

Classement

Cl.

Labo Ecotox

AZIEU

## P53 ET CANCER

Jérôme CACHOT  
DEL/EX NANTES

IFREMER Bibliotheque de BREST



0EL07818

Rapport CREOCEAN 1995

Contrat IFREMER 94-1-450032

# **P53 ET CANCER**

Jérôme CACHOT  
DEL/EX NANTES

Rapport CREOCEAN 1995

## SOMMAIRE

<b>Introduction</b> .....	2
<b>1 Le gène p53 et ses fonctions dans la cellule normale</b> .....	3
1-1 Structure du gène et évolution.....	3
1-2 Expression et régulation du gène .....	4
1-3 Fonctions biologiques .....	7
<b>2 Mutagenèse et cancérogenèse</b> .....	9
2-1 Les cancérogènes .....	9
2-2 Activation métabolique des procancérogènes.....	11
2-3 Bases moléculaires de la mutagenèse .....	12
2-4 Mécanisme du développement tumoral.....	14
<b>3 Inactivation du gène p53 dans les cellules tumorales</b> .....	16
3-1 Mécanismes conduisant à l'inactivation du gène .....	16
3-2 Conséquences de l'inactivation du gène.....	19
3-3 Le gène p53, un marqueur de mutagenèse?.....	20
<b>Conclusion</b> .....	23
<b>Bibliographie</b> .....	24

## INTRODUCTION

— A la fin des années 70 une protéine était coprécipitée avec l'antigène T du virus simien 40 dans des cellules transformées par ce virus (Lane & Crawford, 1979, Linzer & Levine, 1979). Cette protéine a été baptisée p53 en raison de son poids moléculaire de 53 kDa déterminé sur gel SDS-polyacrylamide. Le gène p53 n'a été découvert que quelques années plus tard dans des cellules transformées de souris (Oren & Levine, 1983).

Il fut tout d'abord assimilé à un oncogène (Jenkins & Sturzbecher, 1984a) avant d'être classé, en 1989, parmi les gènes suppresseur de tumeur (Hinds *et al.*, 1989, Finlay *et al.*, 1989). Il suscite depuis un intérêt croissant de la part de la communauté scientifique internationale. Le nombre de publications scientifiques a doublé chaque année depuis 1979 pour atteindre le chiffre de un millier en 1993 et cette même année il fut couronné "molécule de l'année" par la revue Science (Culotta & Koshland, 1993).

Ce gène a été décrit chez plus de onze espèces de Vertébrés et ses fonctions biologiques ont été partiellement élucidées. Il intervient dans des processus aussi divers que la division cellulaire, la différenciation ou l'apoptose etc. Ce gène est muté dans tous les types de cancers connus à ce jour et pratiquement un individu sur deux atteint de cancer présente une altération du gène p53 (Soussi, 1993a).

Cette étude bibliographique se propose de faire le point sur 25 ans de recherche sur le gène p53. Dans un premier temps nous nous intéresserons au gène sauvage, sa structure, son expression et ses fonctions dans la cellule normale. Puis nous rappellerons les mécanismes fondamentaux de la mutagenèse et de la cancérogenèse avant d'aborder les mécanismes conduisant à l'inactivation du gène p53 et son implication dans le développement tumoral. Dans ce dernier chapitre nous discuterons également de son utilisation comme marqueur de mutagenèse et/ou de cancérogenèse dans le cadre d'études environnementales. —

# 1 LE GENE P53 ET SES FONCTIONS DANS LA CELLULE NORMALE

## 1-1 Structure du gène et évolution

Une banque d'expression et des anticorps monoclonaux ont tout d'abord permis de séquencer le gène p53 (ADNc) chez la souris (Oren & Levine, 1983, Jenkins *et al.*, 1984). Depuis ce gène a été caractérisé chez plusieurs Mammifères dont l'homme (Matlashewski *et al.*, 1984, Harlow *et al.*, 1985), chez un Amphibien (Soussi *et al.*, 1987), chez un Oiseau (Soussi *et al.*, 1988) et chez un Poisson (Caron de Fromental *et al.*, 1992) (Tableau I). Bien qu'aucune séquence n'ait été obtenue chez la drosophile, la levure ou l'oursin (pour revue Soussi *et al.*, 1990), il semblerait que ce gène soit également présent chez les Invertébrés (Soussi, communication personnelle).

L'homme et la souris ne disposent que d'une seule copie fonctionnelle du gène par génome haploïde située sur le bras court du chromosome 17 (Benchimol *et al.*, 1985) et sur le chromosome 11 (Czosnek *et al.*, 1984) respectivement. *X. laevis* du fait de sa tétraploïdie dispose de deux gènes p53 actifs codant pour deux ARNm de 2,2 et 3,0 kb (Soussi *et al.*, 1990, Tchang *et al.*, 1993).

Quelle que soit l'espèce considérée l'organisation du gène est très proche et cinq traits dominants sont retrouvés systématiquement (Soussi *et al.*, 1990) :

- onze exons entrecoupés par neuf introns de taille variable,
- un très grand intron en 5' atteignant plus de 10 kb chez l'homme (Lamb & Crawford, 1986),
- un exon 1 non codant possédant un élément de symétrie (exception faite de *X. laevis*),
- un promoteur de transcription inhabituel. Les séquences consensus présentent chez la plupart des Eucaryotes, boîte TATA ou CAAT ou séquence riche en G/C, sont absentes,
- un second promoteur à l'extrémité 5' de l'intron 1 (Reisman *et al.*, 1988).

Tableau I : Caractéristiques du gène et de la protéine chez quelques Vertébrés

Espèce	Structure du gène connue	Taille ARNm	Taille protéine	Nombre ac.aminés	Auteur
Homme	11 exons 20 kb	2,8 kb	55 kDa	393	Matlashewski <i>et al.</i> , 1984 Harlow <i>et al.</i> , 1985
Singe	11 exons	ND	55 kDa	393	Rigaudy & Eckhart, 1989
Chat	11 exons	2,1 kb	ND	ND	Okuda <i>et al.</i> , 1994
Ecureuil	exons 2 à 10	ND	ND	ND	Rivkina <i>et al.</i> , 1994
Marmotte Amérique	exons 4 à 9	ND	ND	ND	Rivkina <i>et al.</i> , 1994
Souris	11 exons 12 kb	2,0 kb	53 kDa	390	Oren & Levine, 1983 Jenkins <i>et al.</i> , 1984
Rat	11 exons	2,0 kb	54 kDa	390	Coulier <i>et al.</i> , 1985 Soussi <i>et al.</i> , 1988a
Hamster	11 exons	2,1 kb	ND	ND	Legros <i>et al.</i> , 1992
Poulet	11 exons	1,8 kb	ND	367	Soussi <i>et al.</i> , 1988b
Xénope	11 exons 18 kb	2,2 et 3,0 kb	46 kDa	363	Soussi <i>et al.</i> , 1987
Truite Arc- en-ciel	11 exons	2,4 kb	55 kDa	396	Caron de Fromentel <i>et al.</i> , 1992

ND : non déterminé

## 1-2 Expression et régulation du gène

Le gène p53 est transcrit en un ARN messager dont la taille varie de 2 à 3 kb selon l'espèce considérée (Soussi *et al.*, 1990). Ces ARNm ont en commun de posséder une longue extrémité 3' non traduite qui interviendrait dans la stabilisation de la molécule (Harlow *et al.*, 1985). Des épissages alternatifs sont parfois observés chez l'homme et la souris (Arai *et al.*, 1986).

L'expression du gène p53 est contrôlée par deux promoteurs de forces différentes. Le premier, P1, est situé entre 100 et 250 paires de bases en amont du premier exon et le second, P2, plus fort, est situé à l'extrémité 5' de l'intron 1 (Reisman *et al.*, 1988). Ces promoteurs contiennent d'une part un site de fixation pour le Facteur Nucléaire 1 (NF1) et d'autre part un second site de fixation pour un facteur d'induction du sérum (Ginsberg *et al.*, 1990). En outre ils possèdent une séquence consensus de reconnaissance pour des activateurs transcriptionnels de la famille myc/myo D (Ronen *et al.*, 1991). La présence de ces deux promoteurs et des introns dans leur position correcte sont absolument nécessaires à l'expression normale du gène p53 (Montenarh, 1992).

Le produit du gène p53 est une phosphoprotéine nucléaire de 53 kDa. La structure primaire de la protéine est proche d'une espèce à l'autre (Tableau II) et l'on retrouve chez tous les Vertébrés étudiés cinq domaines hautement conservés (HCD I à V) où le pourcentage d'homologies atteint 90 à 100%. Ces domaines correspondent aux acides aminés 117 à 142, 171 à 181, 234 à 258 et 270 à 286 (Soussi *et al.*, 1987, Soussi *et al.*, 1990). Leur forte conservation à travers l'évolution est probablement liée à leur importance fonctionnelle dans la protéine (Soussi *et al.*, 1990).

Tableau II : Homologies de divers séquences p53 par rapport à celle de truite (Genbank)

Espèce	Homologie des séquences nucléiques (ADNc) en %	Homologie des séquences protéiques en %
Truite Arc-en-ciel	100	100
Hamster	58	66
Rat	59	65
Souris	58	63
Homme	58	68

La séquence primaire de la protéine peut être divisée en trois domaines distincts (pour revue Levine, 1990) :

- une région N-terminale (1-75 acides aminés) en hélice alpha, acide, hautement chargée,
- une région hydrophobe (75-150 acides aminés) riche en prolines,
- une région C-terminale (276-390 acides aminés) en hélice tour d'hélice, basique, hautement chargée.

Cette protéine comporte en outre plusieurs signaux de localisation nucléaire (NLS) situés à son extrémité C-terminale (Dang & Lee, 1989), qui interviennent dans sa relocalisation nucléaire au cours de la phase S du cycle cellulaire (Shaulsky *et al.*, 1990).

