

## L'activation de la protéine p53, un événement déterminant de la réponse cellulaire aux radiations ionisantes.

P. Drané, S. Alvarez,  
A. Meiller, E. May

CEA, CNRS, UMR217, Laboratoire de Cancérogénèse Moléculaire  
Fontenay-aux-Roses

### Résumé

*Le gène suppresseur de tumeur p53 code pour une protéine dont la fonction principale est de protéger l'organisme contre la prolifération de cellules potentiellement tumorigènes. Dans des conditions normales (cellules non stressées), la protéine p53 est inactive ; elle est maintenue à un faible niveau par son association avec l'oncoprotéine Mdm2, qui provoque son transport du noyau vers le cytoplasme et sa dégradation par la voie ubiquitine/protéasome. En réponse à un stress, p53 subit une série de modifications post-traductionnelles dont la nature dépend du stress. Ces modifications conduisent à son accumulation dans le noyau et son activation comme facteur de transcription. Dans le cas des radiations ionisantes, l'activation de p53 implique les kinases ATM, ATR, Chk2 et Chk1. Ces kinases phosphorylent l'extrémité N-terminale sur les sérines 15 (ATM et/ou ATR) et 20 (Chk2 et/ou Chk1). Ces phosphorylations permettent la dissociation du complexe p53/Mdm2 et donc la stabilisation de p53 et le recrutement des histones acétyl-transférase CBP/p300 et P/CAF. La fixation de CBP/p300 et P/CAF à l'extrémité N-terminale permet l'acétylation de l'extrémité C-terminale. De plus, ATM induit la déphosphorylation de l'extrémité C-terminale sur la Ser376, créant ainsi un site de fixation pour les protéines 14-3-3. L'ensemble de ces modifications, phosphorylation, acétylation et association avec des co-facteurs, stimule l'activité transcriptionnelle de p53 avec, pour conséquence, l'induction de l'expression de toute une série de gènes impliqués, en particulier, dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. C'est par ces effets biologiques que p53 protège l'organisme de l'action délétère des radiations ionisantes.*

**p53 - Mdm2 - Phosphorylation - Transactivation - Apoptose**

Correspondance : Evelyne May - Laboratoire de Cancérogénèse Moléculaire, UMR217 CEA-CNRS DRR, DSV CEA, BP6 - 92265 Fontenay-aux-Roses Cedex - France  
Tel : 33 (0)1 46 54 87 24 - Fax : 33 (0)1 46 54 87 13 - Email : may@dsvidf.cea.fr

## INTRODUCTION

⇒ Un organisme est continuellement soumis à des stress, endogènes (hypoxie, privation de nucléotides, signal mitogène inapproprié...) ou exogènes (exposition aux radiations ionisantes ou UV, ou à des agents anticancéreux...). Lorsque ces stress provoquent des lésions de l'ADN, ils peuvent être à l'origine de mutations conduisant à plus ou moins long terme au développement d'une tumeur. Afin de pallier de tels risques, la nature a mis en place des mécanismes extrêmement efficaces permettant de corriger les lésions de l'ADN ou d'éliminer les cellules trop endommagées. La protéine p53 joue un rôle central dans ces processus. Suite aux signaux engendrés par un stress, la protéine p53 est activée, elle peut alors agir en tant que facteur de transcription en stimulant l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués, entre autres, dans l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire ou la réparation de l'ADN. La protéine p53 protège ainsi l'organisme contre la pro-

pagation de cellules potentiellement tumorales. Ceci explique pourquoi cette protéine (ou une des voies conduisant à son activation) est retrouvée inactivée dans la presque totalité des tumeurs humaines, faisant de p53 le prototype des gènes suppresseur de tumeur.

Les mécanismes d'activation de p53 dépendent de la nature du stress, les plus étudiés étant ceux induits soit par une irradiation ionisante ou UV, soit par l'expression inappropriée d'un oncogène. Dans cette revue nous nous concentrerons sur les effets des radiations ionisantes. La **figure 1** schématise les différentes étapes conduisant de l'irradiation à la réponse cellulaire dépendante de p53. Nous reviendrons sur ces différentes étapes dans les chapitres suivants. Cependant, étant donné le nombre considérable de travaux publiés dans ce domaine, nous renverrons le plus souvent aux nombreuses revues déjà publiées sur le sujet, en insistant plus particulièrement sur ce que les souris génétiquement modifiées ont apporté à la compréhension des propriétés fonctionnelles de p53.

## PRÉSENTATION DE LA PROTÉINE p53

⇒ La protéine p53 humaine est une phosphoprotéine de 393 acides aminés. Son organisation en domaines fonctionnels est caractéristique de celle d'un facteur de transcription (**figure 2** et références dans [1]). La région N-terminale comprend un domaine acide (résidus 1-42) responsable de l'interaction de p53 avec les composants de l'appareil transcriptionnel, ainsi qu'une région riche en résidus proline (résidus 63-97). La région centrale correspond au domaine de fixation spécifique à l'ADN (résidus 100-300). C'est une région très structurée qui se fixe spécifiquement à une séquence comportant deux motifs de 10 paires de bases. Une telle séquence, appelée dans la suite du texte ER pour "élément de réponse à p53", est retrouvée dans tous les gènes cibles de p53, c'est à dire dans tous les gènes dont l'expression est directement stimulée par p53. La région C-terminale comprend le domaine de tétramérisation (résidus 335-356) qui facilite la fixation spécifique de p53 à son ER et un domaine basique (résidus 363-393) qui participe à la régulation négative de l'activité de p53 lorsque cette protéine doit être maintenue sous une forme inactive. La comparaison des séquences protéiques de différentes espèces révèle l'existence de cinq régions hautement conservées au cours de l'évolution [2]. Quatre de ces cinq régions (II à V) se trouvent dans la partie centrale de la protéine. Les mutations du gène p53 retrouvées dans les tumeurs humaines sont, en majorité, localisées dans ces régions conservées. Ces mutations inhibent la fixation spécifique de p53 à son ER et donc son activité transactivatrice. La région conservée I est localisée dans la région amino-terminale entre les résidus 13 à 26, elle correspond au site de fixation de la protéine Mdm2 [3]. L'interaction entre p53 et Mdm2 conditionne le taux intracellulaire de p53 comme cela sera décrit dans le chapitre 6.

