases impliquées dans le contrôle de l'entrée en mitose (figure 1A). L'inhibition de l'activité catalytique des complexes cyclines/CDK est relayée par le domaine amino-terminal de p21. Ce domaine comprend deux sites de liaison indépendants pour les cyclines et les CDK (figure 1B), et est analogue aux domaines amino-terminaux des inhibiteurs p27^{KIP1} et p57^{KIP2} [7, 8]. La synthèse de p21 dans des cellules tumorales inhibe leur croissance et peut entraîner la régression de

tumeurs préexistantes [9]. Cependant, contrairement à l'inhibiteur p16^{INK4A} (*m/s n° 2, vol. 12, p. 222*), p21 est rarement mutée dans les cancers humains et ne semble donc pas être un suppresseur de tumeurs. L'analyse de souris délétées du gène *p21* a confirmé cette observation, puisqu'elle a révélé que ces animaux se développaient normalement et ne présentaient pas une incidence particulière de tumeurs [10]. En revanche, la situation est tout autre dans le cas des souris délétées du gène codant pour p27^{KIP1}, l'inactivation de cet autre inhibiteur entraînant une prolifération cellulaire anormale de tous les organes (*m/s n° 6/7, vol. 12, p. 744*), qui se traduit par une augmentation importante de la taille des souris p27^{-/-} (*m/s n° 11, vol. 12, p. 1272*) [5]. Le fait que les souris p21^{-/-} aient un développement normal, au niveau anatomique et histologique, suggère fortement que si p21 a un rôle important au cours de la différenciation, celui-ci devrait être redondant.

La synthèse de p21 dépend, en partie, de la fonction du suppresseur de tumeur p53. En effet, d'une part, le gène *p21* a été initialement identifié comme l'un des gènes cibles de p53 [11] et contient deux éléments de réponse à p53 et, d'autre part, p21 n'est que faiblement synthétisée dans des fibroblastes murins p53^{-/-} [11]. Lorsque des fibroblastes humains non transformés sont exposés à des agents physiques provoquant des lésions de l'ADN (irradiation γ , rayonnement UV), la synthèse de p53 est augmentée, ce qui entraîne une très forte induction du gène *p21* [12]. Une dépendance similaire vis-à-vis de p53 a été montrée lors de l'induction de *p21* par d'autres agents radiomimétiques comme la bléomycine. Dans ces deux cas, les cellules stoppent leur cycle cellulaire en phase G1 en réponse aux dommages de l'ADN. En revanche, les fibroblastes d'embryon de souris p21^{-/-} sont incapables d'arrêter leur cycle cellulaire en phase G1 après irradiation [10, 13], ou après une exposition au PALA (N-(phosphonacétyl)-L-aspartate), un inhibiteur de la synthèse de l'uridine [10]. Il apparaît donc clairement que la synthèse de la protéine p21 est nécessaire pour l'arrêt du cycle cellulaire en

Tableau I		
MÉCANISMES D'INDUCTION DE P21 EN RÉPONSE À DE MULTIPLES VOIES DE SIGNALISATION		
Inducteur	Médiateur	Élément de réponse dans le promoteur de p21 ^{Cip1}
Lésions de l'ADN		
- irradiation rayons γ	IRF1 + p53	IRFE (- 2255; - 2237; - 1817) + p53RE
- irradiation U.V.	p53	p53RE (- 75; - 2400)
- médicaments anticancéreux (doxorubicine, étoposide...)	autres médiateurs	indépendants de p53
	p53	p53RE ?
	autres médiateurs	indépendant de p53
Modulateurs de p53		
- transactivateur Zta du virus d'Epstein-Barr	p53	p53RE ?
- tyrosine kinase c-Abl	p53	p53RE ?
Cytokines, facteurs de croissance		
- TGF- β	SP1, SP3	TGF β RE (- 74)
- IFN- γ	STAT1	p21-SIE1 (- 640)
		p21-SIE2 (- 2540)
		p21-SIE3 (- 4183)
Différenciation		
- des cellules musculaires	MyoD	indépendant de p53
- des cellules hématopoïétiques (induite par la vitamine D3)	VDR	VDRE (- 770)
- des cellules neuronales (induite par le NGF)	p300	indépendant de p53
Sénescence		
	?	?