La protéine p53 se trouve fréquemment associée sous forme de complexe homologue de haut poids moléculaire (Kraiss *et al.*, 1988). L'auto agrégation de la p53 est très rapide et conduit à la formation d'un complexe très stable (Kraiss *et al.*, 1992) d'homotétramères et de multiples de tétramères (Stenger *et al.*, 1992). Les séquences C-terminales des chaînes polypeptidiques interviennent dans la formation de ce complexe oligomérique (Milner *et al.*, 1991). Elle forme également des complexes hétérologues avec des protéines virales tels le grand antigène T du SV40 (Lane & Crawford, 1979, Fanning *et al.*, 1981), la protéine E1b de l'adenovirus type 5 (Sarnow *et al.*, 1982), la protéine E6 des papilloma virus humains HPV16 et HPV18 (Werness *et al.*, 1990) etc. et avec des protéines cellulaires telle MDM2 (Momand *et al.*, 1992).

On la retrouve également associée à divers kinases, caséine kinase II (Herrmann *et al.*, 1991) et p34<sup>cdc2</sup> (Sturzbecher *et al.*, 1990) etc. qui régulent sa phosphorylation au cours du cycle cellulaire. Pendant la phase S/G2 la phosphorylation de la p53 est maximale (Bischoff *et al.*, 1990) et c'est durant cette même phase que la kinase p34<sup>cdc2</sup> est la plus active (Sturzbecher *et al.*, 1990). Il a été suggéré que son hypophosphorylation pourrait contrôler l'entrée de la cellule en division (Diller *et al.*, 1991).

Bien que ce soit une protéine cellulaire, elle est immunogène et peut induire la production d'anticorps spécifiques (DeLeo *et al.*, 1979). Nombre d'anticorps anti-p53 monoclonaux ou polyclonaux sont connus à ce jour indiquant l'existence de plusieurs variants immunologiques (pour revue Montenarh, 1992). Certains présentent une spécificité d'espèce très étroite reconnaissant une seule protéine p53 (H279, H447, etc.) alors que d'autres tel HT216 possèdent un spectre beaucoup plus large (pour revue Legros *et al.*, 1993). En outre certains anticorps sont capables de discriminer la protéine native (PAb 1101, PAb 246, etc.) et la protéine mutée (PAb 240).

Le gène p53 est exprimé dans toutes les cellules normales, mais à un niveau faible et variable selon le tissu et le taux de division cellulaire. La protéine est presque indétectable dans les cellules normales du fait de sa faible synthèse et de sa demi-vie extrêmement courte, de l'ordre de 20 à 30 minutes (Reich & Levine, 1984). Son expression est régulée à la fois au niveau transcriptionnel et traductionnel.

Chez la souris adulte, la rate présente un taux d'ARNm p53 significativement plus élevé que le foie et le rein. Des taux relativement élevés sont retrouvés également dans les poumons,



qui contiennent un grand nombre de cellules lymphoïdes, et dans les organes sexuels dont les cellules subissent de nombreuses divisions (Rogel *et al.*, 1985). Il semblerait que cette expression tissu-spécifique puisse être régulée au niveau post-transcriptionnel par les séquences introniques et plus particulièrement par l'intron 4 (Lozano & Levine, 1991).

Des niveaux élevés de protéine et d'ARNm p53 sont détectés dans les cellules se divisant activement en culture primaire ainsi que dans les tissus d'embryons âgés de 9 à 11 jours (Rogel *et al.*, 1985). En revanche lors de la différenciation cellulaire *in vitro* (Oren *et al.*, 1982) et à partir du 11<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire (Rogel *et al.*, 1985) ces niveaux décroissent de façon significative. Cette régulation serait là encore de type post-transcriptionnel (Louis *et al.*, 1988).

En outre cette expression est régulée spatialement et temporellement au cours du cycle cellulaire (Shaulsky *et al.*, 1990). Le marquage par immunofluorescence de cellules 3T3 quiescentes par des anticorps anti-p53 a révélé une très faible coloration localisée dans le compartiment cytoplasmique (Shaulsky *et al.*, 1990). Lorsqu'on stimule ces mêmes cellules par du sérum, le taux de protéine p53 croît après 6 à 7 heures pour atteindre des niveaux 10 à 20 fois supérieurs en début de phase S (Reich & Levine, 1984). Cette augmentation aurait pour origine une synthèse accrue d'ARNm et de protéine et non pas une stabilisation de la protéine car sa demi-vie reste inchangée (Reich & Levine, 1984). Cette surexpression s'accompagne également d'une relocalisation cellulaire de la p53. En effet, en phase G1 la p53 est localisée exclusivement dans le cytoplasme puis migre en début de phase S dans le noyau où elle s'accumule durant environ 3 heures avant de réintégrer le cytoplasme (Shaulsky *et al.*, 1990).

### **1-3 Fonctions biologiques**

Bien que le gène p53 fasse l'objet de recherches intensives depuis près de 15 ans des incertitudes subsistent quant à ses fonctions exactes dans la cellule. Néanmoins on peut dire sans se tromper, qu'il exerce de multiples fonctions qui concourent à la régulation du cycle cellulaire.

La protéine p53 interviendrait dans le contrôle de la réplication. L'introduction d'anticorps anti-p53 (Mercer *et al.*, 1982) ou d'ARN p53 antisens (Shohat *et al.*, 1987) dans des cellules en croissance bloque la synthèse d'ADN. La réintroduction de la p53 sauvage dans des cellules d'ostéosarcome ou des tumeurs colorectales déficientes rétablit le contrôle du cycle cellulaire et supprime la tumorigénicité (Diller *et al.*, 1990). En outre des études ont montré l'interaction spécifique de la protéine p53 sur l'ADN *in vitro* et au niveau de complexes de réplication *in vivo* (Wilcock & Lane, 1991). Cette protéine est également impliquée dans le

contrôle de la mort cellulaire programmée ou apoptose et dans la différenciation cellulaire, fonctions intimement liées au contrôle de la prolifération cellulaire (pour revue White, 1994, Radinsky *et al.*, 1994). Ainsi la transfection de la p53 dans les cellules malignes SAOS-LM2 (Radinsky *et al.*, 1994) ou dans les cellules L12 pre-B (Shaulsky *et al.*, 1991) induit leur différenciation et/ou leur apoptose. Le gène p53 semble intervenir en régulant l'expression d'un ensemble de gènes impliqués directement dans ces deux processus (pour revue Hoffman & Liebermann, 1994).

White a récemment proposé un modèle de contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose (White, 1994). Dans ce modèle les deux gènes suppresseur de tumeur p53 et Rb répriment la synthèse d'ADN soit en activant le gène WAF1, inhibiteur de plusieurs kinases cycle cellulaire dépendantes (CdkI), soit en réprimant le facteur de transcription E2F respectivement. En revanche, seul p53 semble induire l'apoptose puisque l'inactivation du gène Rb conduit à une réponse apoptotique dans les cellules du cristallin lorsque le gène p53 est fonctionnel (figure 1).

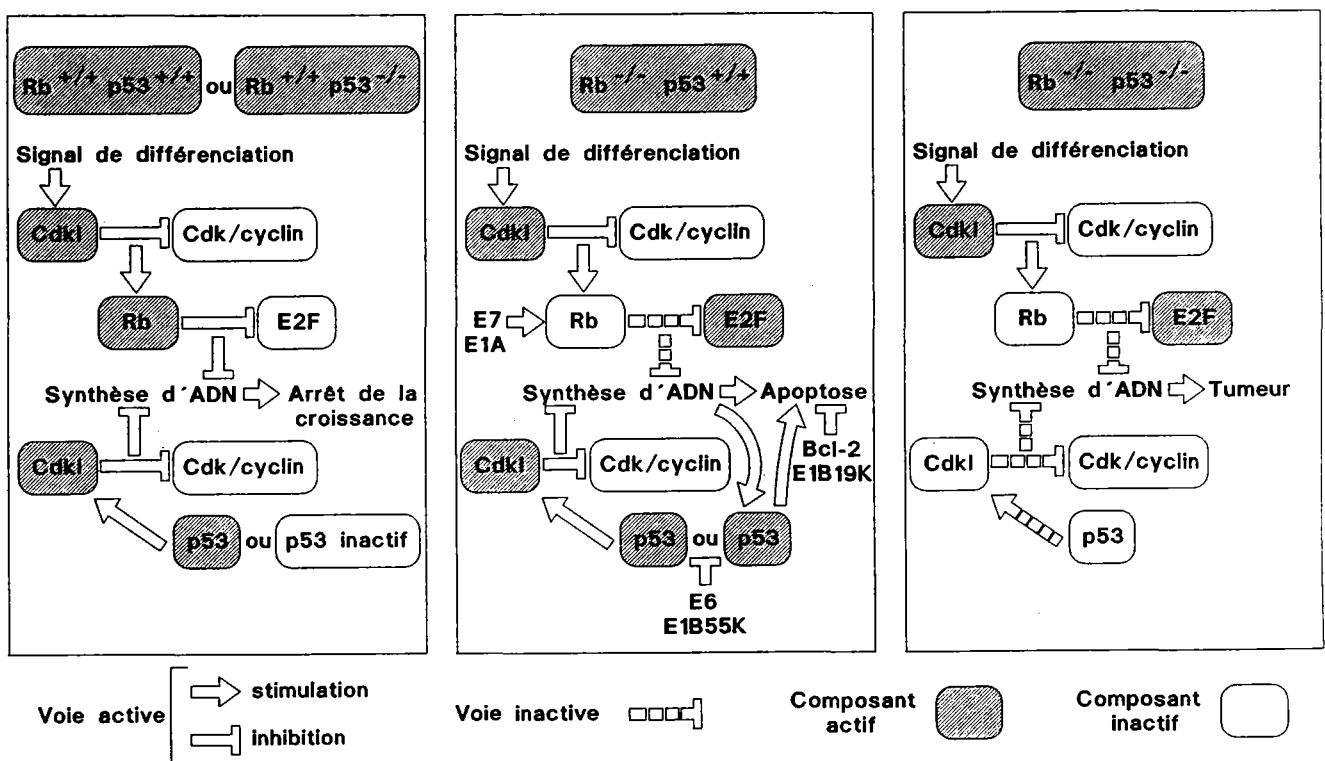


figure 1 : Mécanisme de contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose par les gènes suppresseur de tumeur p53 et Rb (White, 1994)

Une des fonctions majeurs de la p53 est celle de régulateur de la transcription. Une séquence d'activation de transcription a été mise en évidence à l'extrémité N-terminale de cette protéine (Fields & Jang, 1990) et plus précisément entre les codons 20 et 42 (Unger *et al.*, 1992). En outre la p53 est capable de se fixer à l'ADN par son extrémité C-terminale (Kern *et al.*, 1991b, Foord *et al.*, 1991). La p53 reconnaît sur cet ADN un site de fixation constitué de deux copies d'un même motif de 10 pb 5'-PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy-3' séparées par au moins 13 pb (El-Deiry *et al.*, 1992). La fixation de la p53 sauvage sur un tel site en amont d'un gène active sa transcription aussi bien *in vitro* (Farmer *et al.*, 1992) que *in vivo* (Kern *et al.*, 1992). Cette séquence spécifique a été identifiée en amont de nombreux gènes incluant la créatine kinase du muscle, GADD45, MDM2, WAF1, etc. (pour revue El-Deiry *et al.*, 1993). Ces gènes pourraient être impliqués dans l'activité suppresseur de tumeur du gène p53 (Vogelstein & Kinzler, 1992), ce que semblent confirmer les travaux récents de El-Deiry et col. sur le gène WAF1 (El-Deiry *et al.*, 1993). Mais la p53 est également capable de réprimer la transcription de plusieurs gènes tels c-fos, interleukine 6, Rb, etc. et des gènes viraux (pour revue Sang *et al.*, 1994). Cette répression semble s'opérer par fixation de la p53 sauvage sur la TBP (TATA binding protein) empêchant ainsi la formation du complexe d'initiation (Seto *et al.*, 1992).

