

MDM2 s'émancipe de la p53

Pour celles et ceux qui s'intéressent aux oncogènes et aux anti-oncogènes, le terme MDM2 évoque aujourd'hui immédiatement celui de p53 tant sont nombreuses les publications démontrant les interactions entre ces deux molécules et l'importance de leurs effets sur le devenir de la cellule. En marge de ces travaux, cependant, d'autres observations tendent à indiquer que le rôle de MDM2 pourrait ne pas se limiter à celui de « grand régulateur » de l'activité de la protéine p53. Plusieurs articles ayant été consacrés récemment à l'association entre p53 et MDM2 (*m/s* 1998, n° 5, p. 656) [1-3] nous ne rappellerons que brièvement les faits en ce domaine, avant d'exposer plus en détail les différents arguments permettant de penser qu'il existe une vie pour MDM2 en dehors de la p53.

MDM2 en bref

Le proto-oncogène *mdm2* a été découvert dans une lignée cellulaire murine spontanément transformée (3T3DM) qui contenait une amplification de ce gène dans des fragments d'ADN « double-minutes » (minichromosome en surnombre) [4, 5]. Deux types de résultats ont, par la suite, permis de classer MDM2 parmi les oncoprotéines: 1) l'augmentation du potentiel tumorigène de cellules murines présentant une expression élevée du gène *mdm2* [6]; 2) l'observation que différents types de tumeurs humaines présentent un gène *mdm2* amplifié aboutissant à une surexpression de la protéine. A cet égard, un récent travail de compilation de données a montré que ce sont les tumeurs des tissus mous et les ostéosarcomes qui présentent les plus forts taux d'amplification du gène *mdm2* (20% et 16% de ces tumeurs respectivement) alors que les leucé-

mies et lymphomes ne présentent pas d'amplification [7]. D'autres mécanismes, cependant, peuvent aussi aboutir à une accumulation de la protéine MDM2 dans des cellules tumorales humaines. Ainsi, une surexpression des ARN et de la protéine a été observée dans diverses leucémies, en absence d'amplification du gène [8] et une augmentation spécifique du niveau de traduction du messager *mdm2* a été décrite dans plusieurs types de tumeurs [9, 10].

Le gène humain *MDM2* (appelé également « hDM2 »), localisé sur le chromosome 12 (région 12q14-q15) [11], code pour une protéine nucléaire ayant une masse de 90/95 kDa ainsi que, dans certaines cellules, pour des isoformes mineures de 85, 76, 74 et 58 kDa [12]. La protéine de 90 kDa se compose de plusieurs régions conservées phylogénétiquement (*figure 1*): un domaine amino-terminal essentiel pour la liaison à la p53; un domaine

contenant un site de localisation nucléaire (SLN); une région acide (caractéristique de certains facteurs transactivateurs); une région à doigts de zinc et enfin un domaine carboxy-terminal contenant des doigts de zinc de type *RING-finger*.

Le couple p53/MDM2, un élément majeur de la transformation maligne

La p53 est le produit de l'un des gènes appelés « suppresseurs de tumeurs »; elle est capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire et/ou la mort des cellules par apoptose lorsque celles-ci sont soumises à divers types de *stress*, notamment des *stress* génotoxiques (*m/s* 1998, n° 8-9, p. 973) [13]. C'est par son activité transcriptionnelle, localisée dans sa partie amino-terminale, que la p53 exerce la majorité de ses effets. MDM2 se lie à cette partie amino-terminale (résidus 17-27), et la forma-

