

La p53 dans tout ses états : compte rendu du 8^e symposium p53

Le symposium « p53 1994 » (Toronto, Canada) a été dominé par des aspects très fondamentaux de l'étude de la p53, ce qui contrastait beaucoup avec les deux rencontres précédentes (Princeton, NJ, USA, 1991 et Tibérias, Israël, 1993 [1]), au cours desquelles les analyses cliniques avaient eu la part belle.

Il semble maintenant acquis que les mutations du gène *p53* sont retrouvées dans environ 50 % des cancers humains et peuvent être corrélées à un mauvais pronostic pour le malade. La constitution et l'analyse d'une banque de données comprenant plus de trois mille mutations du gène *p53* (C. Harris, Bethesda, MD, USA et T. Soussi, Paris, France [2]) ont permis d'établir que ces mutations sont généralement propres aux types de cancers dans lesquels on les trouve. Dans les cancers cutanés de patients atteints de xeroderma pigmentosum, outre la découverte de mutations spécifiques à l'intervention des rayons ultraviolets, il a aussi été montré que la plupart de ces mutations sont localisées sur le brin non transcrit du gène *p53* (L. Daya-Grosjean, Villejuif, France) [3, 4]. D'autres biais de mutation ont pu aussi être décrits, comme l'absence de mutation au niveau du codon 175 dans les cancers du poumon alors que ce codon correspond à 10 % des mutations dans tous les autres cancers. On savait aussi que 90 % des mutations touchent la région centrale de la protéine p53 qui contient le domaine de fixation à l'ADN, alors que le domaine de transactivation, situé dans la partie aminoterminal, n'est jamais muté. Ce paradoxe apparent a été résolu par A.J. Levine (Princeton, NJ, USA) [5]. La consti-

tution d'une librairie de mutants dans le domaine de transactivation a permis de montrer qu'aucune mutation ponctuelle n'est capable d'altérer la fonction transactivatrice. En revanche, cette activité peut être altérée si au moins deux mutations ponctuelles affectent simultanément certains acides aminés du domaine de transactivation. Ce type d'événement étant naturellement très rare, on comprend mieux le biais décrit ci-dessus.

L'inactivation de la p53 par mutation dans la partie codante du gène ne semble pas être l'unique moyen d'inactiver la p53. Il avait été montré que le gène *p53*, qui pouvait être muté de manière constitutionnelle chez 70 % des familles atteintes du syndrome de Li-Fraumeni et coségrégait avec le phénotype d'apparition des cancers (*m/s* n° 7, vol. 8, p. 733). S. Friend (Charlestown, USA) a montré que, dans les familles qui n'ont pas de mutation dans la partie codante du gène, seul un des deux allèles *p53* est exprimé. Ce résultat suggère que, d'une part, il peut exister des altérations dans les régions de régulation de l'expression du gène *p53* et que, d'autre part, il pourrait y avoir un effet de dosage génique chez ces patients. Il serait sûrement intéressant de rechercher si ce type d'altération peut être retrouvé dans des tumeurs d'origine somatique. Ce résultat est à rapprocher des études sur les souris hétérozygotes pour la délétion du gène *p53* qui développent des cancers à une fréquence intermédiaire entre celle des souris normales et celles qui sont homozygotes pour cette délétion (L.A. Donehower, Houston, TX, USA). L'analyse du spectre des

mutations germinales du gène *p53* dans les familles atteintes du syndrome de Li-Fraumeni montre que celui-ci n'est pas différent de celui des altérations somatiques, avec une prédominance de transition. De plus, contrairement à ce qui avait été décrit précédemment, ces mutations ne sont pas concentrées dans les exons 8 et 9 du gène mais peuvent être retrouvées dans les exons 4 à 7 (D. Malkin, Toronto, Canada).