IRF1, interferon regulatory factor 1; IRFE, IRF-1 element; p53RE, p53 responsive element; TGF- β RE, TGF- β responsive element; STAT1, signal transducer and activator of transcription 1; p21-SIE, p21-cis-inducible element; VDR, vitamin D3 receptor, VDRE, VDR responsive element, NGF, nerve growth factor.

phase G1 induit par p53 en réponse à des dommages sur l'ADN. Cependant, dans certains types cellulaires, l'induction de *p21* peut être indépendante de p53 et jouer également un rôle très important dans l'arrêt du cycle en réponse aux lésions de l'ADN provoquées par les agents antitumoraux ou les rayonnements UV. Ainsi, la méthyl-méthane-sulfonate, l'étoposide ou l'hydroxyurée peuvent augmenter la synthèse de p21 dans des cellules dépourvues de protéine p53 fonctionnelle. D'autres études ont confirmé que la synthèse de p21 dans de nombreux tissus et types cellulaires est souvent indépendante de p53. Ces situations sont résumées dans le *Tableau I*. Par exemple, la synthèse de la protéine p21 est induite par le facteur de transcription MyoD [14] au cours de la différenciation terminale des cellules musculaires,

par le facteur de transcription STAT1 en réponse à l'interféron γ [15], par le récepteur nucléaire VDR (récepteur de la vitamine D3) après le traitement de cellules leucémiques par la vitamine D3 [16] et par des facteurs de transcription de la famille Sp1 en réponse au TGF- β [17]. La protéine p21 semble donc être un élément-clé du mécanisme d'inhibition des complexes cyclines/Cdk conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à de multiples voies de transmission du signal.

Modalités moléculaires de l'interaction entre la protéine p21 et le PCNA

La protéine p21 s'associe au PCNA par l'intermédiaire d'un domaine carboxy-terminal indépendant de

Tableau II			
EFFETS DE P21 SUR L'INTERACTION DU PCNA AVEC SES AUTRES PARTENAIRES			
Partenaires du PCNA	Fonction	Effet de p21 sur l'interaction	Conséquences fonctionnelles
RF-C	Assemblage des complexes PCNA/polymérase δ sur l'ADN	Pas d'effet inhibiteur	Association du PCNA avec l'ADN non affectée
ADN polymérase δ	Synthèse de l'ADN au cours de la réplication et la réparation de l'ADN	Inhibiteur	Inhibition de la réplication et de la réparation des mésappariements; effet moindre sur la réparation par excision de nucléotides
Fen-1	Exonucléase requise pour la réplication et la réparation des mésappariements	Inhibiteur	Inhibition de la réplication et de la réparation des mésappariements
Gadd45	Induit par p53 en réponse à des lésions de l'ADN; rôle dans l'inhibition de la prolifération	Inhibiteur	?
Myd118	Rôle dans l'inhibition de la prolifération	Inhibiteur	?
MLH1 MSH2	Facteurs essentiels pour la réparation des mésappariements	?	Rôle dans l'inhibition par p21 de la réparation des mésappariements?
Cycline D	Sous-unité régulatrice des CDK de la phase G1	Pas d'effet inhibiteur	Stabilisation par p21 de l'interaction du PCNA avec les complexes cycline/CDK

ceux impliqués dans sa liaison aux cyclines et aux Cdk (*figure 1B*) [7, 18, 19]. L'étude de mutants ponctuels, ou l'utilisation de peptides de synthèse reproduisant la séquence de p21 et dont les résidus ont été remplacés un à un par des résidus alanine, a permis de définir avec précision un motif de liaison au PCNA [18, 19]. Ce motif, situé entre les acides aminés 144 et 151, comprend deux résidus essentiels, la méthionine 147 et la phénylalanine 150, dont la double substitution abolit totalement l'interaction avec le PCNA [19]. La détermination, par cristallographie aux rayons X, de la structure tridimensionnelle du complexe formé par le PCNA humain et

un peptide carboxy-terminal de p21 incluant ce motif de liaison, a récemment révélé que ces deux résidus interagissent avec une région hydrophobe située dans la partie centrale du PCNA, au niveau d'une boucle reliant deux domaines topologiquement indépendants [19, 20]. La partie carboxy-terminale du peptide forme avec cette boucle du PCNA, un feuillet β antiparallèle stabilisé par des interactions électrostatiques. Dans ce modèle structural, le PCNA conserve sa forme trimérique, ce qui suggère que la liaison de p21 ne déstabiliserait pas cette structure trimérique. La protéine p21 exerce donc probablement son effet inhibiteur en bloquant, sur le PCNA, les

