

p73, nouveau médiateur de l'apoptose induite par E2F-1

Le gène suppresseur de tumeur *p53* code pour un facteur de transcription qui joue un rôle clef dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose [1]. En réponse à de nombreuses perturbations, comme les lésions de l'ADN, l'activation d'oncogènes cellulaires ou l'hypoxie, la protéine p53 est stabilisée et provoque l'arrêt du cycle cellulaire et/ou entraîne l'apoptose. Ces effets biologiques de p53 en font un acteur essentiel de la prévention de la transformation cellulaire. Cependant, si la délétion ou la mutation du gène *p53* entraîne bien une résistance à l'apoptose induite par des agents cytotoxiques, cette résistance est incomplète. Ceci suggérait l'existence de voies apoptotiques alternatives indépendantes de p53. Deux gènes homologues de *p53*, nommés *p63* et *p73*, ont été récemment identifiés (*m/s* 1997, n°12, p. 1472). Le gène *p73* produit plusieurs variants d'épissage qui, comme p53, possèdent un domaine de transactivation, un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'oligomérisation (*figure 1*). Comme c'est le cas pour p53, la surexpression de p73 provoque l'apoptose.

p73, protéine pro-apoptotique...

Il y a un peu plus d'un an, plusieurs études ont permis d'établir que la protéine p73 est impliquée dans l'apoptose provoquée par des agents génotoxiques, comme le cisplatine ou les radiations ionisantes. L'apparition de lésions de l'ADN active la protéine kinase ATM (pour *Ataxia-Telangiectasia-Mutated*) dont l'une des cibles bien connues est p53 (*figure 2*).

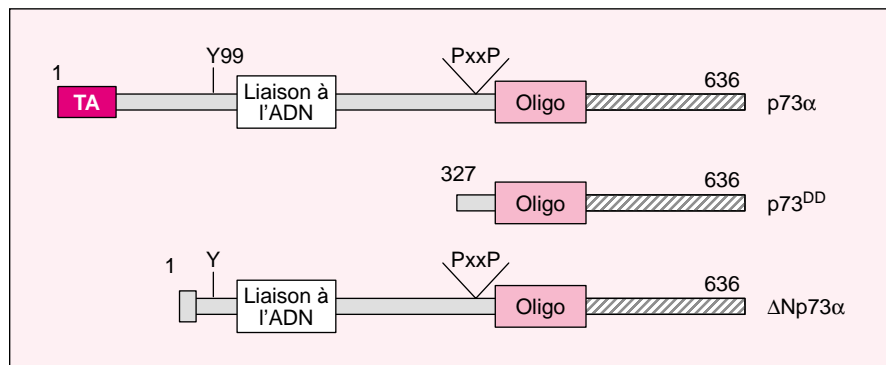


Figure 1. **Structure de la protéine p73.** Les isoformes longues de p73 (ici est représenté p73-alpha) contiennent un site de phosphorylation (Y99) et des domaines d'interaction avec c-Abl (PxxP), de transactivation (TA), de liaison à l'ADN et de tétramérisation (oligo). La partie hachurée C-terminale correspond aux régions subissant un épissage alternatif. Le mutant dominant négatif p73^{DD}, qui ne contient que le site de tétramérisation, se lie à la protéine p73 endogène et inhibe sa capacité à induire la transcription des gènes cibles. Il existe aussi des formes courtes de p73, ΔNp73, tronquées de leur partie N-terminale et issues de l'utilisation d'un promoteur alternatif.

Une autre cible est c-Abl (l'homologue cellulaire de l'oncogène Abelson du virus de la leucémie murine, *m/s* 2000, n°5, p. 704), avec laquelle elle interagit, et dont elle induit la phosphorylation. Si c-Abl n'a pas d'effet direct sur p53, elle interagit en revanche par son domaine SH3 (domaine d'homologie avec la kinase Src) avec le motif PxxP de p73, activant ainsi p73 en la stabilisant ou en provoquant sa phosphorylation au niveau d'un résidu tyrosine. La mutation du motif PxxP supprime la capacité de p73 à induire l'apoptose, sans inhiber sa capacité à transactiver d'autres gènes. Les gènes cibles de p73 impliqués dans son action pro-apoptotique restent cependant à identifier [2].