Un autre moyen d'inactiver la fonction de la p53 a été décrit par U. Moll (New York, NY, USA). Dans la plupart des neuroblastomes indifférenciés, une quantité élevée de protéine p53 est retrouvée exclusivement dans le cytoplasme des cellules tumorales. Le séquençage du gène *p53* dans ces cellules montre qu'il n'a subi aucune altération. Un résultat similaire avait été décrit par les mêmes auteurs dans les cancers du sein inflammatoires (*m/s* n° 8, vol. 8, p. 874). Ce mécanisme d'exclusion nucléaire de la p53 est très important car il montre que la p53 peut être indirectement altérée au niveau de voies métaboliques qui assurent son transport dans la cellule, et probablement aussi par tout autre type d'altération qui affecte le fonctionnement normal de la p53. Ces travaux montrent enfin que l'analyse des altérations du gène *p53* doit être envisagée par toutes les techniques qui permettent d'explorer les différents mécanismes qui aboutissent à la perturbation de sa fonction. L'analyse moléculaire, par l'intermédiaire d'hybridation spécifique sur une librairie d'oligonucléotides correspondant à la majorité des mutations rapportées dans les cancers humains, est extrêmement séduisant-

te mais son application pratique en routine attendra encore quelques années (Friend, Boston, USA). L'analyse immunohistochimique (D. Barnes, Londres, GB ; W. Bennett, Bethesda, USA ; U. Moll, New York, USA) présente de nombreux avantages, en particulier celui de mettre en évidence toute accumulation anormale de p53 qui ne serait pas due à des mutations. Enfin, la recherche d'anticorps circulants anti-p53 qui est directement corrélée à la surexpression de protéine p53 (R. Lubin, Paris, France ; K. Angelopoulos, Toronto, Canada ou Z. Sthoger, Rehovot, Israël) semble être un très bon complément à l'analyse immunohistochimique. La mise au point d'un test simple basé sur l'activité biologique de la p53 présenté par T. Frebourg (Rouen, France) semble aussi très prometteuse, tant pour les mutations constitutionnelles que pour les mutations somatiques. En 1993, B. Vogelstein indiquait dans un éditorial à *Nature* qu'il n'y avait « plus de place à l'auberge p53 », cela pour signifier que le nombre de protéines pouvant fixer la p53 commençait à être élevé. A entendre certaines communications présentées au congrès, l'auberge va devoir se transformer en hôtel. Pas moins de sept nouvelles protéines ont encore été décrites, susceptibles d'interagir avec la p53 : le récepteur à activité tyrosine kinase trk A (X. Montano, Londres, GB), les protéines 53BP1 et 53BP2 dont les fonctions sont inconnues pour l'instant (B. Li, New York, NY, USA) [6], l'hélicase ERCC2 (B. Wasylyk, Strasbourg, France) et la protéine ERCC3 (C. Harris, NIH, USA) [7] qui sont impliquées dans la réparation par excision, la protéine TAF250 qui fait partie du facteur de transcription TFIID, le produit de l'oncogène *c-jun* (L. Bracco, Vitry, France). Bien sûr, il reste à prouver que ces interactions sont véritablement impliquées *in vivo* dans les diverses voies de signalisation comportant la p53. De la même façon, la liste des gènes spécifiquement contrôlés sur lesquels agit spécifiquement la p53 s'est aussi élargie. L'afflux le plus important provenait de B. Vogelstein (Baltimore, MD, USA) qui a avancé le

nombre de trois cent deux, dont la plupart seraient en cours de caractérisation dans son laboratoire. Plus modestement, d'autres équipes ont caractérisé diverses séquences d'ADN fixant spécifiquement la p53. L'une d'entre elles à été retrouvée dans la région amont du promoteur des chaînes lourdes des immunoglobulines (M. Oren, Rehovot, Israël). Ce résultat est à rapprocher des travaux de V. Rotter (Rehovot, Israël) qui avait mis en évidence une relation entre l'expression de p53 normale et la différenciation de la lignée B. La régulation du gène *mdm2* par la protéine p53 (*m/s* n° 8-9, vol. 9, p. 998) semble être beaucoup plus complexe qu'on ne l'avait imaginé au premier abord. M. Oren (Rehovot, Israël) a montré que la p53 se fixait dans le premier intron du gène *mdm2*, activant ainsi un promoteur cryptique qui produisait alors des ARNm différents de ceux exprimés à partir du promoteur en amont du gène [8]. Par ailleurs, les protéines Mdm2 synthétisées à partir de ces deux types d'ARN ne sont pas identiques dans leur partie aminoterminal. Diverses communications ont fait état de la régulation du gène *p53* par son propre produit (G. Lozano et J.M. Hudson, Houston, TX, USA). L'expression d'une forme mutée à la place d'une forme normale dans une grande proportion de tumeurs humaines intéresse les chercheurs pour deux raisons principales : la première est de savoir si certaines, ou toutes, formes mutées de la protéine p53 peuvent acquérir un pouvoir transformant intrinsèque, en dehors d'un effet transdominant sur l'activité de la p53 normale. La seconde est de savoir s'il est possible de transformer à nouveau une protéine mutée en une forme normale, de manière à rétablir la fonction suppresseur de tumeur dans un but thérapeutique. Il semble en effet que les formes mutées de p53 ne sont pas des molécules inertes. Certaines sont capables d'induire la prolifération cellulaire, la capacité métastatique (M. Haas, La Jolla, USA), l'activité mitotique (M. Ozturk, Lyon, France) ou encore l'indépendance vis-à-vis de facteurs de crois-