sites d'interaction avec d'autres partenaires (*Tableau II*). En outre, ces résultats sont en accord avec notre observation selon laquelle la structure trimérique du PCNA est essentielle pour son interaction avec p21 [21]. En effet, le remplacement de la tyrosine 114 du PCNA par une alanine, mutation qui altère la capacité de trimérisation du PCNA, abolit complètement l'interaction avec p21. Nous avons également observé que l'affinité de la liaison entre le PCNA et la partie carboxy-terminale de p21 est inférieure d'un facteur dix à celle mesurée avec la protéine p21 entière [21]. La détermination de la structure tridimensionnelle du complexe entre le PCNA et la protéine p21 entière devrait donc être très informative.

La protéine p21 et la réplication de l'ADN

In vitro, dans des systèmes reconstitués avec des protéines purifiées, p21 inhibe la réplication de l'ADN du virus SV40, ou l'élongation d'une amorce poly(T) par l'ADN polymérase δ à partir d'une matrice poly(A) [22, 23]. Cette inhibition dépend de l'interaction directe de p21 avec le PCNA mais elle est indépendante de sa liaison aux complexes cyclines/CDK [22, 24]. Le mode d'action exact de p21 est encore hypothétique, mais il pourrait concerner, soit le chargement de l'ADN polymérase δ sur l'ADN, soit la progression de la polymérase le long de l'ADN. En accord avec cette seconde hypothèse, la réplication de longs fragments semble plus sensible à l'inhibition par p21 que la synthèse de courts oligonucléotides [23, 25]. En revanche, l'inhibition de l'association du PCNA avec l'ADN, relayée par le complexe RF-C (*replication factor-C*), ne semble pas jouer de rôle dans l'inhibition de la réplication [23, 24]. Récemment, il a été montré que p21 empêchait le recrutement de l'exonucléase Fen1 par le PCNA au niveau des fourches de réplication [26]. La protéine Fen1 est une exonucléase 5'-3' qui dégrade les jonctions ARN-ADN dans les fragments d'Okazaki* et dont l'activité

* Amorce ribonucléique indispensable pour démarrer la réplication d'ADN.

est essentielle pour la réplication. La dissociation des complexes Fen1/PCNA par p21 pourrait également jouer un rôle important dans l'inhibition de la réplication par p21.

Les effets de p21 ont aussi été étudiés lors de la réplication d'ADN chromosomique en présence d'extraits d'œufs de xénope [27]. Dans ce cas, p21 inhibe une étape précoce de la réplication plutôt que l'élongation des fourches de réplication. Cette inhibition peut être levée par un excès de cyclines E ou A, mais pas par ajout de PCNA [27]. Des travaux ultérieurs ont confirmé que, dans ce système expérimental, la réplication est plus sensible à l'inhibition des complexes cyclines/CDK qu'à l'inhibition par interaction directe avec le PCNA.

En résumé, p21 pourrait donc inhiber deux étapes de la réplication. La première étape dépendrait des complexes cycline E/Cdk2 et cycline A/Cdk4, et concernerait la formation des foyers de réplication. Il pourrait s'agir du déroulement des origines de réplication ou de l'association de la protéine RF-A (*replication factor-A*) aux fourches de réplication après ce déroulement. La deuxième étape, dépendante du PCNA, correspondrait au passage de la synthèse des amorces de réplication par l'ADN polymérase α à l'élongation des deux brins par l'ADN polymérase δ .

Rôle de l'interaction p21/PCNA dans le cycle cellulaire

La question est encore controversée, mais il semble bien que l'inhibition de la réplication dépendante du PCNA joue un rôle dans l'inhibition de la prolifération cellulaire par la protéine p21. En effet, dans certains types cellulaires, la liaison de p21 au PCNA est suffisante pour inhiber la progression du cycle cellulaire, en l'absence de liaison aux cyclines/Cdk [7]. La protéine p21 pourrait donc inhiber la prolifération cellulaire par deux mécanismes indépendants : d'une part, la liaison aux complexes cyclines/CDK et, d'autre part, la liaison au PCNA. L'arrêt du cycle cellulaire par l'un et/ou l'autre de ces deux mécanismes pourrait dépendre de l'abondance relative du PCNA et des complexes cyclines/CDK, deux

paramètres variant en fonction des types cellulaires.