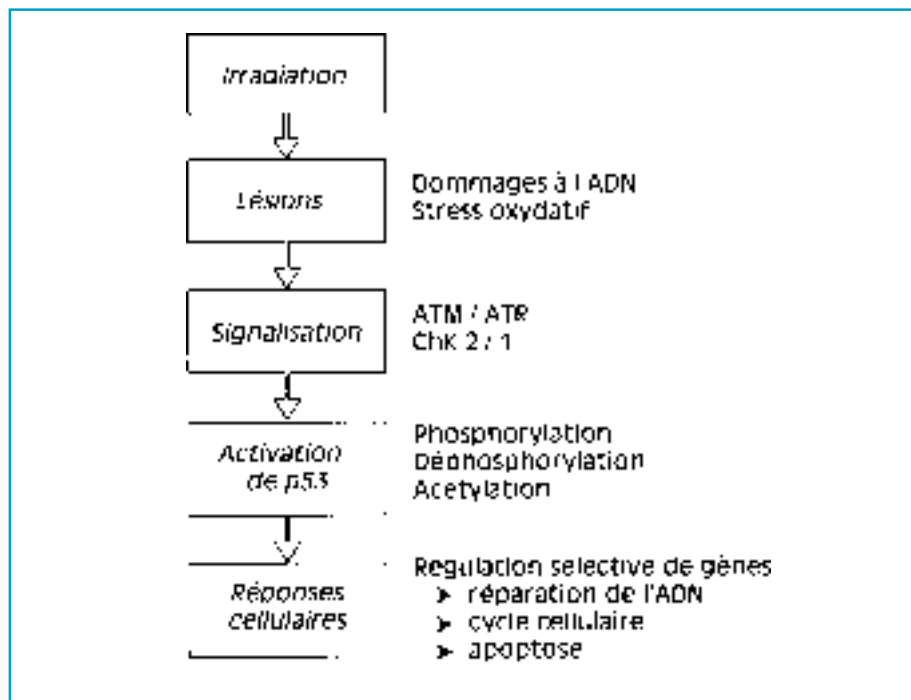


Figure 1.

Les différentes étapes de la réponse cellulaire aux radiations ionisantes, en amont et en aval de l'activation de la protéine p53.

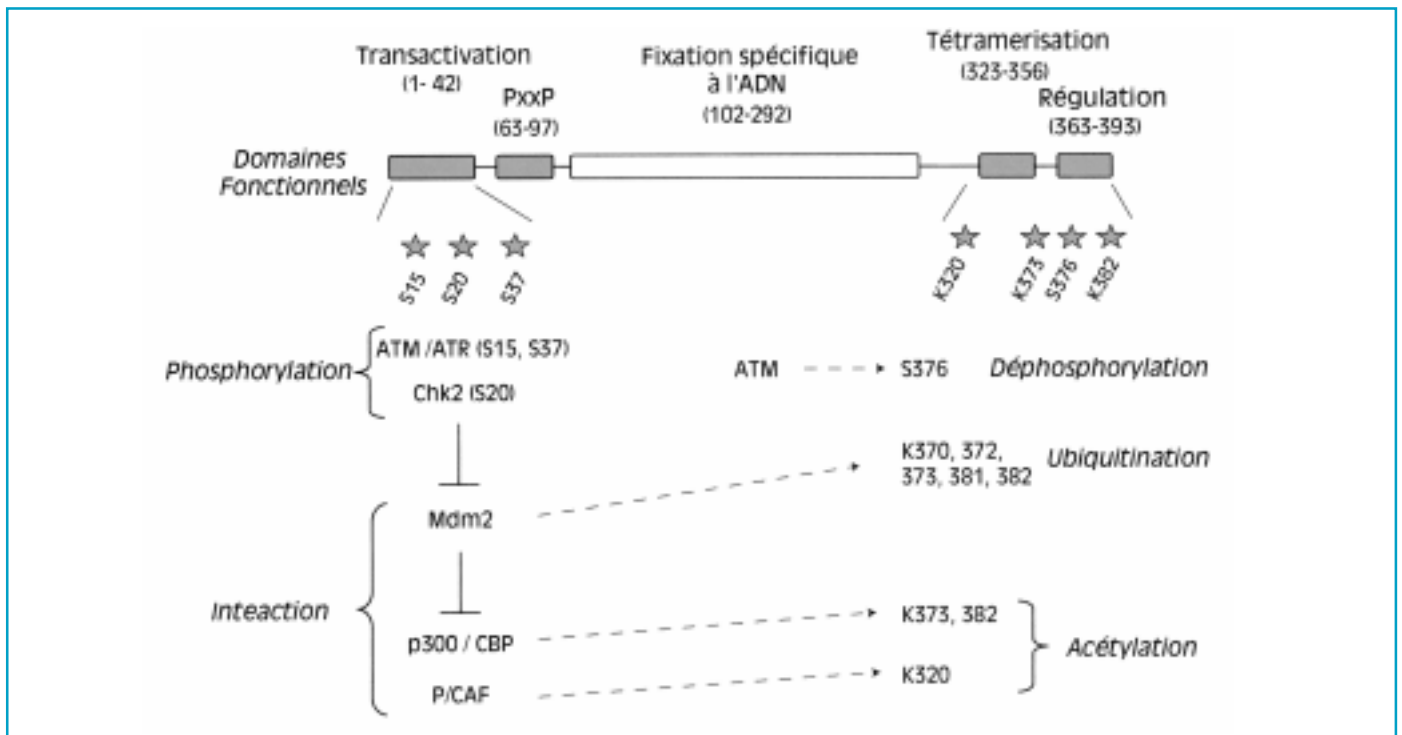


Figure 2.