Très récemment d'autres équipes ont montré que p73 était aussi impliquée dans une autre voie d'activation de l'apoptose qui met en jeu le facteur de transcription E2F-1 [3-5].

L'activation de E2F-1 est déclenchée par la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome Rb qui l'inactive et la dissocie de E2F-1. E2F-1 peut alors contrôler l'entrée en phase S du cycle. E2F provoque aussi l'apoptose de certaines cellules par des mécanismes dépendants ou indépendants de p53, les premiers mettant en jeu le complexe MDM2/p14 (*m/s* 1999, n°4, p. 524) (*figure 2*), les seconds la voie NF-κB (*figure 2*) [6].

Or l'inactivation de Rb augmente l'expression de p73 [9], ce qui suggère que p73 peut être, comme p53,

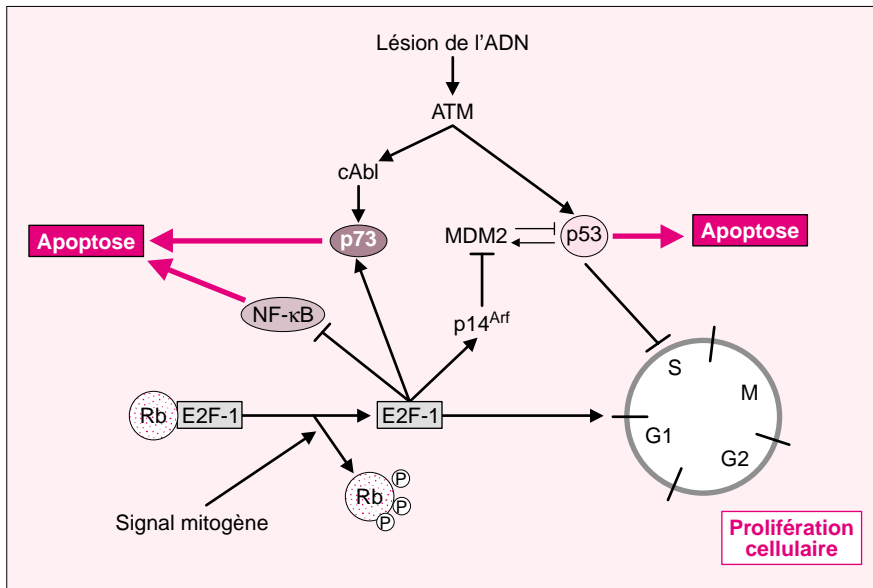


Figure 2. **Voies d'activation de p73.** Les lésions de l'ADN provoquent l'activation de la protéine-kinase ATM (Ataxia-Telangiectasia-Mutated) dont l'une des cibles, p53, peut induire l'apoptose et/ou un arrêt du cycle cellulaire. L'autre cible d'ATM est c-Abl qui, en activant p73, provoque aussi l'apoptose. Le facteur de transcription E2F-1, dont l'activation est provoquée par l'inactivation de la protéine du rétinoblastome (Rb) joue un rôle-clé dans l'entrée en phase S du cycle cellulaire. La surexpression de E2F-1 peut aussi provoquer l'apoptose par différentes voies. La première, dépendante de p53, met en jeu l'activation de la protéine p14^{Arf} qui, en séquestrant la protéine MDM2, l'empêche d'inactiver ou de dégrader p53. Deux autres voies sont indépendantes de p53 : l'une consiste en l'inactivation de facteurs de survie comme NF-κB, et l'autre en l'activation de la protéine p73 probablement via un mécanisme transcriptionnel direct.