Elle garantirait enfin l'intégrité du génome (pour revue Lane, 1992). Ainsi l'irradiation de cellules par un rayonnement ultraviolet (Maltzman & Czyzyk, 1984) ou gamma (Kastan *et al.*, 1991) induit une stabilisation et une accumulation de la protéine p53 dans les cellules où l'ADN est endommagé. Elle activerait alors la transcription de gènes de contrôle de la croissance cellulaire tel GADD 45 ayant pour effet de bloquer temporairement le cycle cellulaire en phase G1 (Kastan *et al.*, 1992). Ce blocage doit permettre l'intervention des systèmes de réparation de l'ADN (SOS, etc.) avant toute nouvelle réplication. En revanche aucun arrêt de la division cellulaire n'est observé si les cellules expriment une p53 mutée (Kastan *et al.*, 1991). L'intégrité génétique de la cellule n'étant plus assurée, le génome moins stable accumule des mutations qui pourront conduire au développement tumoral (Soussi, 1993).

## **2 MUTAGENÈSE ET CANCEROGENÈSE**

### **2-1 Les agents cancérigènes**

Ce sont des agents qui provoquent des lésions spécifiques, stables et transmissibles de l'ADN qui peuvent aboutir au développement d'un cancer. Ils peuvent être de trois types :

physique, chimique ou viral. Nous nous intéresserons principalement aux cancérigènes chimiques.

Une étude du Centre International de Recherche sur le Cancer à Lyon réactualisée en mars 1994 dresse une liste des cancérigènes pour l'homme (IARC, 1993). Cette liste non exhaustive fait état de plus d'une centaines de cancérigènes probables.

Les cancérigènes physiques concernent principalement les radiations ionisantes ultraviolets, rayons X et gamma. Ils provoquent des coupures simple brin ou double brin de l'ADN (Biaglow, 1981). Les UV peuvent induire des pontages entre deux pyrimidines adjacentes à l'origine des transitions en tandem CC vers TT fréquentes dans les tumeurs de la peau (pour revue Dumaz *et al.*, 1994)

Les virus oncogènes sont également des agents cancérigènes potentiels car en s'intégrant au hasard dans le génome de l'hôte ou en modifiant l'expression d'oncogènes ou d'anti-oncogènes, ils peuvent induire la cancérisation. Les Rétrovirus, le virus de l'hépatite B, les Adénovirus, les Papovirus (SV40) etc. ont un pouvoir transformant et/ou immortalisant.

Les cancérigènes chimiques sont de loin les plus nombreux et les plus diversifiés. Ils recouvrent une large gamme de composés, des métaux (Ni, Cr, Cd, etc.) et des molécules organiques (Benzo(a)pyrène, Benzène, etc.) naturels (aflatoxine, oestrogènes, etc.) ou issus des activités humaines (Bromure de vinyle, etc.). Ces cancérigènes chimiques ne présentent peu ou pas de parenté de structure moléculaire mais possèdent tous en revanche une forte affinité pour les sites nucléophiles (Miller, 1970, Miller, 1978). Cette électrophilie explique en particulier leur propension à former des liaisons covalentes avec les bases puriques ou pyrimidiques des acides nucléiques avec pour résultat la formation d'adduits.

Les ions carbonium ( $-C^+=$ ) et nitrenium ( $-N^+-$ ) sont parmi les électrophiles les plus fréquemment rencontrés. Les nucléophiles cellulaires sont pour l'essentiel les résidus soufrés des acides aminés, les azotes à caractères aromatiques, certains atomes de carbone des bases nucléiques et des acides aminés et les atomes de carbone de type hydroxyle ou carbonyle (Courtois, 1994).

Certaines molécules (Halogénures d'alkyle, Nitrosamides, etc.) sont capables d'interagir avec l'ADN sous leur forme native, on parle alors de cancérigènes directs. Ce sont en général des composés hautement réactifs mais peu rémanents.

Les cancérigènes indirects ou procancérigènes (Nitrosamines, Amines aromatiques, Hydrocarbures aromatiques, etc.) sont présents de façon stable dans l'environnement et nécessitent une activation métabolique (Miller et Miller, 1977) pour exprimer leur

génotoxicité. C'est au cours des processus de détoxification et plus particulièrement pendant la phase I, que certains intermédiaires électrophiles sont produits.

Il existe enfin des molécules très peu cancérigènes par elles-mêmes mais capables d'amplifier l'effet d'un procancérigène, on parle dans ce cas de cocancérigènes.

## **2-2 Activation métabolique des procancérigènes**

Les cancérigènes comme tous les xénobiotiques introduits dans l'organisme subissent, principalement au niveau du foie et des poumons, des transformations enzymatiques en vue de leur détoxification et de leur excrétion. Ce processus comporte deux étapes successives. La phase I fait intervenir des monooxygénases et des réductases qui catalysent la fonctionnalisation de groupements fonctionnels. La phase II met en jeu des enzymes de conjugaison (sulfotransférase, glucuronyltransférases, etc.) qui vont permettre de greffer des composés hydrophiles endogènes (acide glucuronique, glutathion, etc.) ou des groupements polaires (acétyle, sulfo, etc.) sur la molécule initiale ou les métabolites issus de la phase I. Ce processus conduit généralement à la formation d'un composé hydrosoluble éliminé dans l'urine ou la bile.

Cependant une fraction des intermédiaires électrophiles et radicaux libres produits au cours de la phase I peut échapper à la phase de conjugaison. En outre des métabolites plus toxiques que la molécule de départ peuvent être libérés à l'issue de la phase de conjugaison. On parle alors d'activation métabolique des procancérigènes (Miller & Miller, 1977) (figure 2). Parmi les nombreuses voies de bioactivation des procancérigènes, les réactions d'oxydation impliquant les monooxygénases à cytochrome P450 et les monooxygénases à flavine sont prépondérantes (Mayes, 1985). Ce processus a été mis en évidence chez de nombreux poissons (Lech & Vodcnick, 1981)

Ces entités électrophiles très réactives vont pouvoir se lier aux nucléophiles cellulaires (acides nucléiques, protéines, etc.) et former des adduits.

Il faut noter ici qu'il existe des différences individuelles de sensibilité aux cancérigènes. Elles sont le reflet d'une part d'un polymorphisme génétique (variation dans l'expression et l'activité des enzymes de détoxification) et d'autre part de l'influence de facteurs physiologiques et environnementaux.

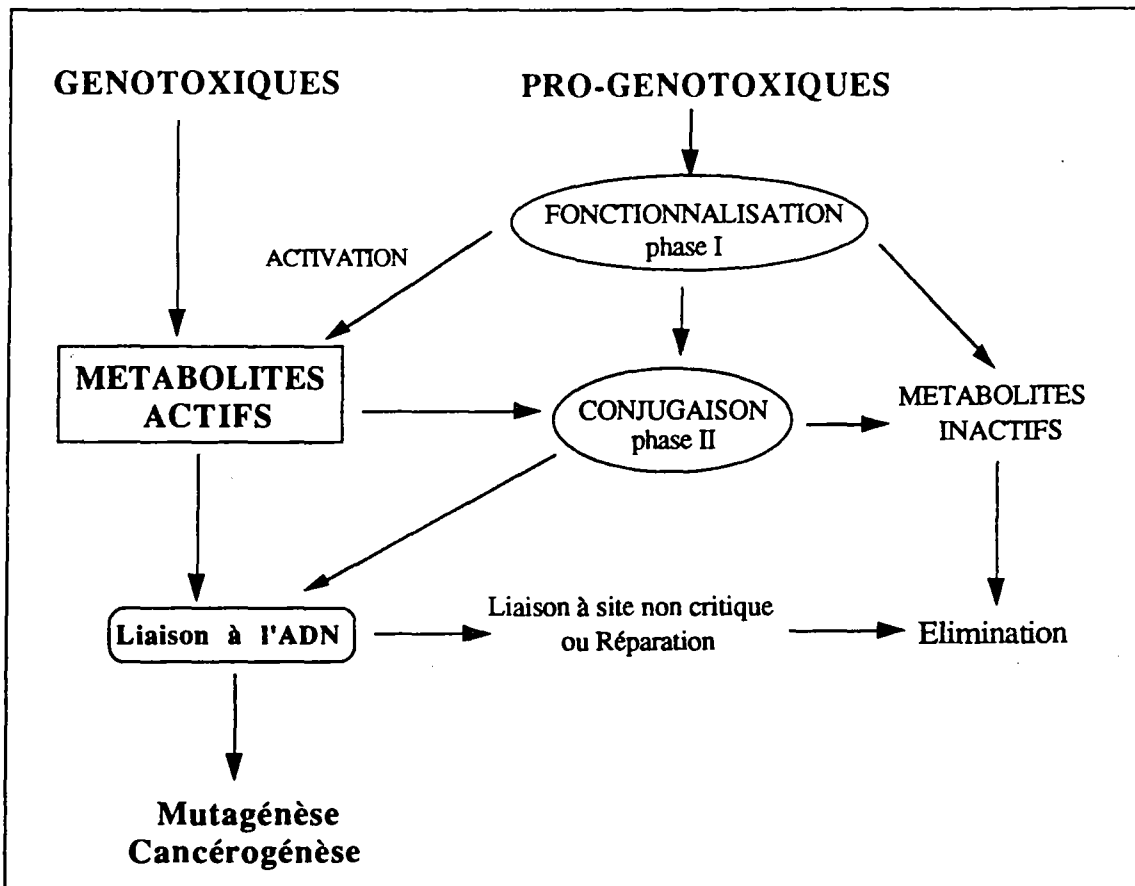


figure 2 : Schéma général de l'activation des agents génotoxiques (Courtois, 1994)

### 2-3 Bases moléculaires de la mutagenèse

L'exposition de cellules à une dose suffisante de génotoxique (au moins égale à la dose efficace) peut conduire à la formation d'adduits à l'origine de lésions génétiques (cassure d'un brin, création de liaison covalentes intra ou interbrin, modification chimique d'une ou plusieurs bases, etc.). La grande majorité de ces lésions ne persiste pas dans la cellule du fait de la mise en oeuvre des mécanismes de réparation.