Organisation de la protéine p53 en domaines fonctionnels et principales modifications post-traductionnelles induites par les radiations ionisantes. Sur cette figure nous n'avons mentionné que les modifications post-traductionnelles impliqués directement dans la réponse aux radiations ionisantes. De fait, les extrémités N- et C-terminales ont été montrées modifiées sur de nombreux résidus, autres que ceux indiqués sur la Figure (références dans [30]). Ces autres modifications impliquent la phosphorylation des Ser6, 9 et 33, 46 et des Thr18 et 81 de l'extrémité N-terminale et 315, 371, 376, 378 et 392 de l'extrémité C-terminale. L'extrémité C-terminale peut être modifiée non seulement par phosphorylation, acétylation et ubiquitination mais également par sumoylation sur la Lys386. Enfin les extrémités N- et C-terminales s'associent à un grand nombre de protéines cellulaires et virales (référence dans [1]).

### CE QUE LES SOURIS GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉES NOUS APPRENNENT SUR LA FONCTION DE LA PROTÉINE p53

⇒ La possibilité de construire des lignées de souris ayant un gène inactivé sur un ou deux de ses allèles (souris "knockout" pour le gène considéré) a ouvert des champs d'investigation illimités permettant, entre autres, de mieux comprendre la place du gène inactivé dans le développement et la viabilité d'un organisme.

Les premières souris ayant le gène p53 inactivé sur un (p53<sup>+/-</sup>) ou deux (p53<sup>-/-</sup>) allèles ont été obtenues en 1992 (références dans [4]). Le fait que ces souris soient viables avec seulement un pourcentage relativement faible d'embryons femelles présentant des anomalies de soudure du tube neu-

ral, montre clairement que p53 n'est pas absolument indispensable au développement normal d'un embryon, (références dans [4]). Cependant, d'après Norimura et al [5], p53 préviendrait la naissance de souris ayant des malformations. Les résultats de ces auteurs, obtenus en irradiant des souris porteuses à la fois d'embryons p53<sup>+/+</sup> et p53<sup>-/-</sup>, sont présentés **tableau II**. Le taux de mort néonatale des embryons p53<sup>-/-</sup> est notablement plus faible que celui des embryons p53<sup>+/+</sup>. En contrepartie, le nombre de fœtus p53<sup>-/-</sup> présentant des malformations est nettement supérieur suggérant fortement qu'un des rôles de p53 soit de prévenir l'effet tératogène des stress géno-toxiques.

Cependant, la caractéristique phénotypique la plus nette des souris p53<sup>-/-</sup> est leur très grande susceptibilité à développer des cancers aussi bien

spontanés que radio-induits (références dans [4]). L'inactivation du gène p53 augmente également le taux d'aberrations chromosomiques radio-induites [6]. Ainsi, p53 intervient clairement dans la protection d'un organisme contre les effets délétères des radiations ionisantes.

La propriété de p53 d'induire l'apoptose rend compte, au moins en partie, du phénotype des souris p53<sup>-/-</sup>. Une des premières observations faite dès l'obtention de ces souris est la stricte dépendance entre la présence d'un gène p53 fonctionnel et l'induction de l'apoptose des thymocytes irradiés, l'irradiation gamma n'induisant pas l'apoptose des thymocytes prélevés sur des souris p53<sup>-/-</sup> (référence dans [4]). Des résultats analogues ont été obtenus in vivo, l'irradiation gamma des souris p53<sup>+/+</sup> induit l'apoptose des cellules souches des cryptes intestinales [7] ainsi que

celle des cellules lymphoïdes du thymus et de la rate [8]. Cet effet n'est pas observé chez les souris p53<sup>-/-</sup> irradiées. Le fait que la majorité des tumeurs spontanées se développant chez les souris p53<sup>-/-</sup> soient des thymomes (références dans [4]) est certainement en relation avec la résistance des thymocytes p53<sup>-/-</sup> à l'apoptose induite par un dommage à l'ADN. De même, l'irradiation des souris gestantes est sans effet sur le nombre de cellules apoptotiques identifiées chez l'embryon p53<sup>-/-</sup>, alors que le nombre de cellules apoptotiques d'un embryon p53<sup>+/+</sup> augmente après irradiation. D'après Norimura et al [5], ceci est à l'origine du faible taux de mort intra-utero et du pourcentage élevé de fœtus p53<sup>-/-</sup> présentant des malformations (**tableau I**). Ces quelques exemples montrent clairement le rôle déterminant de p53 dans la surveillance de l'intégrité du génome au niveau de l'individu.