Des complexes quaternaires qui associent la protéine p21, le PCNA, une cycline et une Cdk ont été mis en évidence dans les fibroblastes humains non transformés [28]. Cette association du PCNA à différents complexes cyclines/CDK pendant les phases G1 et G2 du cycle cellulaire, suggère que le PCNA pourrait avoir une fonction dans le cycle cellulaire, indépendante de sa fonction au cours de la synthèse de l'ADN. On peut imaginer que, pendant les phases G1 et G2, le PCNA permet le recrutement des complexes cyclines/CDK dans différentes régions subnucléaires, tout comme pendant la phase S où il a été observé que le PCNA était associé et co-localisé avec les complexes cycline A/Cdk2 au niveau des foyers de réplication.

De façon surprenante, la synthèse de la protéine p21 humaine par la levure modèle *Schizosaccharomyces pombe* inhibe la progression de son cycle cellulaire à la transition G2/M [29]. Cette inhibition dépend de la liaison de p21 au PCNA, mais est indépendante de sa liaison à la protéine-kinase Cdc2. Il semble que la liaison de p21 au PCNA active l'une des voies de transmission du signal qui bloquent la progression du cycle cellulaire en réponse à des lésions de l'ADN. Un tel mécanisme pourrait être conservé chez l'homme car nous avons récemment montré que, dans une lignée tumorale de cancer du côlon, la liaison de p21 au PCNA provoque un arrêt du cycle cellulaire dans les phases G1 et G2, mimant ainsi l'effet des agents endommageant l'ADN [30].

Interaction p21/PCNA et réparation de l'ADN

Lorsque l'ADN est endommagé par des rayonnements UV ou des agents génotoxiques, il est réparé par excision de nucléotides, mécanisme dépendant du PCNA [3]. La protéine p21 est capable d'inhiber la fonction du PCNA lors de la réplication de l'ADN, mais il semble bien qu'elle n'ait pas d'effet inhibiteur sur la réparation par excision de nucléotides. Par exemple, lorsque des fibroblastes humains sont exposés à des rayonnements UV, la majorité des

noyaux présentent une activité de réparation, et une forte synthèse du PCNA et de p21 [31]. En revanche, contrairement au PCNA, p21 n'est pas détectée dans les noyaux au moment de la réplication, suggérant que des niveaux élevés de p21 seraient compatibles avec la réparation par excision de nucléotides mais incompatibles avec la réplication. Tout comme le PCNA, la protéine p21 apparaît plus fortement liée aux structures nucléaires dans les cellules irradiées. En outre, dans certaines cellules qui sont déficientes pour la réparation par excision de nucléotides, la répartition de p21 dans le noyau est modifiée, comme l'est celle du PCNA [31]. Ces résultats suggèrent que le PCNA ciblerait p21 sur les sites de réparation où sa présence pourrait être nécessaire, au moins temporairement, pour permettre le recrutement de complexes cyclines/CDK sur les sites de réparation de l'ADN. En accord avec cette hypothèse, un défaut de réparation a récemment été mis en évidence dans les cellules *p21^{-/-}* [32]. Ces observations ont pu être confirmées *in vitro* par l'étude, en présence d'extraits cellulaires, de la réparation d'ADN plasmidique traité par des agents endommageant l'ADN. Ces essais ont permis de montrer que p21, aux doses requises pour inhiber la réplication, n'inhibait pas la réparation par excision de nucléotides [25]. L'ensemble des résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* indiquent, qu'en présence de lésions de l'ADN, l'induction de p21 pourrait permettre de ralentir la progression du cycle cellulaire (*via* l'inhibition des complexes cyclines/CDK et de la réplication dépendante du PCNA) afin de laisser le temps aux cellules de réparer l'ADN endommagé (*figure 2*). Les petites protéines nucléaires Gadd45 et MyD118, qui interagissent elles aussi avec le PCNA, pourraient jouer un rôle similaire car elles ont un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire et un effet positif sur la réparation (*m/s n° 3, vol. 11, p. 491*). On a été surpris d'observer que ces deux protéines interagissent aussi avec p21 et entrent en compétition avec cette dernière pour la liaison au PCNA. Il sera donc important dans le futur de mieux préciser le rôle de ces interactions entre p21, PCNA, Gadd45 et