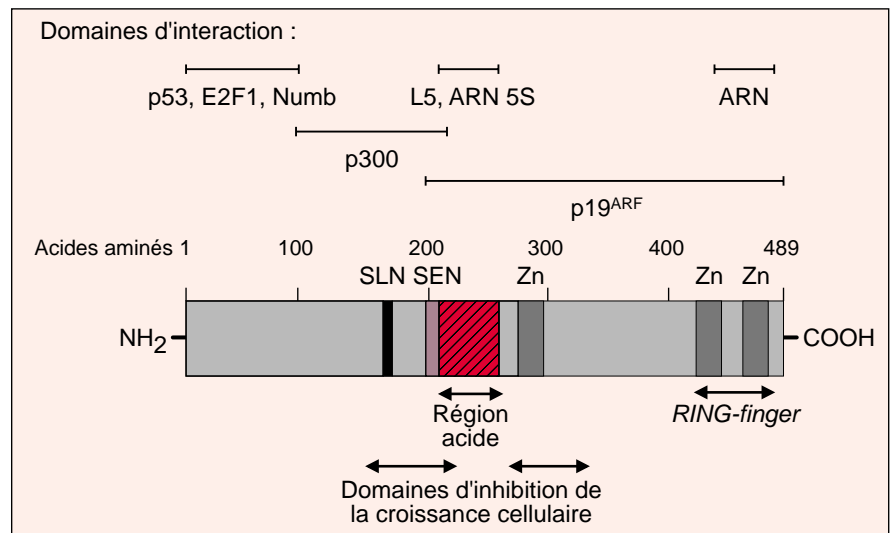


Figure 1. **Structure de la protéine MDM2 et indication des domaines d'interaction avec différentes molécules (protéines ou ARN).** SLN: signal de localisation nucléaire; SEN: séquence d'export nucléaire.

tion du complexe p53/MDM2 a pour conséquence d'inhiber la fonction transactivatrice de la p53. En outre, il a été montré que l'association entre ces deux protéines induit une dégradation accélérée de la p53. Des résultats récents indiquent que cette dégradation, qui fait intervenir le système ubiquitine-protéasome, pourrait être due à une activité ubiquitine ligase de MDM2 et nécessiterait la présence dans le complexe p53/MDM2 du co-activateur de la transcription p300 [14]. Très récemment, il a été montré que MDM2 pouvait se lier à l'un des produits du gène suppresseur de tumeurs *Ink4a* (appelé p19^{Arf} chez la souris et p14^{Arf} chez l'humain) ce qui entraînait sa neutralisation (par un mécanisme qui n'est pas encore clairement établi) et aboutissait, de fait, à la restauration de la fonction transactivatrice de la p53.

Si MDM2 contrôle le niveau et l'activité de la protéine p53, on sait aussi aujourd'hui, qu'en retour, la p53 contrôle MDM2 au niveau transcriptionnel. En effet, le gène *mdm2* possédant un site de fixation pour la p53 dans son premier intron, sa transcription peut être spécifiquement activée par cette molécule [15]. Une boucle de rétrocontrôle existe donc entre la p53 et MDM2 qui permet à la p53 de moduler son propre niveau d'expression ainsi que son activité en induisant l'expression de son régulateur négatif MDM2. La rupture de cet équilibre vers une accumulation de MDM2, par quelque mécanisme que ce soit, entraîne donc une incapacité de la p53 à contrôler le cycle cellulaire et/ou l'apoptose et favorise, de la sorte, la transformation maligne des cellules. L'utilisation de souris dont le gène *mdm2* a été invalidé (*knock out*) a, par ailleurs, permis de montrer l'importance de la régulation de l'activité de la p53 par MDM2 au cours du développement. En effet, les souris *mdm2*^{-/-} meurent à des stades embryonnaires précoces alors que la même invalidation génique n'entrave pas le développement embryonnaire de souris déjà déficientes en p53.

Outre cette activité régulatrice de la p53, il apparaît aujourd'hui que MDM2 possède des fonctions supplémentaires pouvant, ou non, mettre

en jeu des interactions avec d'autres molécules. En fait, MDM2 intervient surtout dans trois domaines que nous détaillons ci-dessous.

Les fonctions de MDM2 indépendantes de la p53

• MDM2, un oncogène autonome ?