### RÔLE DE L'ACTIVITÉ TRANSACTIONNATRICE DE p53 DANS LA RÉPONSE CELLULAIRE AUX RADIATIONS IONISANTES

⇒ Alors que plusieurs mécanismes sont invoqués pour rendre compte de l'activité fonctionnelle de p53, le rôle pivot de p53 en tant que facteur de transcription est maintenant très largement reconnu. Bien que la plupart des travaux fassent appel à des cellules en culture, établies le plus souvent à partir de tumeurs, les quelques études faites in vivo sur des souris génétiquement modifiées renforcent le rôle déterminant de cette activité dans l'arrêt du cycle cellulaire [9] et l'induction de l'apoptose, en réponse à un stress. En ce qui concerne l'apoptose, il s'agit de résultats récents obtenus par l'étude de lignées de souris dans lesquelles le gène p53 sauvage est remplacé par un gène muté aux codons 25 et 26 (codons 22 et 23 du gène humain) [10, 11]. Ces mutations sont localisées dans le domaine de transactivation, elles inactivent complètement la propriété de p53 de stimuler l'expression de ses gènes cibles. Les souris n'expriment

que la protéine mutée présentent le même phénotype que les souris p53<sup>-/-</sup>, en particulier les thymocytes de ces souris sont résistants à l'apoptose induite par les radiations ionisantes, montrant clairement le rôle primordial de la fonction transactivatrice de p53 dans l'induction de l'apoptose radio-induite. Ceci n'exclut pas que d'autres mécanismes, comme la régulation négative de la transcription de certains gènes, puissent intervenir dans les activités fonctionnelles de p53 comme cela a été montré pour l'induction de l'apoptose (références dans [12]).

### LES GÈNES CIBLES DE p53 IMPLIQUÉS DANS L'ARRÊT DU CYCLE CELLULAIRE, LA RÉPARATION DE L'ADN ET L'INDUCTION DE L'APOPTOSE

⇒ p53 active la transcription d'un grand nombre de gènes en se fixant, sous une forme tétramérique, à un ER présent soit dans le promoteur soit dans une séquence intronique de ces gènes. Le nombre de gènes potentiellement transactivés par p53 est évalué à plusieurs centaines [13]. Ces gènes peuvent être regroupés sur la base de leur activité. Le **tableau II** donne une liste de gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, l'arrêt de la division cellulaire en phase G1 ou G2/M et l'induction de l'apoptose. Cette liste, loin d'être exhaustive, ne regroupe que des gènes dont la régulation positive par p53 est bien établie. L'obtention de souris ayant les deux allèles du gène Waf1 inactivés [9] a permis de montrer que l'arrêt en G1 en réponse aux radiations ionisantes dépend bien de l'expression de ce gène. Les mécanismes conduisant à l'induction de l'apoptose par p53 sont plus complexes. Parmi les nombreux gènes proapoptotiques dont l'expression est stimulée par cette protéine, aucun ne rend compte à lui seul de la propriété de p53 d'induire l'apoptose. La liste donnée dans le **tableau II**, bien qu'incomplète, montre clairement que p53 est impliquée dans les deux principales voies d'induction de

l'apoptose : la voie des récepteurs membranaires à "domaine de mort" et la voie mitochondriale. Ces deux voies conduisent à l'activation des caspases comme cela est représenté schématiquement **figure 3**.

La plupart des gènes transactivés par p53 ont été caractérisés, in vitro, par l'analyse de cellules en culture. La comparaison des souris p53<sup>+/+</sup> et p53<sup>-/-</sup>, avant et après irradiation, permet de montrer que ces gènes sont également induits in vivo en réponse à un stress génotoxique. Des résultats représentatifs d'une telle étude sont donnés **Figure 4**. La rate et le thymus des souris p53<sup>+/+</sup> sont prélevés avant l'irradiation et 3 heures après l'exposition à une dose unique de 1 Gy. Les taux d'ARN messagers des différents gènes sont évalués par RT-PCR quantitative. Les résultats présentés **figure 4** montrent que l'expression de la plupart des gènes analysés est bien stimulée après irradiation. Cette stimulation dépend entièrement de p53 puisqu'aucune stimulation n'est détectable lorsque les organes sont prélevés sur des souris p53<sup>-/-</sup> traitées en parallèle (résultats non présentés). Néanmoins le niveau de stimulation dépend fortement du gène analysé et à un degré moindre de l'organe considéré, montrant une sélectivité d'expression des gènes cibles de p53.

### DANS LES CELLULES NORMALES, Mdm2 PARTICIPE AU MAINTIEN DE LA PROTÉINE p53 SOUS UNE FORME LATENTE, INACTIVE

⇒ La propriété de la protéine p53 de réagir immédiatement à un stress par l'arrêt du cycle cellulaire ou la mort des cellules par apoptose impose un contrôle très strict de son activité dans des conditions normales de croissance et de développement. La cellule dispose pour cela de différents mécanismes comme le maintien de p53 dans le noyau sous une forme inactive ou son transfert du noyau vers le cytoplasme et sa dégradation par le système protéasome. Ceci se fait par l'intermédiaire de l'interaction

Tableau I.

Effet du statut du gène p53 des embryons sur le pourcentage de fœtus présentant des malformations et sur le taux de mort intra-utéro après irradiation des souris gestantes à une dose de 2 Gy.

Irradiation	Génotype des embryons	Embryons non viables (%)	Fœtus ayant des malformations (%)	Fœtus normaux (%)
0	p53+/+	24	62	14
0	p53-/-	15	56	29
2 Gy	p53+/+	60	20	20
2 Gy	p53-/-	7	70	22

Tableau II.

Quelques uns des gènes cibles de p53 impliqués dans la réparation de l'ADN, la progression du cycle cellulaire, l'apoptose et la dégradation de la protéine p53.