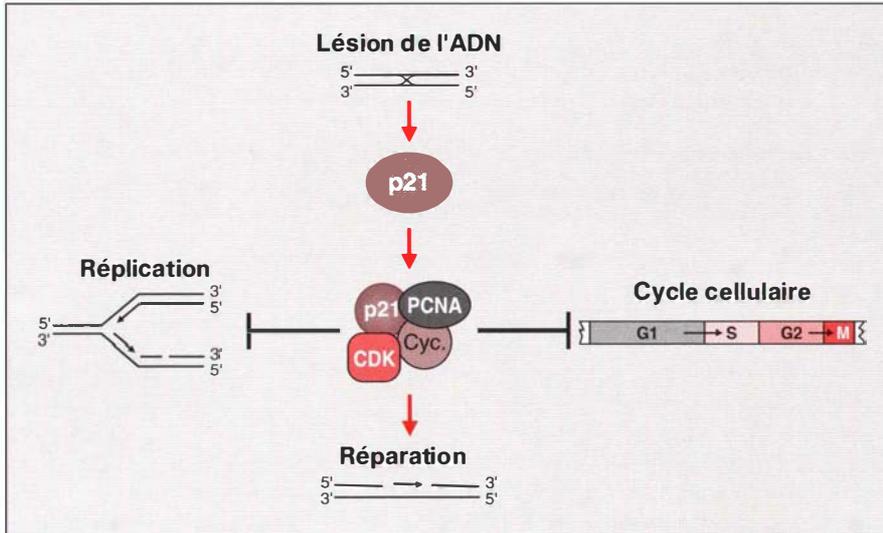


Figure 2. **Rôle de la protéine p21 dans la réponse cellulaire aux lésions de l'ADN.** L'induction de p21 en réponse à des lésions de l'ADN, provoquées par différents agents (irradiation γ , rayonnements UV, agents antitumoraux), permet de ralentir la progression du cycle cellulaire afin de laisser le temps aux cellules de réparer leur ADN endommagé. Cette inhibition de la progression du cycle cellulaire par p21 est relayée par deux mécanismes indépendants : l'inhibition de l'activité enzymatique des complexes cyclines/CDK et l'inhibition de la réplication dépendante du PCNA.

MyD118, dans la réparation et le cycle cellulaire.

On a récemment montré que le PCNA est aussi requis pour la réparation de l'ADN par correction des mésappariements, processus très important pour assurer la fidélité de la réplication [33]. En effet, chez la levure, une mutation ponctuelle du PCNA entraîne une instabilité des séquences répétées du type poly GT. Par ailleurs, *in vitro*, l'ajout à des extraits cellulaires humains de p21 ou d'un peptide contenant le motif de liaison de p21 au PCNA inhibe la fonction du PCNA dans la réparation des mésappariements. La protéine p21 pourrait interférer avec la liaison du PCNA aux protéines MLH1 et MSH2, deux facteurs jouant un rôle essentiel dans les premières étapes du mécanisme de correction des mésappariements. Il est également possible que p21 empêche l'excision de nucléotides au niveau des mésappariements en bloquant l'interaction entre le PCNA et l'exonucléase Fen1, dont l'activité est requise pour la réparation des mésappariements. La capacité de p21 de dissocier les complexes PCNA/Fen1 [26] pourrait expliquer, en partie, l'inhibition préférentielle de la réplication et de la réparation

des mésappariements par p21 car le recrutement de Fen1 par le PCNA semble essentiel pour ces deux processus mais n'est pas requis pour la réparation par excision de nucléotides, peu sensible à l'inhibition par p21.

Conclusion

L'interaction entre la protéine p21 et le PCNA semble jouer un rôle-clé dans la réplication et la réparation de l'ADN ainsi que dans le cycle cellulaire. La capacité de p21 de dissocier les complexes PCNA/ADN polymérase δ et PCNA/Fen1 se traduit par l'inhibition de deux processus, la réplication et la réparation des mésappariements, au cours desquels ces complexes PCNA/ADN polymérase δ et PCNA/Fen1 jouent un rôle très important. En outre, p21 pourrait aussi inhiber la réparation des mésappariements en empêchant l'interaction entre le PCNA et les protéines de réparation MLH1 et MSH2. En revanche, la liaison de p21 au PCNA n'inhibe pas un autre système majeur de réparation, l'excision de nucléotides. Il sera important, à l'avenir, de préciser les conséquences fonctionnelles de la