une des cibles de E2F-1. Deux études utilisant des cellules dérivées d'ostéosarcome n'exprimant pas p53 ont permis d'établir que la surexpression de E2F-1, en activant p73, provoque l'apoptose des cellules par une voie qui ne fait pas intervenir p53 [3, 4]. La surexpression de E2F-1 dans ces cellules augmente à l'échelon transcriptionnel et protéique l'expression des isoformes α et β de la protéine p73. Il s'agit essentiellement d'un effet direct de E2F-1 qui, en se fixant sur des séquences cibles du promoteur du gène *p73*, stimule sa transcription. La capacité de E2F-1 à provoquer l'accumulation de p73 est également observée dans des conditions physiologiques, lors de la transition de la phase G₁ à la phase S du cycle cellulaire. La surexpression dans ces cellules dépourvues de p53 de mutants dominants négatifs de p73 (p73^{DD}), qui ne contiennent que

le domaine de tétramérisation (figure 1), ou l'utilisation d'ARN antisens, réduisent l'apoptose provoquée par E2F-1, démontrant ainsi le rôle spécifique de p73. Enfin, l'utilisation de fibroblastes embryonnaires isolés à partir de souris *p73*^{-/-}, *p53*^{-/-}, et doubles mutantes *p53*^{-/-}; *p73*^{-/-}, révèle que p53 et p73 contribuent toutes deux à l'apoptose provoquée par la surexpression de E2F-1 [3].

Voie E2F-1 – p73 dans l'apoptose des lymphocytes T périphériques

L'engagement du récepteur TCR des lymphocytes T périphériques provoque normalement leur entrée dans le cycle cellulaire. Cependant, une stimulation très importante peut conduire à l'apoptose des cellules T, qui survient en fin de phase G₁. Si les mécanismes moléculaires étaient encore inconnus, on savait que ce

processus était indépendant de p53. On savait aussi que l'inactivation du gène *E2F-1* chez la souris provoquait une augmentation significative du nombre de cellules T et une splénomégalie, conséquences probables d'un défaut d'apoptose lymphocytaire. Ceci suggérait une implication de E2F-1 dans certaines voies d'apoptose des lymphocytes T.

Le groupe de SF Dowdy vient de confirmer cette hypothèse. L'introduction dans les cellules Jurkat (lignée T) d'une protéine E2F-1 mutante, tronquée de son domaine de transactivation carboxy-terminal et se comportant comme un dominant négatif, protège en effet les cellules de l'apoptose provoquée par l'engagement de leur TCR (obtenu par la ligature d'anticorps anti-CD3) [5]. Les auteurs observent aussi que l'apoptose des cellules Jurkat est normalement précédée de l'accumulation de la protéine p73 dont le rôle clé est, ici encore, démontré par la surexpression du mutant dominant négatif p73^{DD}. Des résultats similaires sont observés dans des lymphocytes T périphériques murins (splénocytes). En outre, les splénocytes dérivés de souris dans lesquelles les gènes codant pour E2F-1 ou p73 ont été inactivés résistent à l'apoptose induite par l'anticorps anti-CD3. Ces résultats montrent le rôle de E2F-1 et de p73 dans l'apoptose des lymphocytes T provoquée par l'engagement de leur TCR. Contrairement à p53, p73 est donc impliquée dans l'apoptose déclenchée non seulement par les lésions de l'ADN mais aussi par l'activation de certains récepteurs.

... p73, protéine anti-apoptotique !

Il serait toutefois réducteur de limiter le rôle de p73 à ses effets pro-apoptotiques. Alors qu'il n'existe qu'une isoforme de p53, les gènes homologues p63 et p73 font l'objet d'un épissage alternatif produisant plusieurs isoformes.

Dans certaines cellules neuronales, c'est une isoforme courte de p73, transcrite d'un promoteur alternatif situé dans le troisième intron du gène, qui est majoritaire. Cette isoforme, tronquée de l'extrémité amino-terminale des isoformes

longues α et β , ne possède pas le domaine de transactivation (*figure 1*). *In vitro*, la culture des cellules en l'absence de *nerve growth factor* (NGF) provoque une diminution de l'expression de cette isoforme tronquée de p73 et l'apoptose des cellules. Il y a un lien de cause à effet puisque l'expression de l'isoforme tronquée de p73 prévient cette apoptose induite par privation de NGF et que l'apoptose neuronale est importante chez les souris *p73*^{-/-} [10].

Ces résultats expérimentaux suggèrent un effet anti-apoptotique important de la forme tronquée de p73 dans le développement du système nerveux ; cet effet serait dû à la capacité de la forme tronquée de p73 à antagoniser l'action de p53.