GÈNES / CARACTÉRISTIQUES	ACTIVITÉS	Réf.
REPARATION DE L'ADN		
- <i>p53R2</i> : Ribonucléase réductase	Synthèse de précurseurs nucléotidiques	[25]
- <i>Ddb2</i> ( <i>p48</i> ) : Sous-unité du complexe Ddb (damaged-DNA binding protein)	Réparation par excision de bases	[26]
ARRET DU CYCLE		
- <i>p21/WAF1</i> : Inhibiteur de kinases dépendantes de cyclines	Inhibition de Cdk2 (G1)	[1, 13]
- <i>14-3-3?</i> : Protéine adaptatrice qui favorise les interactions protéine/protéine	Séquestration cytoplasmique du complexe Cdc2/CyclineB1 (G2/M)	[13, 27]
- <i>reprimin</i> : Protéine cytoplasmique glycosylée	Inactivation de Cdc2 (G2/M)	[27]
- <i>GADD45</i> : Induit par un stress génotoxique	Dissociation du complexe Cdc2/CyclineB1 (G2/M) ?	[13, 27]
APOPTOSE		
1 - Voie des récepteurs à «domaine de mort»		
- <i>Fas/Apo1</i> : Membre de la famille des récepteurs au TNF	Activation de la caspase 8	[13, 28]
- <i>Killer/DR5</i> : Membre de la famille des récepteurs au TNF	Activation de la caspase 8	[13, 28]
- <i>PIDD</i> : Protéine à « domaine de mort »	Adaptateur ?	[28]
2 - Voie mitochondriale		
- <i>bax</i> : Membre de la famille Bcl-2	Relargage du cytochrome <i>c</i>	[13]
- <i>PUMA</i> : Membre de la famille Bcl-2	Relargage du cytochrome <i>c</i>	[1, 28]
- <i>NOXA</i> : Membre de la famille Bcl-2	Relargage du cytochrome <i>c</i>	[28]
- <i>p53/AIP1</i> ?	Dissipation du potentiel de membrane mitochondriale (??)	[28]
- <i>Apaf-1</i> : Constituant de l'apoptosome	Activation de la caspase 9	[29]
3 - Autres voies		
- <i>PERP</i> : Membre de la famille PMP-22/gas3	Inconnue	[28]
AUTOREGULATION		
- <i>mdm2</i> : Ubiquitine-ligase E3	Régulation de la stabilité de p53	[1, 13]

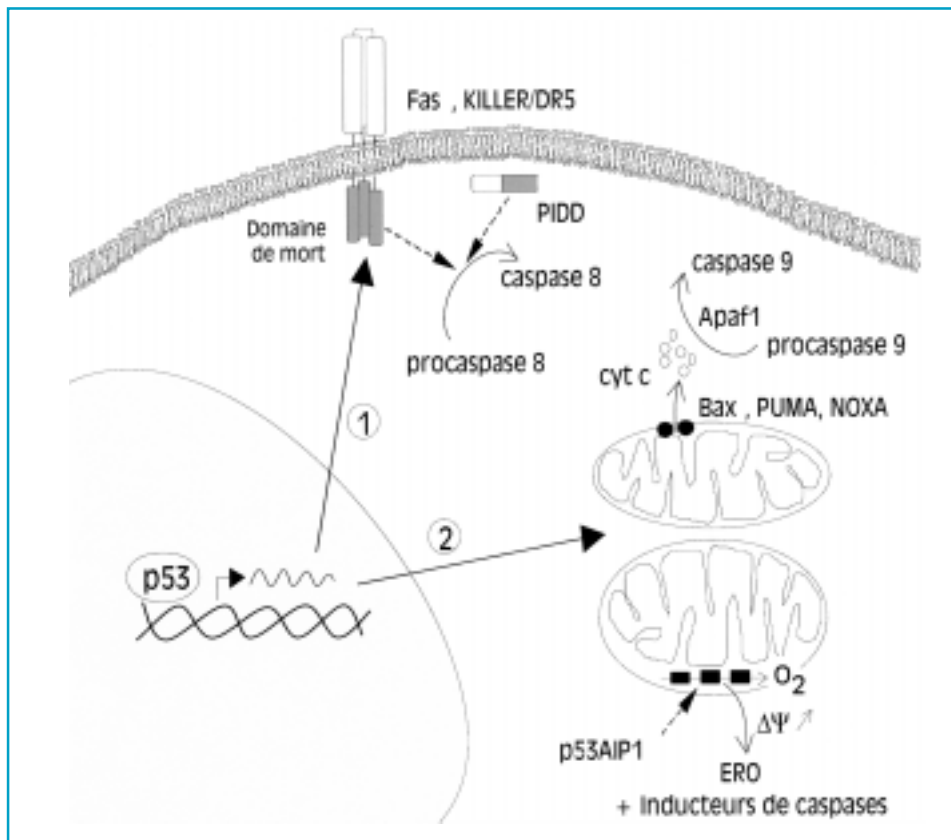


Figure 3.

Les deux principales voies d'induction de l'apoptose peuvent être activées par p53.

L'altération du potentiel de membrane mitochondriale et/ou le relargage du cytochrome c peut résulter de la stimulation de l'expression de gènes appartenant à la famille Bcl2 tels que Bax, PUMA ou NOXA. Ces gènes sont des cibles directes de p53. D'autre part, p53 stimule l'expression de récepteurs membranaires, tels que Fas ou KILLER/DR5, dont la signalisation induit la mort. Ces récepteurs comprennent un "domaine de mort" comme la protéine PIDD. L'expression du gène PIDD est également directement stimulée par p53.

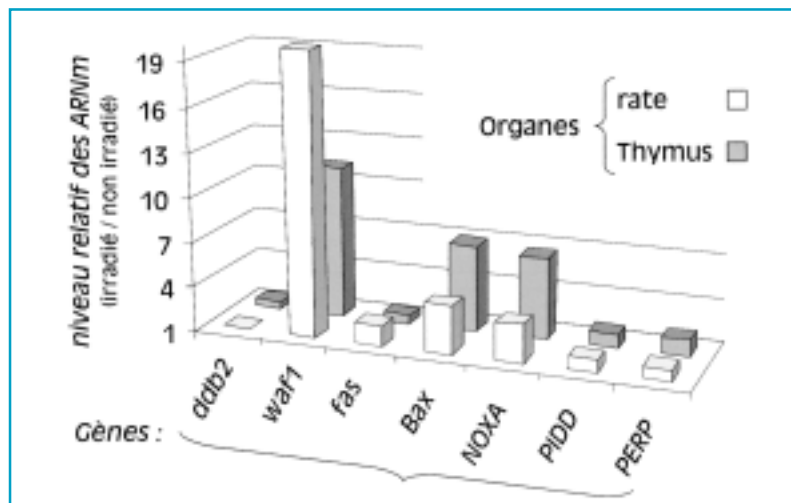


Figure 4.