sance (S. Benchimol, Toronto, Canada). Les protéines mutantes pourraient également agir de manière spécifique selon les tissus. Les souris dont les deux allèles *p53* ont été invalidés par recombinaison homologue développent principalement des tumeurs lymphoïdes, tandis que des souris transgéniques pour une p53 mutante développent une forte proportion de cancers pulmonaires. Le rôle des carcinogènes dans le développement des tumeurs de ces souris a été étudié par C. Kemp (Glasgow, GB). Le diméthylbenzanthracène (DMBA) et le 12-O-tétradécanoyl phorbol-13-acétate (TPA) augmentent la vitesse de progression des tumeurs malignes de la peau, alors qu'ils n'ont pas d'effet sur le nombre de tumeurs bénignes. D'une manière inattendue, l'hépatocarcinogénicité du diéthylnitrosamine (DEN) ne s'est pas accrue chez les souris hétérozygotes par rapport aux souris normales avec deux allèles normaux p53 (C. Kemp, Glasgow, GB). A propos du rôle de la p53 dans le cancer du foie, M. Ozturk (Lyon, France) a présenté des résultats indiquant le maintien de l'activité normale de la p53 pendant la réplication du virus de l'hépatite B (A. Puisieux, Lyon, France) alors que C. Harris (Bethesda, USA) a rapporté l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de la p53 par l'antigène X de ce virus [7]. Cette apparente discordance pourrait être due aux quantités d'antigène HBX utilisées dans les expériences. En effet, la quantité de protéine X synthétisée par le virus est très faible. Une partie importante des présentations était consacrée à l'étude du rôle direct de la p53 dans la réplication et/ou la réparation. Classiquement, la p53 est considérée comme un facteur de transcription qui se lie spécifiquement à l'ADN double-brin par l'intermédiaire de la partie centrale de la protéine. Plusieurs communications ont fait état de la capacité de la p53 de fixer des acides nucléiques simple-brin et de catalyser la renaturation de deux brins d'ADN ou d'ARN complémentaire (H. Stahl, Konstanz, Allemagne, et G. Bakalkin, Stockholm, Suède) [9]. Pour l'instant, cette activité n'est pas

spécifique de la séquence et résiderait dans la partie carboxyterminale de la p53 (C. Prives, New York, USA). Des études en microscopie électronique montrent que la p53 se fixe aussi bien sur les extrémités que dans les régions internes d'une molécule d'ADN simple-brin (G. Bakalkin, Stockholm, Suède) [8]. En mettant en évidence que la p53 pourrait avoir une activité exonucléasique, W. Deppert (Hambourg, Allemagne) a proposé que la p53 pourrait être directement impliquée dans la réplication/réparation de l'ADN en ayant une activité de relecture des erreurs d'incorporation par l'ADN polymérase.

La protéine p53 modifiée par les rayons ultraviolets n'induit pas l'expression de la protéine p21 WAF1 (*m/s n° 2, vol. 10, p. 206 et n° 6-7, vol. 10, p. 744*) et ne participe pas à une fonction de contrôle du cycle cellulaire dans la phase G1/S dans les cellules lymphoblastiques (C. Moyret-Lalle, Lyon, France). Comme la p53 est capable de se lier à deux facteurs (ERCC2 et ERCC3) utilisés pour la réparation des lésions induites par les rayons ultraviolets (B. Wasylyk, Strasbourg, France et C. Harris, Bethesda, USA) [7], elle pourrait être impliquée directement dans la réparation de l'ADN.