Conclusions

Le gène *p73*, homologue de *p53*, a donc la particularité de coder pour plusieurs isoformes dont les fonctions sont très différentes voire opposées, les isoformes courtes étant anti-apoptotiques tandis que les isoformes longues sont impliquées dans des voies apoptotiques qui peuvent être distinctes ou complémentaires de celles passant par p53. La distribution tissulaire différente de p53 et de p73 ainsi que les mécanismes différents conduisant à leur activation pourraient expliquer pourquoi les altérations de ces deux protéines n'ont pas les mêmes conséquences sur le développement normal et la tumorigénèse.

Ces observations pourraient s'avérer importantes pour le développement de stratégies thérapeutiques fondées sur le transfert du gène *E2F-1* [11,

12] ou l'activation de cette protéine [13]. Ainsi, l'hyperméthylation de *p73*, observée par exemple dans certaines leucémies aiguës [14, 15], pourrait influencer la réponse à un traitement fondé sur l'activation de E2F-1. Quant à l'effet pro-apoptotique d'une surexpression de p73, il a été proposé comme une alternative au transfert de *p53* dans les cellules tumorales pour éviter l'effet dominant négatif d'une p53 mutée [16].

1. Soussi T. Cycle cellulaire et apoptose : le gène suppresseur de tumeur *p53*. *Med Sci* 2000 ; 16 : 469-73.
2. White E, Prives C. DNA damage enables p73. *Nature* 1999 ; 399 : 734-5.
3. Irwin M, Marin MC, Phillips AC, et al. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1 induced apoptosis. *Nature* 2000 ; 407 : 645-8.
4. Stiewe T, Pützer BM. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1 induced apoptosis. *Nat Genet* 2000 ; 26 : 464-9.
5. Lissy NA, Davis PK, Irwin M, Kaelin WG, Dowdy SF. A common E2F-1 pathway mediates cell death induced by TCR activation. *Nature* 2000 ; 407 : 642-5.
6. Nevins JR. Towards an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Diff* 1998 ; 9 : 585-93.
7. Bates S, Phillips AC, Clark PA, et al. p14^{ARF} links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 1998 ; 395 : 124-5.
8. Phillips AC, Ernst MK, Bates S, Rice NR, Vousden KH. E2F-1 potentiates cell death by blocking anti-apoptotic signalling pathways. *Mol Cell* 1999 ; 4 : 771-81.
9. Marin MC, Jost CA, Irwin MS, DeCaprio JA, Caput D, Kaelin WG. Viral oncoproteins discriminate between p53 and the p53 homologue p73. *Mol Cell Biol* 1998 ; 18 : 6316-24.
10. Pozniak CD, Radinovic S, Yang A, McKeon F, Kaplan DR, Miller FD. An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science* 2000 ; 289 : 304-6.
11. Hunt KK, Deng J, Liu TJ, et al. Adenovirus-mediated overexpression of the transcription factor E2F-1 induces apoptosis in human breast and

ovarian carcinoma cell lines and does not require p53. *Cancer Res* 1997 ; 57 : 4722-6.

12. Fueyo J, Gomez-Manzano C, Yung WK, et al. Overexpression of E2F-1 in glioma triggers apoptosis and suppresses tumour growth *in vitro* and *in vivo*. *Nat Med* 1998 ; 4 : 685-90.

13. Chen YN, Sharma SK, Ramsey TM, et al. Selective killing of transformed cells by cyclin/cyclin-dependent kinase 2 antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 4325-9.

14. Kawano S, Miller CW, Gombart AF, et al. Loss of p73 gene expression in leukemias/lymphomas due to hypermethylation. *Blood* 1999 ; 94 : 1113-20.

15. Corn PG, Kuerbitz SJ, van Noesel MM, et al. Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma in associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Res* 1999 ; 59 : 3352-6.

16. Arrowsmith CH. Structure and function in the p53 family. *Cell Death Diff* 1999 ; 6 : 1169-73.

Juliette Brey
Éric Solary

Inserm U. 517, UFR de médecine et des sciences pharmaceutiques, 7, boulevard Jeanne-d'Arc, 21000 Dijon, France.

Béatrice Eymin

EMI 9924, Institut Albert-Bonniot, Rond-Point de la Chantourne, 38706 La Tronche, France.