Les mécanismes conservatifs de réparation sont constitutifs de toute cellule, ils permettent de réparer l'ADN lésé avec une grande fidélité. Le système d'excision-resynthèse est prédominant, il intervient dans plus de 85% des réparations. Ce système met en jeu divers enzymes : des endonucléase et exonucléase qui vont couper et exciser le fragment d'ADN altéré puis une ADN polymérase qui resynthétisera le morceau manquant et enfin une ligase pour rétablir la liaison phosphodiester en 3' du fragment néosynthétisé. Le système de réplication post-répliatif permet également, par recombinaison entre deux chromosomes homologues, de restaurer l'intégrité du génome.

Les mécanismes fautifs sont des systèmes de réparation d'urgence qui privilégient la survie cellulaire au détriment de la fidélité de l'information génétique. L'induction de ces systèmes peut donc introduire ou fixer des mutations.

Il faut noter que ces systèmes interviennent en priorité sur le brin informatif et plus précisément au niveau des gènes actifs de la cellule ce qui explique que le brin non transcrit soit plus fréquemment muté (Mellon *et al.*, 1987).

Si ces lésions génétiques (non létales) ne sont pas réparées, elles sont fixées dans le génome lors de la réplication et sont transmises aux cellules filles, on parle alors de mutations.

Les agents cancérigènes peuvent induire deux grands types de mutations :

#### *les mutations géniques*

Elles affectent la structure ou l'expression d'un gène. Ce sont des microlésions qui correspondent à la substitution de paire(s) de bases (mutation faux sens ou non sens) ou au décalage du cadre de lecture par addition ou suppression de paire(s) de bases (mutation frame-shift). Il peut en résulter un changement d'acide aminé dans la protéine correspondante, la synthèse d'une protéine tronquée ou l'absence de son expression. Cependant elles peuvent n'avoir aucun effet si elles affectent la dernière base du codon ou les séquences introniques (mutation silencieuse). Ces mutations ponctuelles sont considérées comme les causes les plus fréquentes des maladies génétiques (Kaplan & Delpech, 1992).

#### *Les mutations chromosomiques*

Elles sont de deux ordres, des aberrations de structure ou des aberrations de nombre. Ce sont des macrolésions qui résultent de l'excision (délétion) ou de la duplication d'un segment

plus ou moins long d'ADN, de l'amplification de séquences normalement uniques, de la fusion ou de l'inversion de gènes. En règle générale ces aberrations résultent d'accidents de recombinaison méiotique ou d'une malségrégation chromosomique et peuvent être détectées par l'analyse des chromosomes métaphasiques.

## **2-4 Mécanisme du développement tumoral**

Une cellule cancéreuse est une cellule qui a définitivement échappé aux mécanismes de contrôle de la division cellulaire et qui, par expansion clonale va se multiplier de façon anarchique. La cancérogenèse correspond à l'enchaînement des événements qui vont conduire la cellule normale vers l'état cancéreux. C'est un processus multiphasique, multifactoriel et multifactuel.

Berenblum et Shubik (1947) sont les premiers à avoir proposé un modèle pour le processus de cancérogenèse. Il a depuis été affiné et validé pour de nombreuses espèces et la quasi totalité des tissus. Il comporte quatre étapes (figure 3) :

### *phase d'initiation*

Elle correspond à l'introduction dans l'ADN de lésion(s) spécifique(s), stable(s) et transmissibles. Ces lésions peuvent résulter d'événements spontanés ou de l'exposition à une ou plusieurs doses de composés génotoxiques. Ces lésions non réparées et fixées par deux cycles de réplication donnent naissance à des mutations qui font passer la cellule d'un état normal à un état initié.

### *phase de promotion*

Sous l'action de doses répétées d'un promoteur tumoral, une cellule initiée peut évoluer vers un état néoplasique. Cette étape est longue et réversible, elle se traduit par l'apparition d'hyperplasies puis par des lésions précancéreuses.

Les promoteurs tumoraux sont des agents non génotoxiques mais qui déclenchent une pluralité d'effets cellulaires épigénétiques (stimulation de l'activité mitotique, inhibition de la communication cellulaire modulation de l'expression de gènes etc.) aboutissant à l'expansion clonale des cellules initiées. Ce sont des substances naturelles (esters de phorbol, acide okadaïque, etc.) ou des xénobiotiques (PCB, dioxine, etc.) appartenant à des familles chimiques variées. Leurs effets sont réversibles, dose-dépendants et tissu-spécifiques. En outre certains promoteurs tumoraux comme le phénobarbital ou le DDT



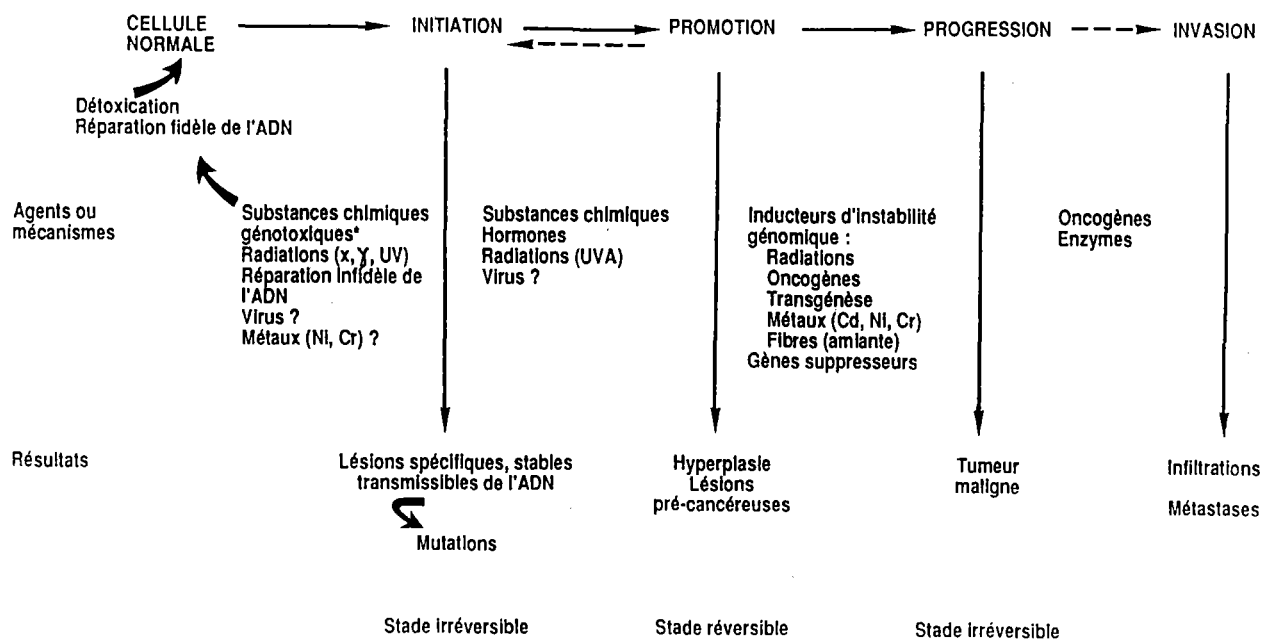
administrés à forte dose et à long terme induisent à eux seuls des hépatocarcinomes chez le rat.

*phase de progression*

L'apparition de nouvelles anomalies génétiques telles que translocation, recombinaison infidèle, amplification et surexpression génique, etc. confère aux cellules néoplasiques une instabilité caryotypique (Solomon *et al.*, 1991) qui conduit à l'émergence et à la croissance d'une tumeur maligne. Au terme de cette évolution irréversible, la cellule régule sa croissance de façon autonome. L'inactivation ou la perte des deux copies d'un gène suppresseur de tumeur (p53, Rb, etc.) et/ou l'amplification ou l'hyperactivation de l'une ou des deux copies d'un proto-oncogène (*ras*, *myc*, etc.) sont des événements fréquents durant cette phase.

*phase d'invasion*

Dans un premier temps les cellules tumorales vont infiltrer les tissus avoisinants entraînant un bouleversement de leur architecture tissulaire. Puis ces cellules vont migrer via la voie sanguine ou lymphatique vers différents organes où elles se fixent et développent des métastases (Boyer *et al.*, 1990).



\* Substances chimiques directement actives après métabolisation

figure 3 : Schéma opérationnel du processus de cancérogenèse (Courtois *et al.*, 1994)

### 3 INACTIVATION DU GENE P53 ET CANCER

#### 3-1 Mécanismes conduisant à l'inactivation du gène

L'inactivation du gène p53 est l'événement génétique connu le plus fréquent en cancérologie humaine (Vogelstein, 1990). Une étude récente a recensé plus de 2500 mutations différentes dans plus de 50 types de tumeurs humaines (Hollstein *et al.*, 1994). Ces altérations sont retrouvées dans 40 à 45% de la population totale de tous les cancers humains (Caron de Fromental & Soussi, 1992), mais leur fréquence est variable selon le type de cancer (Tableau III). Ainsi les carcinomes du poumon, du colon et de la vessie présentent dans plus de 60% des cas une mutation au niveau de ce gène alors que cette fréquence est inférieure à 10% dans les leucémies ou le cancer de la prostate (Soussi, 1993). Elle varie également selon la zone géographique et l'état de développement du cancer. Dans les tumeurs du poumon, de l'oesophage, de la peau, etc. ces mutations apparaissent dès les premiers stades du développement tumoral. Chez les patients atteints de tumeur du sein ou du poumon elles sont généralement associées à un pronostic défavorable et à un taux plus faible de survie (Harris & Hollstein, 1993).