Stimulation, *in vivo*, de l'expression des gènes cibles de p53 en réponse à une irradiation gamma des souris. Les gènes analysés sont le gène Waf1 impliqué dans l'arrêt du cycle en G1 et les gènes proapoptotiques, fas, bax, NOXA, PIDD, PERP. Les souris sont irradiées à une dose unique de 1 Gy avec un débit de dose de 0.18 Gy/min dans un irradiateur Cis bio International-IBL637. Les souris sont sacrifiées 3 h après l'irradiation. Les taux des ARNm sont quantifiés par RT-PCR quantitative à partir des ARN totaux extraits de la rate et du thymus. Les résultats sont rapportés aux taux d'ARNm quantifiés à partir des organes prélevés sur des souris non irradiées.

entre p53 et Mdm2 (références dans [12]). Mdm2 est un proto-oncogène à activité ubiquitine-ligase E3 qui induit l'ubiquitination du domaine C-terminal en se fixant au domaine N-terminal de p53 (*figure 2*). L'ubiquitination de p53 induit à la fois sa translocation du noyau vers le cytoplasme et sa dégradation par le protéasome.

Le site de fixation de Mdm2 (résidu 13 à 26) recoupe les sites de fixation de facteurs de transcription ubiquitaires ainsi que ceux des histone acétyltransférases, CBP/p300 et P/CAF. Ces cofacteurs, en s'associant au domaine de transactivation, induisent l'acétylation de l'extrémité C-terminale (*figure 2*) et stimulent l'activité transactivatrice de p53. Ainsi, en masquant les sites de fixation de ces cofacteurs, Mdm2 intervient négativement dans la transcription des gènes cibles de p53 (références dans [14, 15]).

Il est intéressant de noter que le gène Mdm2 est une cible directe de p53 (*tableau II*). De ce fait, p53 stimule l'expression de son propre régulateur négatif ce qui génère une boucle d'autorégulation négative. L'étude des souris invalidées pour le gène Mdm2 illustre le rôle primordial de cette boucle d'autorégulation dans le développement embryonnaire. Alors que les souris n'ayant qu'un allèle du gène Mdm2 inactivé sont viables, l'inactivation des deux allèles est létale à un stade embryonnaire précoce. Par contre, les double "knock-out" pour les gènes Mdm2 et p53 sont viables, montrant que la létalité embryonnaire apportée par l'inactivation du gène Mdm2 est abolie par l'inactivation du gène p53. Ces souris illustrent de manière très élégante l'existence d'interactions fonctionnelles entre p53 et Mdm2 au cours du développement foetal (références dans [16]).

### ATM/ATR ET Chk1/2, LES ACTEURS DE L'ACTIVATION DE p53 EN RÉPONSE À UNE IRRADIATION IONISANTE

⇒ La réponse cellulaire à un stress de-

vant être très rapide, la stabilisation et l'activation de la protéine p53 se font essentiellement par l'intermédiaire de modifications post-traductionnelles. L'exposition des cellules aux radiations ionisantes conduit rapidement à la phosphorylation des sérines 15, 20 et 37, dans la région N-terminale de la protéine p53. Les sérines 15 et 37 sont phosphorylées par les kinases ATM et/ou ATR (deux protéines kinases apparentées à la famille des phosphoinositide 3 kinases [PI3K]) et la sérine 20 par Chk2 (Check point kinase 2), elle-même substrat d'ATM (références dans [14]).

#### Une des premières étapes de la transduction du signal en amont de p53 requiert ATM (et ATR)

⇒ ATM est le produit du gène retrouvé muté chez les patients atteints de la maladie neurodégénérative progressive, l'ataxie-telangiectasie (AT). Ces patients présentent une prédisposition à développer des cancers et une extrême radiosensibilité. La phosphorylation sur la sérine 15 par ATM a été montrée *in vitro* et *in vivo*, elle participe à la stabilisation de la protéine p53. Mdm2 est également un substrat d'ATM, ce qui constitue une voie supplémentaire par laquelle ATM peut interférer avec l'interaction p53/Mdm2 et donc réguler la stabilité de p53 (références dans [12]). D'autre part, ATM est impliquée dans la déphosphorylation de la sérine 376, certainement par un mécanisme indirect [17]. La déphosphorylation de cette sérine crée un site de fixation pour une (ou des) protéines de la famille 14-3-3. Les protéines 14-3-3 constituent une famille de protéines conservées chez tous les eucaryotes. Elles interviennent dans un grand nombre de processus cellulaires, en particulier dans la régulation de la progression du cycle cellulaire et l'apoptose [18]. L'association de p53 à 14-3-3 augmente l'affinité de p53 pour ses ER et donc stimule son activité en tant que facteur de transcription. Il est intéressant de noter qu'un membre de cette famille, la protéine 14-3-3s, est une cible directe de p53 (*tableau II*),

suggérant l'existence d'une autre boucle d'autorégulation.