Une des communications les plus attendues concernait la structure tridimensionnelle de la protéine p53 (Y.J. Cho, New York, NY, USA) [9]. Celle-ci a été obtenue par l'analyse de diffraction des rayons X par des cristaux comprenant la partie centrale de la protéine (acides aminés 94-311, domaine de fixation à l'ADN). Cette analyse révèle que, outre son originalité – absence d'éléments structuraux retrouvés dans d'autres protéines se liant à l'ADN –, la structure de la protéine prédit l'existence de deux catégories de mutations p53 : la catégorie I, qui comprend les acides aminés directement en contact avec l'ADN, et la catégorie II, qui comprend les acides aminés importants pour le maintien de la structure de la protéine. Dans la première catégorie, on retrouve les codons 248 et 273 qui sont des points chauds de mutation, tandis que dans la catégorie II, se trouve le

codon 175 qui est, lui aussi, un point chaud de mutation. Cette prédiction sur les deux catégories de mutations se trouve être confirmée par l'analyse du comportement des divers mutants p53, tant au niveau structural qu'au niveau fonctionnel (K. Ory, Paris, France [10]). En utilisant toute une série de nouveaux anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine de fixation à l'ADN, Legros (Paris, France) a montré que le changement de conformation des mutants de catégorie I était identique, quel que soit le mutant considéré [11].

L'ensemble des données décrites ci-dessus, ainsi que celles parues récemment dans la littérature, montrent que la p53 n'est sûrement pas un simple facteur de transcription. Tout comme Janus, elle pourrait avoir une seconde face, avec une fonction directe au niveau de la réparation et/ou de la réplication. Ce huitième symposium p53 était sûrement l'un des plus denses que nous ayons eus jusqu'à maintenant. Ce rythme soutenu était largement compensé par un cadre idyllique dans les lacs canadiens. Un seul regret : tout ce qui est décrit ci-dessus et qui correspond aux diverses communications faites au congrès est actuellement, soit déjà publié, soit sous presse. Dommage ! ■

Mehmet Ozturk

Directeur de recherche à l'INSERM, Centre Léon-Bérard, CJF 9302, 28, rue Laennec, 69373 Lyon Cedex 08, France.

Thierry Soussi

Professeur à l'Université P. et M. Curie, Institut de Génétique moléculaire, Inserm U. 301 INSERM, 27, rue Juliette-Dodu, 75010 Paris, France.

RÉFÉRENCES

1. Jeanteur P, Blanchard JM. Compte rendu du 6^e atelier sur le gène et la protéine p53 (Tibérias, Israël, 1-5 novembre 1992). *médecine/sciences* 1993 ; 9 : 79-81.
2. Cariello N, Cui L, Beroud C, Soussi T. Database and software for the analysis of mutations at the human p53 gene. *Cancer Res* 1994 ; 54 : 4454-60.
3. Kahn A. La protéine p53, une sonde pour explorer la nature des facteurs oncogéniques dans l'environnement. *médecine/sciences* 1992 ; 8 : 289-90.
4. Sarasin A. Les gènes humains de la réparation de l'ADN. *médecine/sciences* 1994 ; 10 : 43-54.
5. Lin JY, Chen JD, Elenbaas B, Levine AJ. Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes Dev* 1994 ; 8 : 1235-46.
6. Iwabuchi K, Bartel PL, Li B, Marraccino R, Fields S. Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 6098-102.
7. Wang XW, Forrester K, Yeh H, Feitelson MA, Gu JR, Harris CC. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 2230-4.
8. Bakalkin G, Yakovleva T, Selivanova G, Magnusson KP, Szekely L, Kiseleva E, Klein G, Terenius L, Wiman KG. p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 413-7.
9. 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.
10. Ory K, Legros Y, Auguin C, Soussi T. Analysis of the most representative tumor 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.
11. Legros Y, Lafon C, Soussi T. Linear antigenic sites defined by the B-cell response to human p53 are localized predominantly in the amino- and carboxy-terminals of the protein. *Oncogene* 1994 ; 9 : 2071-6.

TIRÉS A PART

T. Soussi.