Tableau III : Taux de mutations du gène p53 dans les 12 cancers les plus répandus dans le monde (Soussi, 1993)

Type de cancer	Classement dans le monde	Fréquence des altérations du gène p53 (%)
estomac	1	45
poumon	2	68
sein	3	40
côlon	4	65
col de l'utérus	5	20
nasopharynx	6	?
oesophage	7	44
foie	8	25
lymphome	9	30
prostate	10	?
vessie	11	61
leucémie	12	10

Différents types de mutations peuvent affecter le gène p53 (pour revue Soussi *et al.*, 1994). Dans 80 à 90% des cas ce sont des mutations ponctuelles qui correspondent à la substitution d'une base par une autre (mutation faux sens). Ces mutations peuvent également affecter, mais dans une moindre mesure, un codon stop (mutation non sens) ou un site intronique d'épissage ou encore décaler le cadre de lecture par insertion ou délétion de paires de bases (mutation frame-shift). En outre dans les tumeurs humaines ces mutations sont fréquemment associées à une perte du bras court du chromosome 17 (LOH 17p) qui conduit à l'inactivation des deux copies du gène (Nigro *et al.*, 1989).

Ces mutations ponctuelles ne sont pas distribuées au hasard, mais regroupées principalement au niveau de quatre "Hot Spot Regions" (Nigro *et al.*, 1989) qui coïncident aux quatre domaines hautement conservés (II à V) du gène (Soussi *et al.*, 1990) (figure 4). A l'intérieur de ces sites, trois codons correspondant aux acides aminés Arg<sup>175</sup>, Arg<sup>248</sup> et Arg<sup>273</sup> regroupent à eux seuls 30% des mutations (Levine *et al.*, 1991, Hollstein *et al.*, 1991). La grande majorité des substitutions (près de 90%) affecte des acides aminés conservés de la truite à l'homme (Hollstein *et al.*, 1991). Cependant la plupart des analyses sont menées exclusivement sur les exons 5 à 8 et ne tiennent pas compte des mutations situées en dehors de cette région qui pourraient s'élever à près de 10% (Soussi *et al.*, 1994).

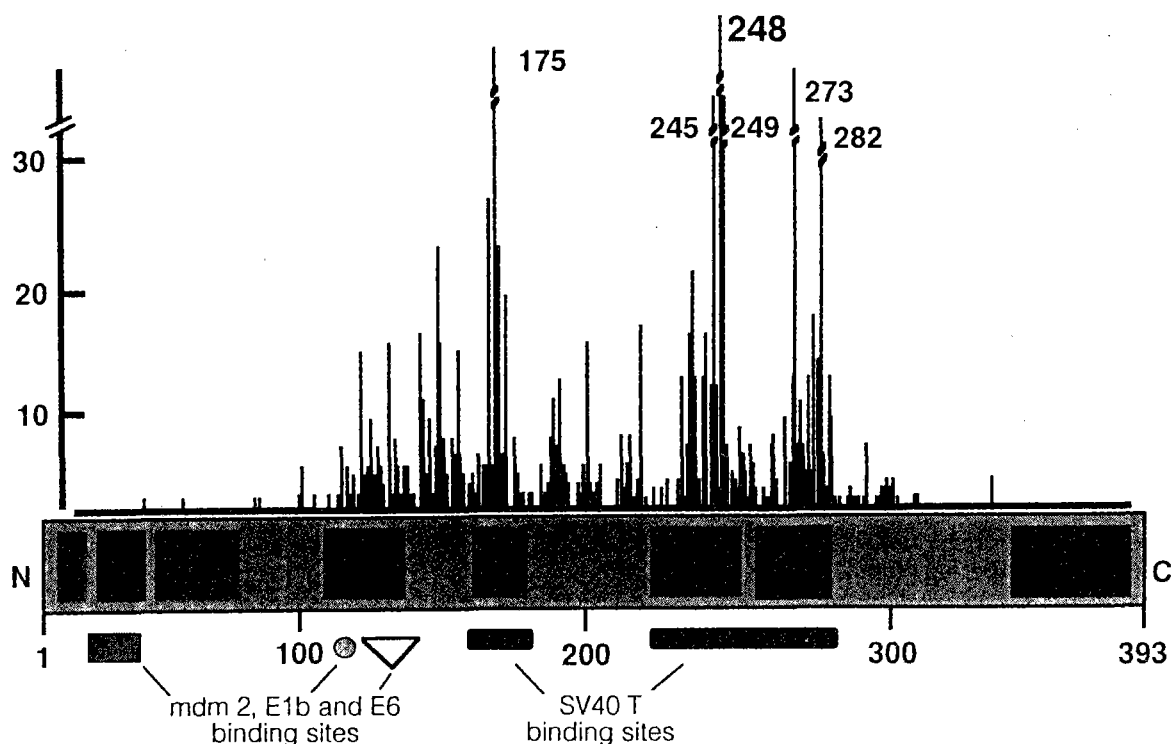


figure 4 : Localisation et fréquence des mutations sur la protéine p53 humaine (Harris, 1993)

Le spectre de mutations varie selon le type de cancer (Tableau IV). Ainsi les transversions G vers T sont les substitutions les plus fréquemment observées dans les cancers du poumon et du foie alors que les transitions prédominent dans les cancers du colon, du cerveau et les lymphomes. Dans les carcinomes colorectal, les tumeurs du cerveau, les leucémies et les lymphomes la majorité des transitions affectent les dinucléotides CpG. Ces transitions au niveau des dinucléotides CpG représentent un quart des mutations du gène p53 et pourraient intervenir spontanément par déamination des 5-méthylcytosine. Dans les cas d'hépatocarcinomes (HCC) chez des patients exposés à l'Aflatoxine B1 ou au virus de l'hépatite B les transversions G vers T apparaissent prioritairement au codon 249. Dans le cas des cancers cutanés la majorité des substitutions correspondent à des transitions en tandem au niveau des paires de base G:C qui sont probablement la conséquence d'une exposition prolongée aux ultraviolets. Enfin dans le cancer du poumon on observe une prédominance des transversions G vers T. Ces événements très rares naturellement pourraient être induits par le Benzo(a)pyrène présent dans la fumée de cigarette comme semblent le montrer les études *in vitro* (pour revue Hollstein *et al.*, 1991, Harris, 1993, Hollstein *et al.*, 1994).

Tableau IV : Evénements mutationnels associés à divers cancers humains (Soussi, 1993)

Type de cancer	Evénement mutationnel majoritaire	Agent incriminé
cancer colorectal	G vers A ou C vers T	mutation naturelle
cancer du sein	G vers A ou C vers T	mutation naturelle
hémopathie maligne	G vers A ou C vers T	mutation naturelle
cancer bronchique	G vers T	benzo(a)pyrène
cancer spinocellulaire	C vers T ou CC vers TT	ultraviolets
hépatocarcinome	G vers T (codon 249)	aflatoxine B1
cancer gastrique	G vers A localisation inhabituelle	?

Ces différences sont la conséquence de la double contribution des facteurs étiologiques endogènes et exogènes dans le processus de cancérogenèse. Il a été montré en effet que les agents mutagènes pouvaient générer des mutations spécifiques au niveau de sites privilégiés (Miller, 1983) qui constitueraient l'empreinte du mutagène (Hollstein *et al.*, 1994).

La grande majorité des mutations du gène p53 rencontrées dans les tumeurs humaines correspond à des mutations somatiques acquises. Cependant chez les patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni qui se manifeste par une très forte incidence de cancer, la lignée germinale est mutée (Malkin & Friend, 1992).

L'inactivation du gène p53 peut également procéder de la fixation d'oncoprotéines virales (antigène T du SV40, protéine E6 du HPV, etc.) ou cellulaires tel MDM2 (pour revue Vogelstein & Kinzler, 1992).

### **3-2 Conséquences de l'altération du gène**

Il faut tout d'abord préciser d'une part que les propriétés de la protéine mutante sont fonctions du type et de la localisation des mutations sur le gène (Hinds et al, 1990, Halevy *et al.*, 1990) et d'autre part que la perte de la fonction suppresseur de tumeur nécessite en général l'inactivation des deux allèles du gène p53 (Marshall, 1991).

L'apparition d'une mutation ou l'association à une oncoprotéine virale conduit généralement à la modification de la structure quaternaire de la p53 et à l'apparition de nouveaux épitopes conformationnels (pour revue Vogelstein & Kinzler, 1992). Ces modifications conformationnelles aboutissent à la stabilisation de la protéine et donc à l'allongement de sa demi-vie de 20-30 minutes à plusieurs heures (Lane & Benchimol, 1990). La conséquence première est l'augmentation très nette (5 à 100 fois) de la quantité de protéine p53 dans les tumeurs ou les lignées cellulaires transformées (Linzer & Levine, 1979) et son accumulation principalement nucléaire.

Ces p53 mutées perdent la capacité de s'associer à l'antigène T du SV40 mais acquièrent, en revanche, celle de se lier à des protéines de choc thermique du type hsc70 (Pinhasi-Kimhi *et al.*, 1986).

La plupart des mutations affectant un des quatre domaines hautement conservés du gène conduit à l'impossibilité de la protéine mutante de se fixer sur des séquences spécifiques de l'ADN et d'activer la transcription des gènes adjacents (Kern *et al.*, 1992). En outre certaines p53 mutées peuvent exercer un effet négatif dominant (Eliyahu *et al.*, 1989) en s'associant aux protéines sauvages (Milner & Medcalf, 1991) et en inhibant leur fonction de régulateur de transcription (Kern *et al.*, 1992). Cette perte de fonction se traduit par la perte de l'activité suppresseur de tumeur de la protéine.

Enfin certaines formes mutantes peuvent fonctionner comme de véritables oncogènes et stimuler la division et la transformation cellulaire (Levine *et al.*, 1991, Rotter & Prokocimer, 1991). Ainsi le mutant Arg<sup>175</sup> est capable de coopérer avec l'oncogène *ras* pour transformer des cellules de rat en culture primaire (Halevy *et al.*, 1990).