L'étude des souris ATM<sup>-/-</sup> permet de mieux comprendre les relations entre ATM et p53 dans la réponse aux radiations ionisantes. Contrairement aux souris normales, l'irradiation des souris ATM<sup>-/-</sup> n'induit pas l'accumulation de la protéine p53 dans les thymocytes, ce qui se traduit par une stimulation nettement diminuée de l'expression du gène Waf1 et à un défaut d'arrêt en G1 du cycle cellulaire. Par contre, la stimulation de l'expression du gène bax n'est pas affectée et les thymocytes des souris ATM<sup>-/-</sup> irradiées subissent l'apoptose [19]. Ceci suggère l'existence de voies alternatives d'activation de p53 en réponse aux radiations ionisantes. De fait la phosphorylation de la sérine 15 n'est que retardée dans les cellules ATM<sup>-/-</sup>. Cette sérine est également le substrat ATR (pour ATM-rad3-Related). Cette kinase agit principalement en réponse aux radiations UV mais également en réponse aux radiations ionisantes (références dans [20]). ATR pourrait donc rendre compte de la phosphorylation tardive de p53 dans les cellules ATM<sup>-/-</sup>. Les études sur ATR sont moins avancées que celles sur ATM, une des raisons en est l'absence de maladies humaines présentant des mutations de ce gène.

#### Le rôle déterminant de Chk2 (et de Chk1 ?) dans l'activation de p53, en aval d'ATM (et ATR ?)

⇒ Chk1 et Chk2 sont deux sérine/thréonine kinases qui, bien que structurellement différentes, ont en commun un certain nombre de substrats. Les homologues levures de Chk2, Rad53 et cds1, ainsi que Chk1 interviennent dans la réparation de l'ADN et dans l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN (références dans [20]). L'activation de Chk2 par les radiations ionisantes implique sa phosphorylation par ATM. Chk2 activée phosphoryle p53 sur la sérine 20, comme cela a été montré *in vitro* et *in vivo*.

Cette sérine est localisée dans le site de fixation de Mdm2, sa phosphorylation diminue l'affinité de p53 pour Mdm2 et par voie de conséquence augmente la stabilité de p53. Ainsi, dans les cellules U2OS amenées à surexprimer Chk2, le taux de p53 est fortement augmenté, en réponse à une irradiation ionisante, et ceci de manière ATM dépendante [21]. L'étude des souris inactivées pour le gène Chk2 montre clairement que cette kinase agit en amont de p53 dans la réponse des cellules aux radiations ionisantes. Bien que ces souris expriment une p53 normale, les thymocytes Chk2<sup>-/-</sup> irradiés sont résistants à l'apoptose et l'expression des gènes cibles de p53, bax et Waf1, n'est pas stimulée [22]. Enfin la preuve génétique d'une corrélation entre p53 et Chk2 est apportée par l'analyse des mutations germinales retrouvées dans les familles atteintes du syndrome de Li-Fraumeni. Ce syndrome est lié dans 50 % des cas à une mutation transmissible du gène p53. Des mutations du gène Chk2 ont récemment été retrouvées chez des familles ayant un gène p53 sauvage [23].

La kinase Chk1 est phosphorylée par ATR en réponse à une irradiation UV

et dans une moindre mesure en réponse aux radiations gamma (références dans [20]). Chk1 peut phosphoryler p53 sur plusieurs résidus sérines dont ceux en position 15 et 20 [24], mais la place de Chk1 dans l'activation de p53 n'est pas connue. Cela s'explique en particulier par le fait que, comme ATR, l'inactivation de Chk1 est létale à un stade embryonnaire précoce (références dans [20]).

### CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

⇒ Nous avons montré que les voies de transduction du signal induites par les radiations ionisantes convergent vers p53 en induisant des modifications post-traductionnelles à la fois covalentes (phosphorylation, acétylation) et non-covalentes (association à des cofacteurs) de ses extrémités N- et C-terminales. Ces modifications post-traductionnelles en activant la fonction transactivatrice de p53 conduisent soit à l'arrêt du cycle cellulaire soit à l'apoptose. Cependant, dans la cascade des événements telle qu'elle est représentée **figure 1** il reste encore beaucoup de points

d'interrogation. Que p53 soit impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'induction de l'apoptose en réponse à une irradiation ionisante est un fait incontestable. Que le devenir des cellules (arrêt du cycle cellulaire ou apoptose) dépendent essentiellement de l'activité transactivatrice de p53 est acceptée de manière très générale. Par contre, ce qui reste à déterminer c'est comment p53 intègre les différents signaux pour induire une réponse sélective adaptée à une situation donnée. L'application des techniques modernes de criblage différentiel des transcrits par hybridation sur filtres à haute densité permettra d'avancer dans cette connaissance en donnant la possibilité d'établir des profils d'expression des gènes en fonction à la fois du tissu et de la dose d'irradiation. Par l'application des techniques nouvelles d'étude des protéines, il devrait être possible de corréler certains profils d'expression à des modifications post-traductionnelles spécifiques. Appliquée aux tissus tumoraux exprimant une protéine p53 sauvage, une telle étude devrait amener à une meilleure compréhension des mécanismes qui conditionnent la réponse d'une tumeur à une radiothérapie.

### **p53 activation, a key event of the cellular response to gamma irradiation**

*The tumor suppressor gene p53 encodes a protein whose major function is to protect organisms from proliferation of potentially tumorigenic cells. In normal conditions (unstressed cells), the p53 protein is inert and maintained at low level through its association with the Mdm2 oncogene, causing its translocation from the nucleus into the cytoplasm and its degradation through ubiquitin/proteasome pathway. In response to damaged DNA or to a variety of stresses, p53 accumulates in the nucleus and is activated as a transcriptional transactivator. Posttranslational modifications of p53 including multi-site phosphorylation and acetylation are the major mechanism of p53 regulation. After exposure to ionising radiation, p53 activation implicates ATM, ATR, Chk2 and Chk1 kinases that phosphorylate the N-terminal domain on Ser15 (ATM and/or ATR), and Ser20 (Chk2 and/or Chk1), causing the dissociation of the p53/Mdm2 complex and thereby the stabilisation of p53. The process initiated by  $\gamma$ -irradiation exposure involves also increased interaction of the p53 N-terminal domain with CBP/p300 and P/CAF leading to acetylation of the distant C-terminal domain at Lys 320, 373 and 382. In addition, the ATM-mediated dephosphorylation of Ser376 creates a fixation site for 14-3-3 protein. Taken together, phosphorylation, acetylation and association with co-factors induce the stimulation of p53 transcriptional activity resulting in the expression of a set of genes involved, notably, in cell cycle arrest and apoptosis. This stress-induced p53 pathways lead to one of two outcomes: growth arrest or apoptosis and consequently protects the organism from the genotoxic effects of ionising radiation.*