dissociation par p21 des complexes formés entre le PCNA et les protéines Gadd45 et MyD118, deux facteurs exerçant un effet positif sur la réparation par excision de nucléotides. Le rôle des complexes quaternaires qui associent la protéine p21, le PCNA, une cycline et une Cdk, dans le contrôle de la prolifération et, en particulier, dans la coordination des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire avec ceux de la machinerie de réparation et de réplication, semble être essentiel. L'absence de tels complexes dans des lignées tumorales souligne bien l'importance que revêt leur caractérisation moléculaire précise, l'étude de leur régulation et le déchiffrement de leur fonction. Ce ne sont, bien entendu, que quelques-unes des multiples questions qui doivent maintenant être abordées ■

Remerciements

Les auteurs remercient la Ligue Nationale Contre le Cancer, les comités de la Haute-Garonne et de la Dordogne de Ligue Contre le Cancer, l'Association pour la Recherche contre le Cancer, l'Inserm, le Cnrs et l'université Paul-Sabatier pour leurs soutiens financiers à leur programme de recherche.

RÉFÉRENCES

1. Wolowiec D, Ffrench M. Kinases dépendantes des cyclines : rôle biologique et implications dans la pathologie humaine. *Med Sci* 1996; 12 : 165-73.
2. Darbon J, Fesquet D, Cavadore J. De nouveaux régulateurs du cycle cellulaire : les protéines modulatrices des complexes Cdk-cyclines. *Med Sci* 1995; 11 : 349-56.
3. Shiviji MKK, Kenny MK, Wood RD. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair synthesis. *Cell* 1992; 69 : 367-74.
4. Russo AA, Jeffrey PD, Patten AK, Massagué J, Pavletich NP. Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclinA-Cdk2 complex. *Nature* 1996; 382 : 325-30.
5. Elledge SJ, Winston J, Harper W. A question of balance: the role of cyclin-kinase inhibitors in development and tumorigenesis. *Trends Cell Biol* 1996; 6 : 388-92.
6. Sherr CJ, Roberts JR. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995b; 9 : 1149-63.
7. Luo Y, Hurwitz J, Massagué J. Cell-cycle inhibition by independent Cdk and PCNA binding domains in p21. *Nature* 1995; 375 : 159-61.