Plusieurs publications ont montré, plus ou moins directement, que MDM2 pouvait participer au contrôle de la croissance cellulaire de manière indépendante de la p53. Il a ainsi été observé que des transcrits alternatifs et des isoformes de la protéine ne contenant pas le domaine de liaison à la p53 étaient exprimés dans des cellules humaines ou murines, ce qui, en soi, suggère que MDM2 peut fonctionner indépendamment de la p53. Il a été montré, en outre, que certains de ces transcrits (présents dans des tumeurs de l'ovaire et de la vessie mais pas dans des cellules normales), étaient capables de transformer des cellules NIH 3T3 [16]. Cependant, il a aussi été observé que la transfection, dans ces mêmes cellules NIH 3T3 ou dans des fibroblastes embryonnaires de souris, de l'ADNc *mdm2* humain ainsi que de différents mutants de délétion (incluant des mutants sans la partie amino-terminale de liaison à la p53), induisait un arrêt des cellules en G0/G1. Dans ce cas, c'est seulement l'élimination de deux domaines (situés dans la région centrale de la molécule) responsables de cet arrêt de croissance qui rend la protéine tumorigénique [17]. Il faut souligner que les résultats apparemment contradictoires de ces deux publications sont obtenus par des techniques très différentes et sont donc assez difficilement comparables; il faut noter, par ailleurs, que les transcrits alternatifs observés dans les tumeurs présentent de grandes délétions qui incluent non seulement le domaine de liaison à la p53 mais aussi l'un des deux domaines d'inhibition de la croissance. Des expériences supplémentaires sont donc nécessaires pour définir précisément le mécanisme par lequel MDM2 peut transformer des cellules.

Plus impressionnantes, peut-être, sont les études effectuées sur des sou-

ris transgéniques. La première de ces études a montré que la surexpression ciblée de la protéine murine MDM2 dans les glandes mammaires induisait, chez des souris *p53*^{+/+} ou *p53*^{-/-}, un développement anormal de ces glandes durant la gestation – de nombreuses cellules épithéliales effectuant plusieurs phases S non suivies de mitose – et que 16% de ces souris développaient des tumeurs mammaires [18]. Dans la seconde étude, des cellules ES, surexprimant le gène murin *mdm2* sous le contrôle de son propre promoteur, ont été utilisées pour fabriquer les souris transgéniques. Il a alors été observé que, bien que la surexpression des transcrits *mdm2* dans plusieurs organes soit modeste (4 fois), toutes les souris développent des tumeurs (assez tardivement toutefois). Ces souris transgéniques *mdm2* ont ensuite été croisées avec des souris *p53*^{-/-}; il a alors été constaté que les souris surexprimant *mdm2* dans un fonds génétique *p53*^{-/-} développent très rapidement des tumeurs, comme les souris *p53*^{-/-}, mais – fait notable – avec une incidence beaucoup plus importante de sarcomes [19]. Cette observation est évidemment à rapprocher du taux élevé de sarcomes présentant des amplifications du gène *mdm2* chez l'humain; elle renforce l'idée que la fonction oncogénique propre de MDM2 s'exerce préférentiellement dans les cellules mésenchymateuses. Elle explique, en outre, le relativement faible taux de carcinomes mammaires observés dans l'étude précédente.

Il nous semble également important d'aborder dans ce chapitre, le rôle de MDM2 dans le processus d'apoptose. En effet, on considère depuis quelques années que l'émergence de clones cellulaires malins est le résultat d'une série d'événements parmi lesquels l'échappement des cellules à leur mort cellulaire programmée joue un rôle important. En ce qui concerne MDM2, c'est sa capacité de bloquer l'apoptose induite par la p53 qui lui conférerait, au moins en partie, son potentiel oncogénique. Durant le processus d'apoptose, l'un des événements majeurs est l'activation de protéases spécifiques, appelées caspases, qui sont capables de