Par ailleurs l'inactivation du gène p53 conduit à une grande instabilité génétique qui rend les cellules plus sensibles aux effets des agents mutagènes (Lane, 1992). Des souris transgéniques ne possédant pas de p53 se développent normalement, mais avec une très forte incidence de cancer (Donehower *et al.*, 1992).

### 3-3 Le gène p53, un marqueur de mutagenèse?

L'étude des effets génotoxiques des polluants en milieu marin est une préoccupation récente (Vincent, 1995). Ces études sont rendues nécessaires d'une part par la présence de nombreux agents mutagènes et cancérigènes (PCB, PAH, pesticides, métaux, virus, etc.) et d'autre part par l'observation de cancers chez les poissons et les mollusques (pour revue Mix, 1986).

Ces études de génotoxicité ont un double objectif :

- évaluer le risque génotoxique associé à l'environnement. Les tests de mutagenèse à court terme et plus particulièrement le test d'Ames sont couramment utilisés pour évaluer le pouvoir mutagène d'un xénobiotique particulier, d'un échantillon d'eau ou d'un sédiment (Ames *et al.*, 1975, Hashizune *et al.*, 1992),

- et rechercher la présence éventuelle de mutations géniques ou chromosomiques sur des organismes cibles prélevés *in situ*.

Les micronoyaux sont des aberrations chromosomiques résultant de l'action d'un agent clastogène sur l'ADN. La recherche de ces micronoyaux a donné lieu à un test normalisé en eau douce (AFNOR, 1987) pratiqué en milieu marin sur les hémocytes de poissons et de bivalves (Landolt & Kocan, 1983, Burgeot *et al.*, 1995).

Dans les études *in vitro* les mutations géniques sont très souvent recherchées sur les gènes HPRT, TK, etc. qui confèrent un avantage sélectif aux cellules eucaryotes en culture (Vincent, 1995). Pour les études *in vivo* cependant ces gènes présentent peu d'intérêt. Il s'avère plus intéressant de travailler sur l'oncogène *ras* ou le gène suppresseur de tumeur p53 décrits chez plusieurs organismes aquatiques et mutés dans un grand nombre de cancers humains. Des études ont déjà révélé l'existence de mutations sur l'oncogène *ras*

chez des truites soumises à l'Aflatoxine B1 (Chang *et al.*, 1991) ou des plies prélevées dans des sites contaminés par les Hydrocarbures aromatiques polycycliques (McMahon *et al.*, 1990). En ce qui concerne le gène p53 aucune mutation n'a jusqu'à présent été mise en évidence chez des organismes aquatiques. Cependant une expression anormale de ce gène a été observée chez le poisson de mangrove *Rivulus ocellatus marmoratus* après une exposition à la diméthyl-nitrosamine (Goodwin & Grizzle, 1994).

Ce gène présente néanmoins un intérêt évident pour les études de mutagenèse :

- plus de 2500 mutations ont déjà été décrites sur ce gène (Hollstein *et al.*, 1994)
- ce gène comporte près de 300 sites de mutation potentiels (Bennett *et al.*, 1992)
- ces mutations ne sont pas distribuées au hasard mais affectent préférentiellement quatre domaines hautement conservés du gène (Soussi *et al.*, 1990)
- elles sont fréquemment associées à l'exposition à un ou plusieurs cancérigènes : Ultraviolets (Brash *et al.*, 1991), Ni (Maehle *et al.*, 1992), Aflatoxine B1 et virus de l'hépatite B (Bressac *et al.*, 1991), Benzo(a)pyrène (Le Rhun *et al.*, 1994), radicaux libres (Hussain *et al.*, 1994a), Alkyl-nitrosurée (Hussain *et al.*, 1994b), etc.
- pour un cancer donné, elles définissent un spectre de mutations (type, localisation et fréquence des mutations) qui peut permettre d'identifier le ou les facteurs de risque en cause (Harris & Hollstein, 1993)

Il constitue également un marqueur potentiel de cancérogenèse :

- des mutations sont retrouvées dans près de 50% des cancers humains (Harris, 1993)
- ces mutations touchent tous les types de cancers humains (Hollstein *et al.*, 1991)
- le spectre de mutations diffère selon le type de cancers (Hollstein *et al.*, 1991)
- ces mutations peuvent apparaître de façon précoce dans certains types de cancers (Harris & Hollstein, 1993)
- l'inactivation de la fonction suppresseur de tumeur est une étape clé du développement tumoral.

Le gène p53 est un marqueur de mutagenèse et probablement de cancérogenèse. Cependant il faut garder à l'esprit que des mutations peuvent apparaître spontanément, qu'il est souvent difficile d'attribuer une mutation ponctuelle à un cancérigène particulier et que la cancérogenèse est un processus multifactoriel et multifactuel. Néanmoins l'étude statistique des mutations du gène p53 et/ou de l'accumulation de la protéine chez quelques espèces sentinelles (*Callionymus lyra*, *Limanda limanda* etc.) menées conjointement à des analyses histopathologiques, des tests de mutagenèse et des analyses chimiques devrait permettre

d'associer un éventuel effet mutagène à la présence d'agents génotoxiques dans le milieu marin.



## CONCLUSION

25 ans de recherche ont permis de démontrer la forte conservation du gène p53 à travers l'évolution et son importance fonctionnelle. Il est dorénavant acquis qu'il joue un rôle majeur dans la régulation de la croissance cellulaire et que cette fonction est assurée par le contrôle de la transcription d'un ensemble de gènes intervenant dans la division cellulaire, la différenciation et l'apoptose.

La cancérogenèse est un processus multiphasique et multifactoriel au cours duquel l'activation de proto-oncogènes et/ou l'inactivation de gènes suppresseur de tumeur jouent un rôle déterminant.

L'inactivation du gène suppresseur de tumeur p53 est l'événement génétique connu le plus fréquent en cancérologie humaine. Elle résulte d'une double altération génétique affectant les deux allèles du gène avec pour conséquences la perte de la fonction suppresseur de tumeur et dans certains cas l'acquisition de propriétés transformantes.

Ce gène est un bon marqueur de mutagenèse et un excellent modèle pour l'étude de la cancérogenèse chimique. Fréquemment muté dans certaines tumeurs malignes humaines et parfois de façon précoce, il est utilisé pour le diagnostic moléculaire du cancer. En outre il offre de nouvelles perspectives dans le domaine de la thérapie génique du cancer (Friedmann, 1992).

L'observation de tumeurs chez des poissons prélevés dans des sites fortement contaminés par des cancérigènes laisse supposer l'existence d'altérations géniques. La recherche et l'analyse statistique des mutations du gène p53 chez ces poissons devraient permettre de corréler effets mutagènes et présence d'agents cancérogènes dans l'environnement.

## BIBLIOGRAPHIE

**AFNOR, 1987.** *Essais des eaux. détection en milieu aquatique de la génotoxicité d'une substance vis à vis de larves de batraciens (Pleurodeles walt et Amphystoma mexicanus).* Essai des micronoyaux. Association Française de Normalisation, T90-325.

**Alitalo K. & Schwab M., 1986.** Oncogene amplification in tumor cells. *Adv. Cancer Res.*, 47 : 235-81.

**Ames B.N., McCann J. & Yamasaki E., 1975.** Methods for detecting carcinogens and mutagens with salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 31, 347-63.

**Arai N., Nomura P., Yokota K., Wolf D., Brill E., Shohat O. & Rotter V., 1986.** Immunologically distinct p53 molecules generated by alternative splicing. *Mol. Cell. Biol.*, 6 : 3232-39.

**Bennett W.P., Hollstein M.C., Hsu I-C., Sidransky D., Lane D.P., Vogelstein B. & Harris C.C., 1992.** Mutational spectra and immunohistochemical analyses of p53 in human cancer. *Chest*, 101(Suppl.) : 19-20.

**Benchimol S., Lamb P., Crawford L.V., Sheer D., Shows T.B., Bruns G.A.P. & Peacock J., 1985.** Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat. Cell. Mol. Genet.*, 11 : 505-10.

**Berenblum I. & Shubik P., 1947.** A new quantitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse skin. *Br. J. Cancer*, 1 : 383-97.

**Biaglow J.E., 1981.** The effects of ionizing radiation on mammalian cells. *J. Chem. Educ.*, 58 : 144-5.

**Bienz B., Zakut-Houri R., Givol D., Oren M., 1984.** Analysis of the gene coding for the murine cellular tumor antigen p53. *EMBO J.*, 3 : 2179-83.

**Bischoff J.R., Friedman P.N., Marshak D.R., Prives C. & Beach D., 1990.** Human p53 is phosphorylated by p60-cdc2 and cyclin B-cdc2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87 : 4766-70.

**Boyer B., Jouanneau J., Tucker G., Valles A.M., Sastre X., Moens G. & Thiéry J.P., 1990.** *La métastase cancéreuse.* Méd. Sci., 6 : 433-42.

**Brash D.E., Rudolph J.A., Simon J.A., Lin A., McKenna G.J., Baden H.P., Halperin A.J. & Pontén J., 1991.** A role for sunlight in skin cancer : UV-induced p53 mutation in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 : 10124-28.

**Bressac B., Kew M., Wands J. & Ozturk M., 1991.** Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from Southern Africa. *Nature* 350 : 429-31.