RÉFÉRENCES

8. Fotedar R, Fitzgerald P, Rousselle T, Cannella D, Dorée M, Messier H, Fotedar A. p21 contains independent binding sites for cyclin and cdk2: both sites are required to inhibit cdk2 kinase activity. *Oncogene* 1996; 12 : 2155-64.
9. Yang ZY, Perkins ND, Ohno T, Nabel EG, Nabel GJ. The p21 cyclin-dependent kinase inhibitor suppresses tumorigenicity *in vivo*. *Nature Med* 1995; 1 : 1052-6.
10. Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. Mice lacking p21Cip1/Waf1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 1995; 82 : 675-84.
11. El-Deiry W, Tokino T, Velculescu V, Levy D, Parsons R, Trent J, Lin D, Mercer W, Kinzler K, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75 : 817-25.
12. Dulic V, Kaufmann W, Wilson S, Tlsty T, Lees E, Wade Harper J, Elledge S, Reed S. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 1994; 76 : 1013-23.
13. Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 1995; 377 : 552-7.
14. Halevy O, Novitch BG, Spicer DB, Skapek SX, Rhee J, Hannon GJ, Beach D, Lassar AB. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 1995; 267 : 1018-21.
15. Chin YE, Kitagawa M, Su WCE, You ZH, Iwamoto Y, Fu XY. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21Cip1 mediated by stat1. *Science* 1996; 272 : 719-21.
16. Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev* 1996; 10 : 142-53.
17. Datto MB, Yu Y, Wang XF. Functional analysis of the transforming growth factor β responsive element in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J Biol Chem* 1995; 270 : 28623-8.
18. Goubin F, Ducommun B. Identification of binding domains on the p21Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor. *Oncogene* 1995; 10 : 2281-7.
19. Warbrick E, Lane DP, Glover DM, Cox LS. A small peptide inhibitor of DNA replication defines the site of interaction between the cyclin-dependent kinase inhibitor p21Waf1 and proliferating cell nuclear antigen. *Curr Biol* 1995; 5 : 275-82.
20. Gulbis JM, Kelman Z, Hurwitz J, O'Donnell M, Kuriyan J. Structure of the C-terminal region of p21Cip1/Waf1 complexed with human PCNA. *Cell* 1996; 87 : 297-306.
21. Knibiehler M, Goubin F, Escalas N, Jonsson ZO, Mazarguil H, Hubscher U, Ducommun B. Interaction studies between the p21Cip1/Waf1 cyclin-dependent kinase inhibitor and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) by surface plasmon resonance. *FEBS Lett* 1996; 391 : 66-70.
22. Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994; 369 : 574-8.
23. Flores-Rozas H, Kelman Z, Dean F, Pan ZQ, Wade Harper J, Elledge S, O'Donnell M, Hurwitz J. Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91 : 8655-9.
24. Podust VN, Podust LM, Goubin F, Ducommun B, Hubscher U. Mechanism of inhibition of PCNA dependent DNA synthesis by the p21 cdk-interacting protein 1. *Biochemistry* 1995; 34 : 8869-75.
25. Li R, Waga S, Hannon G, Beach D, Stillman B. Differential effects by the p21 Cdk inhibitor on PCNA dependent DNA replication and repair. *Nature* 1994; 371 : 539-42.
26. Chen J, Chen S, Dutta A. p21^{cip1/waf1} disrupts the recruitment of human fen 1 by proliferating - cell nuclear antigen into the DNA replication complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93 : 11597-602.
27. Strausfeld UP, Howell M, Rempel R, Maller JL, Hunt T, Blow JJ. Cip1 blocks the initiation of DNA replication in *Xenopus* extracts by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Curr Biol* 1994; 4 : 876-83.
28. Xiong Y, Zhang H, Beach D. D-type cyclin associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 1992; 71 : 505-14.
29. Tournier S, Leroy D, Goubin F, Ducommun B, Hyams JS. Heterologous expression of the human cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{cip1} in fission yeast reveals a role for PCNA in chk1⁺ cell cycle checkpoint pathway. *Mol Biol Cell* 1996; 7 : 651-62.
30. Cayrol C, Knibiehler M, Ducommun B. p21 binding to PCNA causes G₁ and G₂ cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene* 1997 (sous presse).
31. Li R, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. Subcellular distribution of p21 and PCNA in normal and repair deficient cells following DNA damage. *Curr Biol* 1996; 6 : 189-99.
32. McDonald ER, Wu GS, Waldman T, El-Deiry W. Repair defect in p21^{Cip1}^{-/-} human cancer cells. *Cancer Res* 1996; 56 : 2250-5.
33. Umar A, Buermeier AB, Simon JA, Thomas DC, Clark AB, Liskay RM, Kunkel TA. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at step preceding DNA resynthesis. *Cell* 1996; 87 : 65-73.

TIRÉS À PART

B. Ducommun.

Summary

Interaction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 with PCNA : a link between cell cycle and DNA repair

The cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors, or CKIs, play an essential role in the control of cell proliferation. CKIs regulate G1/S progression through the modulation of cyclin/CDK complexes activity in response to various intracellular or extracellular signals. p21^{Cip1}, the first CKI identified, plays a key role in growth arrest induced by the tumor suppressor p53 in response to DNA damage. A unique feature of p21 that distinguishes it from other CKIs is its ability to associate with the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), an auxiliary factor for DNA polymerases δ and ϵ , that is essential for both DNA replication and DNA repair. The association, in non-transformed human cells of p21 with PCNA and various cyclin/CDKs in p21/PCNA/cyclin/CDK quaternary complexes provides an important link between the cell cycle, DNA replication and DNA repair. p21 contains a C-terminal PCNA binding motif that interacts with the interdomain connector loop of PCNA and inhibits PCNA-dependent DNA replication and mismatch repair *in vitro*. This C-terminal domain might inhibit cell cycle progression independently of the N-terminal CDK inhibitory domain and thus contribute to the antiproliferative activity of p21. In contrast to its inhibitory effect on DNA replication and mismatch repair, p21 does not appear to block PCNA-dependent nucleotide excision repair. Therefore, p21 induction after DNA damage may lead to inhibition of cell cycle progression and inactivation of PCNA-dependent DNA replication, while permitting active nucleotide excision repair. Such a mechanism would ensure that any errors caused by the damage are corrected before being propagated by DNA replication.