cliver un certain nombre de substrats parmi lesquels figure MDM2 [20, 21]. Dans le cas de l'apoptose dépendante de p53, on aurait pu penser que la dégradation de MDM2 permettrait alors à la p53 d'exercer sans contrainte ses activités transcriptionnelles. Or il s'avère que le clivage de MDM2 ne modifie pas sa capacité de se fixer et d'inhiber l'activité de la p53 et que, par ailleurs, le même clivage est observé au cours de l'apoptose de cellules ne contenant pas de p53. Ces résultats suggèrent donc que l'activité anti-apoptotique de MDM2 pourrait s'exercer, au moins partiellement, de manière indépendante de la p53: soit le clivage de la molécule détruit une activité anti-apoptotique propre à MDM2, soit il engendre un fragment ayant une activité pro-apoptotique, soit encore, il crée un fragment ayant perdu la capacité d'inhiber l'activité d'une molécule pro-apoptotique autre que la p53.

• *MDM2 et ses autres partenaires dans le contrôle de la croissance cellulaire*
L'interaction directe de la protéine MDM2 avec d'autres molécules que la p53 a aussi été démontrée. Ainsi, MDM2 peut se lier à deux molécules qui sont directement impliquées dans le contrôle de la croissance cellulaire: pRb, le produit du gène suppresseur de tumeurs du rétinoblastome [22] et E2F1, un facteur de transcription capable de transactiver certains gènes responsables de la progression des cellules en phase S [23]. Il avait été conclu de ces observations que MDM2 pouvait stimuler la croissance cellulaire, soit en activant directement E2F1, soit en complexant pRb qui libérait alors E2F1. Aujourd'hui, où il est clairement établi qu'E2F1 est également capable d'induire l'apoptose (mettant en jeu des voies dépendantes ou indépendantes de p53) [24, 25], l'interprétation de ces observations devient plus complexe. Dans les cellules ne contenant pas la p53, il semblerait que l'induction de l'apoptose par E2F1 soit due à sa capacité de se fixer sur l'ADN mais pas à sa fonction transactivatrice. Cela pourrait donc expliquer que MDM2 qui agit sur cette fonction transactivatrice de E2F1,

n'induit pas l'apoptose des cellules [25]. A l'inverse, l'apoptose p53-dépendante serait déclenchée par une surexpression de la p53 induite par E2F1, cette apoptose étant alors inhibable par MDM2 [26]. Dans ce cas de figure, l'activation de E2F1 par MDM2, potentiellement capable de déclencher cette voie d'apoptose semble alors assez paradoxale. On peut toutefois formuler l'hypothèse selon laquelle l'activation de E2F1 par MDM2 pourrait, dans certaines circonstances, être dirigée uniquement vers les gènes de progression en phase S et non vers la p53, ou encore, que le contrôle de la surexpression de la p53 induite par E2F1 ne se fait pas au niveau transcriptionnel.

• *MDM2, un acteur de l'import-export nucléaire*

Enfin, une nouvelle fonction semble pouvoir être attribuée à MDM2. En effet, il a été montré très récemment que MDM2 effectuait des navettes permanentes entre le noyau et le cytoplasme et que ce phénomène était dû à l'existence d'une séquence dite « d'export nucléaire » (SEN) située entre les acides aminés 197 et 211. Il a aussi été montré que l'inhibition de l'export de MDM2 altérait ses effets sur la p53, à la fois au niveau de l'inhibition de son activité transcriptionnelle et de sa dégradation [27]. L'implication de MDM2 dans un mécanisme de transport nucléo-cytoplasmique avait déjà été suggérée par Maréchal *et al.* [28] qui avaient mis en évidence, dans des cellules murines, une interaction entre MDM2 et la protéine L5 qui intervient dans le transport des ARNr 5S. Par ailleurs, il avait été montré que MDM2 pouvait se lier directement et spécifiquement, *via* son motif *RING finger*, avec certaines séquences d'ARN [29]. Enfin, une étude récente a permis de montrer, par la technique du double hybride dans la levure, que MDM2 interagissait avec l'homologue humain de Numb – une protéine impliquée dans le processus de division cellulaire asymétrique qui a lieu durant les étapes précoces du développement embryonnaire de la drosophile – et que cette interaction induisait une diminution de la quan-