**p53 - Mdm2 - Phosphorylation - Transactivation - Apoptosis.**

## RÉFÉRENCES

1. May P and May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999 ; 18:7621-7636.
2. Soussi T and May P. Structural aspects of p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J.Mol. Biol.* 1996 ; 260 : 623-637.
3. Lane D.P and Hall P.A. MDM2 - arbiter of p53's destruction. *Trends Biochem.Sci.* 1997; 22 : 372-374.
4. Jacks T. Lessons from the p53 mutant mouse. *J.Cancer Res. Clin. Oncol.* 1996 ; 122: 319-327.
5. Norimura T, Nomoto S, Katsuki M, Gondo Y and Kondo S. p53-dependent apoptosis suppresses radiation-induced teratogenesis [see comments]. *Nat. Med.* 1996 ; 2 : 577-580.
6. Bouffler S.D., Kemp C.J., Balmain A and Cox R. Spontaneous and ionizing radiation-induced Chromosomal abnormalities in p53-deficient mice. *Cancer Res.* 1995 ; 55: 3883-3889.
7. Merritt A.J., Potten C.S., Kemp C.J., Hickman J.A., Balmain A., Lane D.P and Hall P.A. The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice. *Cancer Res.* 1994 ; 54 : 614-617.
8. Bouvard V, Zaitchouk T, Vacher M., Dutbu A., Canivet M., Choisy-Rossi C., Nieruchalski M. and May E. Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice. *Oncogene* 2000 ; 19 : 649-660.
9. Deng C., Zhang P, Harper J.W, Elledge S.J and Leder P. Mice lacking p21<sup>CIP1</sup>/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 1995 ; 82 : 675-684.
10. Chao C., Saito S., Kang J., Anderson C.W, Appella E. and Xu Y. p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage. *EMBO J.* 2000 ; 19 : 4967-4975.
11. Jimenez G.S., Nister M., Stommel J.M., Beebe M., Barcarse E.A., Zhang X.Q., O'Gorman S. and Wabl G.M. A transactivation-deficient mouse model provides insights into Trp53 regulation and function. *Nat. Genet.* 2000 ; 26 : 37-43.
12. Woods D.B. and Vousden K.H. Regulation of p53 function. *Exp. Cell Res.* 2001 ; 264 : 56-66.
13. El Deiry W.S. Regulation of p53 downstream genes. *Semin. Cancer Biol.* 1998 ; 8 : 345-357.
14. Wabl G.M. and Carr A.M. The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat. Cell. Biol.* 2001 ; 3 : E277-E286.
15. Prives C. and Manley J.L. Why is p53 acetylated? *Cell* 2001 ; 107 : 815-818.
16. Burns T.F. and El Deiry W.S. The p53 pathway and apoptosis. *J.Cell.Physiol.* 1999 ; 181 : 231-239.
17. Waterman M.J., Stavridi E.S., Waterman J.L. and Halazonetis T.D. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat. Genet.* 1998 ; 19 : 175-178.
18. van Hemert M.J., Steensma H.Y. and van Heusden G.P. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* 2001 ; 23 : 936-946.
19. Barlow C., Brown K.D., Deng C.X., Tagle D.A. and Wynshaw-Boris A. Atm selectively regulates distinct p53-dependent cell-cycle checkpoint and apoptotic pathways. *Nat. Genet.* 1997 ; 17 : 453-456.
20. Zhou B.B. and Elledge S.J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000 ; 408 : 433-439.
21. Chebab N.H., Malikzay A., Appel M. and Halazonetis T.D. Cbk2/bCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev.* 2000 ; 14 : 278-288.
22. Hirao A., Kong Y.Y., Matsuoka S., Wakeham A., Ruland J., Yoshida H., Liu D., Elledge S.J. and Mak T.W. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Cbk2. *Science* 2000 ; 287 : 1824-1827.
23. Bell D.W., Varley J.M., Szydlowski T.E., Kang D.H., Wahrer D.C., Shannon K.E., Lubratovich M., Verselis S.J., Isselbacher K.J., Fraumeni J.F., Birch J.M., Li F.P., Garber J.E. and Haber D.A. Heterozygous germ line bCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 1999 ; 286 : 2528-2531.
24. Shieh S.Y., Ahn J., Tamai K., Taya Y. and Prives C. The human homologs of checkpoint kinases Cbk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev.* 2000 ; 14 : 289-300.
25. Tanaka H., Arakawa H., Yamaguchi T., Shiratsuki K., Fukuda S., Matsui K., Takei Y. and Nakamura Y. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* 2000 ; 404 : 42-49.
26. Hwang B.J., Ford J.M., Hanawalt P.C. and Cbu G. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc. Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 1999 ; 96 : 424-428.
27. Taylor W.R. and Stark G.R. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001 ; 20 : 1803-1815.
28. Vogelstein B., Lane D. and Levine A.J. Surfing the p53 network. *Nature* 2000 ; 408 : 307-310.
29. Robles A.I., Bemmels N.A., Foraker A.B. and Harris C.C. APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Research* 2001 ; 61 : 6660-6664.
30. Appella E. and Anderson C.W. Signaling to p53: breaking the posttranslational modification code. *Pathol. Biol. (Paris)* 2000 ; 48:227-245.