- Burgeot T., His E. & Galgani F., 1995.** The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of the sea water genotoxicity. *Mutat. Res.* (sous presse)
- Caron de Fromental C. & Soussi T., 1992.** TP53 tumor suppressor gene : a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 4 : 1-15.
- Caron de Fromental C., Pakdel F., Chapus A., Baney C., May P. & Soussi T., 1992.** Rainbow trout p53 : cDNA cloning and biochemical characterization. *Gene*, 112 : 241-5.
- Chang Y.J., Mathews C., Mangold K., Marien K., Hendricks J. & Bailey G., 1991.** Analysis of ras gene mutations in rainbow trout liver tumors initiated by aflatoxin B1. *Mol. Carcinog.* 4 : 112-119.
- Coulier F., Imbert J., Albert J., Jeunet E., Lawrence J.J., Crawford L. & Birg F., 1985.** Permanent expression of p53 in FR3T3 rat cells but cell cycle-dependent association with large T antigen in simian virus 40 transformants. *EMBO J.*, 4 : 3413-18.
- Courtois Y., Croisy A., Decloître F., Frayssinet C., Hoellinger H., Moulé Y. & Puiseux-Dao, 1994.** *Cancérogénèse* (Picot A. & Albrecht R. eds.). Association Toxicologique-CNAM Paris, 167 p.
- Culotta E. & Koshland D.E., 1993.** p53 sweeps through cancer research. *Science*, 262 : 1958-61.
- Czosnek H.H., Bienz B., Givol D., Zakut-Houri R., Pravtcheva D.D., Ruddle F.H. & Oren M., 1984.** The gene and the pseudogene for mouse p53 cellular antigen are located on different chromosom. *Mol. Cell. Biol.*, 4 : 1638-40.
- Dang C.V. & Lee W.M.F., 1989.** Nuclear and nucleolar targeting sequences of C-erb-A, C-myb, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. *J. Biol. Chem.*, 264 : 18019-23.
- DeLeo A.B., Jay G., Appella E., Dubois G.C., Law L.W. & Old L.J., 1979.** Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 : 2420-4.
- Diller L., Kassel J., Nelson C.E., Gryka M.A., Litwak G., Gebharot M., Bressac B., Ozturk M., Baker S.J. & Vogelstein B., 1990.** p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol. Cell. Biol.*, 10 : 5772-81.
- Donehower L.A., Harvey M., Slagle B.L., McArthur M.J., Montgomery C.A., Butel J.S. & Bradley A., 1992.** Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumor. *Nature* 356 : 215-21.
- Dumaz N., Stary A., Soussi T., Daya-Grosjean L. & Sarasin A., 1994.** Can we predict solar ultraviolet radiation as the causal event in human tumors by analysing the mutation spectra of the p53 gene? *Mutat. Res.*, 307 : 375-86.
- El-Deiry W.S., Kern S.E., Pietenpol J.A., Kinzler K.W. & Vogelstein B., 1992.** Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genet.*, 1 : 45-49.

**El-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer W.E., Kinzler K.W. & Vogelstein B., 1993.** WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75 : 817-25.

**Eliyahu D., Michalovitz D., Eliyahu S., Pinhasikimhi O. & Oren M., 1989.** Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 : 8763-7.

**Farmer G., Bargonetti J., Zhu H., Friedman P., Prywes R. & Prives C., 1992.** Wild-type activates transcription *in vitro*. *Nature* 358, 83-6.

**Fanning E., Burger C. & Gurney E.G., 1981.** Comparison of T antigen-associated host phosphoproteins from SV 40-infected and transformed cells of different species. *J. Gen. Virol.*, 55 : 367-78.

**Fields S. & Jang S.K., 1990.** Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science*, 249 : 1046-9.

**Finlay C.A., Hinds P.W. & Levine A.J., 1989.** The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*, 57 : 1083-93.

**Foord O.S., Bhattacharya P., Reich Z. & Rotter V., 1991.** A DNA binding domain is contained in the C-terminus of wild-type p53 protein. *Nucleic Acids Res.*, 19 : 5191-8.

**Friedmann T., 1992.** Gene therapy of cancer through restoration of tumor-suppressor functions? *Cancer*, 70 (Suppl.) : 1810-7.

**Ginsberg D., Oren M., Yaniv M. & Piette J., 1990.** Protein-binding elements in the promoter region of the mouse p53 gene. *Oncogene*, 5 : 1285-90.

**Goodwin A.E. & Grizzle J.M., 1994.** Oncogene expression in hepatic and biliary neoplasms of the fish *Rivulus ocellatus marmoratus* : correlation with histologic change. *Carcinogenesis*, 15 : 1993-2002.

**Halevy O., Michalovitz D. & Oren M., 1990.** Different tumor derived p53 mutants exhibit distinct biological activities. *Science*, 250 : 113-6.

**Harris C.C. & Hollstein M., 1993.** Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *New Engl. J. Med.*, 329 : 1318-27.

**Harris C.C., 1993.** p53 : at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science*, 262 : 1980-81.

**Harlow E., Williamson N.M., Ralston E., Helfman D.M. & Adams T.E., 1985.** Molecular cloning and *in vitro* expression of a cDNA clone for human cellular antigen p53. *Mol. Cell. Biol.*, 5 : 1601-10.

**Hashizune T., Veda K., Tokuzu S., Hanawa I. & Kinoshita N., 1992.** Monitoring of mutagens in river and marine sediments by salmonella:microsome assay combined with blue cotton method. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 49 : 497-503.

**Herrmann C.P.E., Kraiss S. & Montenarh M., 1991.** Association of casein kinase II with immuno-purified p53. *Oncogene*, 6 : 877-84.

**Hinds P.W., Finlay C.A. & Levine A.J., 1989.** Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J. Virol.*, 63 : 739-46.

**Hinds P.W., Finlay C.A., Quartin R.S., Baker S.J., Fearon E.R., Vogelstein B. & Levine A.J., 1990.** Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells : a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes. *Cell Growth Differ.*, 1 : 571-80.

---

**Hoffman B. & Liebermann D.A., 1994.** Molecular controls of apoptosis : differentiation/growth arrest primary response genes, proto-oncogenes, and tumor suppressor genes as positive and negative modulators. *Oncogene*, 9 : 1807-12.

**Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B. & Harris C.C., 1991.** p53 mutations in human cancer. *Science*, 253 : 49-53.

**Hollstein M., Rice K., Greenblatt M.S., Soussi T., Fuchs R., Sorlie T., Hovig E., Smith-Sorensen B., Montesano R. & Harris C.C., 1994.** Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.*, 22 : 3551-5.

**Hussain S.P., Aguilar F., Amstad P. & Cerutti P., 1994 a.** Oxy-radical induced mutagenesis of hotspot codons 248 and 249 of the human p53 gene. *Oncogene*, 9 : 2277-81.

**Hussain S.P., Aguilar F. & Cerutti P., 1994 b.** Mutagenesis of codon 248 of the human p53 suppressor gene by N-ethyl-N-nitrosourea. *Oncogene*, 9 : 13-8.

**IARC, 1993.** *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human.* Lists of evaluation IARC, Lyon.

**Jenkins J.R., Rudge K., Redmond S. & Wade-Evans A., 1984.** Cloning and expression analysis of full length mouse cDNA sequences encoding the transformation associated protein p53. *Nucleic. Acids Res.*, 12 : 5609-26.

**Jenkins J.R. & Sturzbecher H., 1988.** The p53 oncogene. In *The oncogene handbook* (ed E.P. Reddy, A.M. Skalka & T; Curran). Elsevier Science Publications, Amsterdam : 403-23.

**Kaplan J-C. & Delpech M., 1992.** *Biologie moléculaire et médecine.* Médecine-Sciences, Flammarion, Paris, 610 p.

**Kastan M.B., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B. & Craig R.W., 1991.** Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.*, 51 : 6304-11.

**Kastan M.B., Zhan Q., El-Deiry W., Carrier F., Jacks T., Walsh W.V., Plunkett B.S., Vogelstein B & Fornace A.J., 1992.** A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD 45 is defective in ataxiatelangiectasia, *Cell*, 7 : 587-97.

**Kern S.E., Kinzler K.W., Baker S.J., Nigro J.M., Rotter V., Levine A.J., Friedman P., Prives C. & Vogelstein B., 1991a.** Mutant p53 proteins bind DNA abnormally in vitro. *Oncogene*, 6 : 131-136.

**Kern S.E., Kinzler K.W., Bruskin A., Jarosz D., Friedman P., Prives C. & Vogelstein B., 1991b.** Identification of p53 as a sequence specific DNA binding protein. *Science*, 252 : 1708-11.

**Kern S.E., Pietenpol J.A., Thiagalingam S., Seymour A., Kinzler K.W. & Vogelstein B., 1992.** Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science*, 256 : 827-30.

**Kraiss S., Quaiser A., Oren M. & Montenarh M., 1988.** Oligomerization of oncoprotein p53. *J. Virol.*, 62 : 4737-44.

**Kraiss S., Lorenz A. & Montenarh M, 1992.** Protein-protein interactions in high molecular weight forms of the transformation-related phosphoprotein p53. *Biochim. Biophys. Acta*, 1119 : 11-8.

**Lamb P. & Crawford L., 1986.** Characterization of the human p53 gene. *Mol. Cell. Biol.*, 6 : 1379-85.

**Landolt M.L. & Kocan R.M., 1983.** Fish cell cytogenetics : a measure of the genotoxic effects of environmental pollutants. *In Aquatic toxicology* (Nriagu J.R. Ed.), John Wiley and Sons, New-York : 336-53.

**Lane D.P. & Crawford L.V., 1979.** T antigen is bound to host protein in SV40 transformed cells. *Nature*, 278 : 261-3.

**Lane D.P. & Benchimol S., 1990.** p53 : oncogene or anti-oncogene ? *Genes Dev.*, 4 : 1-8.

**Lane D.P., 1992.** p53, guardian of the genome. *Nature*, 358 : 15-6.

**Lech J.J., Vodcnik M.J., 1981.** Biotransformation of chemicals by fish : an overview. *In Use of small fish species in carcinogenicity testing* (Greenwald P. ed.) : 355. Proc. of a symp. held at Lister Hill Center, Bethesda, USA, december 8 to 10.

**Legros Y., McIntyre P. & Soussi T., 1992.** The cDNA cloning and immunological characterization of hamster p53. *Gene*, 112 : 247-50.

**Legros Y., Lacabanne V., d'Agay M.F., Larsen C.J., Pla M. & Soussi T., 1993.** Production of human specific monoclonal antibodies and their use in immunohistochemical studies of tumor cells. *Bull. Cancer*, 80 : 102-10.

**Le Rhun Y., Duthu A., Ehrhart J.C., Michiels F., May E. & May P., 1994.** directionl selection associated with clonal expansion of p53 mutant cells during neoplastic development of carcinogen-treated rat embryo lung epithelial cells. *Oncogene*, 9 : 263-71.

**Levine A.J., 1990.** Tumor suppressor genes. *Bioessays*, 12 (2) : 60-6.

**Levine A.J., Momand J. & Finlay C.A. , 1991.** The p53 tumor suppressor gene. *Nature*, 351 : 453-6.

**Linzer D.I.H. & Levine A.J., 1979.** Characterization of a 54 KDalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 17 : 43-52.