tité globale de Numb mais surtout modifiait sa localisation subcellulaire [30]. Bien qu'il reste à préciser s'il existe un lien entre tous ces résultats, il est séduisant de penser que MDM2 pourrait, de manière générale, moduler le transport et la stabilité de molécules (ARN ou protéines) impliquées dans la croissance cellulaire ■

RÉFÉRENCES

1. Piette J, Neel H, Maréchal V. Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene* 1997; 15: 1001-10.
2. Maréchal V. Mdm2, p53 et cycle cellulaire: quand le mieux est l'ennemi du bien. *Path Biol* 1997; 45: 824-32.
3. Prives C. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* 1998; 95: 5-8.
4. Cahilly-Snyder L, Yang-Feng T, Franke U, George DL. Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somat Cell Mol Genet* 1987; 13: 235-44.
5. Haines DS. The *mdm2* proto-oncogene. *Leuk Lymphoma* 1997; 26: 227-38.
6. Fakharzadeh SS, Trusko SP, George DL. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J* 1991; 10: 1565-9.
7. Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 3453-9.
8. Zhou M, Yeager AM, Smith SD, Findley HW. Overexpression of the MDM2 gene by childhood acute lymphoblastic leukemia cells expressing the wild-type p53 gene. *Blood* 1995; 85: 1608-14.
9. Landers JE, Cassel SL, George DL. Translational enhancement of *mdm2* oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. *Cancer Res* 1997; 57: 3562-8.
10. Capoulade C, Bressac-de Paillerets B, Lefrère I, *et al.* Overexpression of MDM2, due to enhanced translation, results in inactivation of wild-type p53 in Burkitt's lymphoma cells. *Oncogene* 1998; 16: 1603-10.
11. de Oca Luna RM, Tabor AD, Eberspacher H, *et al.* The organization and expression of the *mdm2* gene. *Genomics* 1996; 33: 352-7.
12. Olson DC, Marechal V, Momand J, Chen J, Romocki C, Levine AJ. Identification and characterization of multiple *mdm2* proteins and *mdm2*-p53 protein complexes. *Oncogene* 1993; 8: 2353-60.
13. May P, Soussi T. Le suppresseur de tumeur p53. *Path Biol* 1997; 45: 781-4.

RÉFÉRENCES

14. Grossman SR, Perez M, Kung AL, *et al.* P300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol Cell Biol* 1998; 2: 405-15.
15. Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M. Mdm2 expression is induced by wild-type p53 activity. *EMBO J* 1993; 12: 461-8.
16. Sigalas I, Calvert HA, Anderson JJ, Neal DE, Lunec J. Alternatively spliced mdm2 transcripts with loss of p53 binding domain sequences: transforming ability and frequent detection in human cancer. *Nature Med* 1996; 2: 912-7.
17. Brown DR, Thomas CA, Deb SP. The human oncoprotein MDM2 arrests the cell cycle: elimination of its cell-cycle-inhibitory function induces tumorigenesis. *EMBO J* 1998; 17: 2513-25.
18. Lundgren K, Montes de Oca Luna R, McNeill YB, *et al.* Targeted expression of MDM2 uncouples S phase from mitosis and inhibits mammary gland development independent of p53. *Genes Dev* 1997; 11: 714-25.
19. Jones SN, Hancock AR, Vogel H, Donehower LA, Bradley A. Overexpression of mdm2 in mice reveals a p53-independent role for mdm2 in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15608-12.
20. Chen L, Marechal V, Moreau J, Levine AJ, Chen J. Proteolytic cleavage of the mdm2 oncoprotein during apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272: 22966-73.
21. Erhardt P, Tomaselli KJ, Cooper GM. Identification of the MDM2 oncoprotein as a substrate for CPP32-like apoptotic proteases. *J Biol Chem* 1997; 272: 15049-52.
22. Xiao ZX, Chen J, Levine AJ, *et al.* Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature* 1995; 375: 694-8.
23. Martin K, Trouche D, Hagemeyer C, Sorensen TS, La Thangue NB, Kouzarides T. Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein. *Nature* 1995; 375: 691-4.
24. Hiebert SW, Packham G, Strom DK, *et al.* E2F-1: DP-1 induces p53 and overrides survival factors to trigger apoptosis. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 6864-74.
25. Hsieh JK, Fredersdorf S, Kouzarides T, Martin K, Lu X. E2F1-induced apoptosis requires DNA binding but not transactivation and is inhibited by the retinoblastoma protein through direct interaction. *Genes Dev* 1997; 11: 1840-52.
26. Kowalik TF, DeGregori J, Leone G, Jakoi L, Nevins JR. E2F1-specific induction of apoptosis and p53 accumulation, which is blocked by Mdm2. *Cell Growth Differ* 1998; 9: 113-8.
27. Roth J, Dobbelstein M, Freedman DA, Shenk T, Levine AJ. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J* 1998; 17: 554-64.
28. Marechal V, Elenbaas B, Piette J, Nicolas JC, Levine AJ. The ribosomal L5 protein is associated with mdm2 and mdm2-p53 complexes. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 7414-20.
29. Elenbaas B, Dobbelstein M, Roth J, Shenk T, Levine AJ. The MDM2 oncoprotein binds specifically to RNA through its RING finger domain. *Mol Med* 1996; 2: 439-51.
30. Juven-Gershon T, Shifman O, Unger T, Elkéles A, Haupt Y, Oren M. The Mdm2 oncoprotein interacts with the cell fate regulator Numb. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 3974-82.

Corinne Capoulade

Étudiante en doctorat, poste d'accueil Inserm.

Joëlle Wiels

Directrice de recherche au Cnrs.
Cnrs UMR 1598, Institut Gustave-Roussy, 94805 Villejuif Cedex, France.

TIRÉS À PART

C. Capoulade.



L'Association des Doctorants de l'Institut Curie
organise

le 1^{er} Congrès Scientifique Interdisciplinaire des étudiants de Paris
les 26-27-28 mai 1999

Institut Curie - Grand amphithéâtre - Laboratoire Constant Burg - 12, rue Lhomond - 75005 Paris - France

Avec la participation de

ACMIP, Association des chercheurs des Mines de Paris - ADELIIH, Association des étudiants de l'Institut d'Hématologie (Hôpital Saint-Louis) - ATCP, Association des thésards de Chimie-Paris - GTEM, Groupe de travail des étudiants du Muséum National d'Histoire Naturelle et des étudiants de l'Institut Pasteur, de l'École Normale Supérieure, de l'École des Ponts et Chaussées

Thèmes

• Approches physicochimiques et moléculaires des protéines et de l'ADN • Biologie, dynamique et différenciation cellulaires • Virologie et Immunologie • Conception, synthèse et vectorisation d'agents thérapeutiques • Cytogénétique et génétique pathologiques, génotoxicologie

Renseignements et inscriptions

ADIC - Institut Curie, 26, rue d'Ulm - 75005 Paris - Tél. : 01 42 34 66 78 ou 01 42 34 64 26 - e-mail : adic@curie.fr

Contacts Institut Curie

- Service de Presse
- ADIC

Catherine Goupillon
Nicolas Sévenet

Tél. : 01 44 32 40 63
Tél. : 01 42 34 66 78

service.presse@curie.fr
adic@curie.fr