- Louis J.M., McFarland V.W., May P. & Mora P.T., 1988.** The phosphoprotein p53 is down-regulated post-transcriptionally during embryogenesis in vertebrates. *Biochim. Biophys. Acta*, 950 : 395-402.
- Lozano G. & Levine A.J., 1991.** Tissue-specific expression of p53 in transgenic mice is regulated by intron sequences, *Mol. Carcinog.*, 4 : 3-9.
- Maehle L., Metcalf R.A., Ryberg D., Bennett W.P., Harris C.C. & Haugen A., 1992.** p53 gene structure and expression in human epithelial cells after exposure to Nickel. *Cancer Res.*, 52 : 218-21.
- Malkin D. & Friend S., 1992.** Detection of germline p53 mutations in hereditary cancer. *Clin. Chem.*, 38 : 452-3.
- Maltzman W. & Czyzyk L., 1984.** UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.*, 4 : 1689-94.
- Marshall C.J., 1991.** Tumor suppressor genes. *Cell*, 64 : 313-26.
- Matlashewski G., Lamb P., Pim D., Peacock J., Crawford L. & Benchimol S., 1984.** Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone : expression of the human p53 gene. *EMBO J.*, 3 : 3257-62.
- Mayes P.A., 1985.** Biologic oxidation. In *Harper's review of biochemistry* (Martin D.W.J., Mayes P.A., Rodwell V.W. & Granner D.K., eds.), Appleton Century Crofts, Los Alamos : 128-46.
- McMahon G., Huber L.J., Moore M.J. & Stegeman J.J., 1990.** Mutations in c-Ki-ras oncogenes in diseased livers of winter flounder from Boston harbor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 : 841-5.
- Mercer W.E., Nelson D., Deleo A.B., Old J., Baserga R., 1982.** Microinjection of monoclonal antibody to protein p53 inhibits serum-induced DNA synthesis in 3T3 cells. *Proc. Natl. Sci. USA*, 79 : 6309-12.
- Mellon I., Spivak G. & Hanawalt P.C., 1987.** Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell*, 51 : 241-9.
- Miller E.C., 1978.** Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals. *Cancer Res.*, 38 : 1479-96.
- Miller J.A., 1970.** Carcinogenesis by chemical : an overview. *Cancer Res.*, 30 : 559-76.
- Miller J.A. & Miller E.C., 1977.** Ultimate chemical carcinogen as reactive mutagenic electrophile. In *Origin of human cancer* (Hiatt H.H., Watson J.D., Winstein J.A. eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York : 605-28.
- Miller J.H., 1983.** Mutational specificity in bacteria. *Annu. Rev. Genet.*, 17 : 215-38.
- Milner J., Metcalf E.A. & Cook A.C., 1991.** Tumor suppressor p53 : analysis of wild-type and mutant p53 complexes. *Mol. Cell. Biol.*, 11 : 12-9.

**Milner J. & Medcalf E.A., 1991.** Cotransfection of activated mutant p53 with wild type drives the wild type p53 protein into the mutant conformation. *Cell*, 65 : 765-74.

**Mix M.C., 1986.** Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants : a critical literature review. *Mar. Environ. Res.*, 20 : 1-141.

**Momand J., Zambetti G.P., Olson D.C., George D. & Levine A.J., 1992.** The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 69 : 1237-45.

**Montenarh M., 1992.** Biochemical, immunological and functional aspects of the growth-suppressor oncoprotein p53. *Crit. Rev. Oncog.*, 3 : 233-56.

**Nigro J.M., Baker S.J., Preisinger A.C., Jessup J.M., Hostetter R., Cleary K., Bigner S.H., Davidson N., Baylin S., Devilee P., Glover T., Collins F.S., Weston A., Modali R., Harris C.C. & Vogelstein B., 1989.** Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature*, 342 : 705-8.

**Okuda M., Umeda A., Sakai T., Ohashi T., Momoi Y., Youn H.Y., Watari T., Goitsuka R., Tsujimoto H. & Hasegawa A., 1994.** Cloning of feline p53 tumor suppressor gene and its aberration in hematopoietic tumors. *Int. J. Cancer*, 58 : 602-7.

**Oren M., Reich N.C. & Levine A.J., 1982.** Regulation of the cellular p53 tumor antigen in teratocarcinoma cells and their differentiated progeny. *Mol. Cell. Biol.*, 2 : 443-9.

**Oren M. & Levine A., 1983.** Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 : 56-9.

**Pinhasi-kimhi O., Michalovitz D., Ben-Ze'ev A. & Oren M., 1986.** Specific interaction between the p53 cellular tumor antigen and major heat shock proteins. *Nature*, 320 : 182-4.

**Radinsky R., Fidler I.J., Price J.E., Esumi N., Tsan R., Petty C.M., Bucana C.D. & Bar-Eli M., 1994.** Terminal differentiation and apoptosis in experimental lung metastases of human osteogenic sarcoma cells by wild type p53. *Oncogene*, 9 : 1877-83.

**Reich N.C. & Levine A.J., 1984.** Growth regulation of a cellular tumor antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature*, 308 : 199-201.

**Reisman D., Greenberg M. & Rotter V., 1988.** Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger within intron 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 5146-50.

**Rigaudy P. & Eckhart W., 1989.** Nucleotide sequence of a cDNA encoding the monkey cellular phosphoprotein p53. *Nucleic Acids Res.*, 17 : 8375.

**Rivkina M.B., Cullin J.M., Robinson W.S. & Marion P.L., 1994.** State of the p53 gene in hepatocellular carcinomas of Ground Squirrels and Woodchucks with past and ongoing infection with Hepadnaviruses. *Cancer Res.*, 54 : 5430-37.

**Rogel A., Popliker M., Webb C.G. & Oren M., 1985.** p53 cellular tumor antigen : analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos, and tumors. *Mol. Cell. Biol.*, 5 : 2851-55.



**Ronen D., Rotter V. & Reisman D., 1991.** Expression from the murine p53 promoter is mediated by factor binding to a downstream helix-loop-helix recognition motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88 : 4128-32.

**Rotter V. & Prokocimer M., 1991.** p53 and human malignancies. *Adv. Cancer Res.*, 57 : 257-72.

**Sang B-C., Chen J-Y., Minna J. & Barbosa M.S., 1994.** Distinct region of p53 have differential role in transcriptional activation and repression functions. *Oncogene*, 9 : 853-9.

**Sarnow P., Ho Y.S., Williams J. & Levine A.J., 1982.** Adenovirus E1b-58 kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell*, 28 : 387-94.

**Seto E., Usheva A., Zambetti G.P., Momand J., Horikoshi N., Weinmann R., Levine A.J. & Shenk T., 1992.** Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and repress transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 : 12028-32.

**Shaulsky G., Ben-Ze'ev A. & Rotter V., 1990.** Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells. *Oncogene*, 5 : 1707-11.

**Shaulsky G., Goldfinger N. & Rotter V., 1991.** Alterations in tumor development *in vivo* mediated by expression of wild-type or mutant p53 proteins. *Cancer Res.*, 51, 5232-7.

**Shohat O., Greenberg M., Reisman D., Oren M. & Rotter V., 1987.** Inhibition of cell growth mediated by plasmids encoding p53 anti-sense. *Oncogene*, 1 : 277-83.

**Solomon E., Borrow J. & Goddard A.D., 1991.** Chromosome aberrations and cancer. *Science*, 254 : 1153-60.

**Soussi T., Caron de Fromentel C., Méchali M., May P. & Kress M., 1987.** Cloning and characterization of a cDNA from *Xenopus laevis* coding for a protein homologous to human and murine p53. *Oncogene*, 1: 71-8.

**Soussi T., Caron de Fromentel C., Beugnot C. & May E., 1988a.** Nucleotide sequence of a cDNA encoding the rat p53 nuclear oncoprotein. *Nucleic Acids Res.*, 16 : 11384.

**Soussi T., Bègue A., Kress M., Stehelin D. & May P., 1988b.** Nucleotide sequence of a cDNA encoding the chicken p53 nuclear oncoprotein. *Nucleic Acids Res.*, 16 : 11383.

**Soussi T., Caron de Fromentel C. & May P., 1990.** Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene*, 5 : 945-52.

**Soussi T., 1993 a.** Le gène suppresseur de tumeur p53. *Bull. Cancer*, 80 : 96-101.

**Soussi T., 1993 b.** Le rôle du gène p53 dans les tumeurs malignes humaines. Une découverte majeure en cancérologie. *Rev. Prat.*, 43 : 2531-35.

**Soussi T., Legros Y., Lubin R., Ory K. & Schlichtholz B., 1994.** Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer : a review. *Int. J. Cancer*, 57 : 1-9.

**Stenger J.E., Mayr G.A., Mann K. & Tegtmeyer P., 1992.** Formation of stable p53 homotetramers and multiples of tetramers. *Mol. Carcinog.*, 5 : 102-6.

**Sturzbecher H.W., Maimets T. & Chumakov P., 1990.** p53 interacts with p34<sup>cdc2</sup> in mammalian cells : implications for cell cycle control and oncogenesis. *Oncogene*, 5 : 795-801.

**Unger T., Nau M.M., Segal S. & Minna J.D., 1992.** p53 : a transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer. *EMBO J.*, 11 : 1383-90.

**Tchang F., Gusse M., Soussi T. & Mechali M., 1993.** Stabilization and expression of high levels of p53 during early development in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.*, 159 : 163-73.

**Vincent F., 1995.** Etudes de génotoxicité dans l'environnement marin. *Océanis* (sous presse).

**Vogelstein B., 1990.** Cancer : a deadly inheritance. *Nature*, 348 : 681-2.

**Vogelstein B. & Kinzler K.W., 1992.** p53 function and dysfunction. *Cell*, 70 : 523-6.

**Werness B. A., Levine A.J. & Howley P.M., 1990.** Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, 248 : 76-9.

**White E., 1994.** p53 guardian of Rb. *Nature*, 371 : 21-2.

**Wilcock D. & Lane D.P., 1991.** Localization of p53, retinoblastoma and host replication proteins at sites of viral replication in herpes-infected cells. *Nature* 349 : 429-31.