

# Impact des dérégulations de p53: du syndrome Li-Fraumeni aux syndromes d'insuffisance médullaire héréditaire

Sara Jaber

# ► To cite this version:

Sara Jaber. Impact des dérégulations de p53 : du syndrome Li-Fraumeni aux syndromes d'insuffisance médullaire héréditaire. Biologie moléculaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066242 . tel-01870619

# HAL Id: tel-01870619 https://theses.hal.science/tel-01870619

Submitted on 8 Sep 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE, PARIS VI

Ecole Doctorale Complexité du Vivant (CdV)

« Génétique de la Suppression Tumorale » UMR3244 - Institut Curie

## THESE DE DOCTORAT

Spécialité Biologie Moléculaire et Cellulaire

# Impact des dérégulations de p53 : du syndrome Li-Fraumeni aux syndromes d'insuffisance médullaire héréditaire

par

# Sara JABER

Thèse dirigée par le Professeur Franck TOLEDO

Présentée et soutenue publiquement le 6 septembre 2016

Devant un jury composé de :

Professeur Frédéric DEVAUX	Président
Docteur Patrick REVY	Rapporteur
Docteur Marc-Henri STERN	Rapporteur
Professeur Hugues DE THE	Examinateur
Docteur Michel COHEN-TANNOUDJI	Examinateur
Professeur Franck TOLEDO	Directeur de thèse

#### REMERCIEMENTS

J'adresse mes plus grands remerciements aux membres de mon jury de thèse que je respecte profondément et que j'admire pour leurs travaux scientifiques d'excellence. Je voudrais remercier le Dr Stern et le Dr Revy d'avoir accepté d'être rapporteurs du manuscrit. Je voudrais également remercier le Pr Devaux d'avoir accepté de présider ce jury. Enfin, je voudrais remercier le Pr De Thé d'avoir consacré du temps pour examiner ma thèse et le Dr Cohen-Tannoudji d'avoir accepté d'être examinateur et de m'avoir conseillé tout au long de ma thèse.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Je remercie tout particulièrement le Pr Toledo, mon directeur de thèse, pour son encadrement, ses conseils, et sa disponibilité. Merci Franck, de m'avoir fait confiance et soutenu pour mener à bien tous ces projets passionnants.

Je remercie tous les membres de mon équipe d'avoir enrichi cette expérience humaine et scientifique et fait de ces cinq années – difficiles par moment – un souvenir inoubliable.

Boris, je te remercie pour tes conseils précieux, ta pédagogie exemplaire et pour toutes les discussions scientifiques que nous avons eues. J'ai énormément apprécié ton engagement dans tous les projets, ton implication dans notre avenir professionnel et le temps que tu nous consacres malgré ton emploi du temps très chargé. Merci Boris « Almighty »!

Anne, je te remercie pour ton esprit critique, tes encouragements (chocolats inclus) et toute ton expertise surtout en histologie qui m'a sauvé à plusieurs reprises ! Merci également pour ta relecture de mon mémoire, tes commentaires et ta réactivité.

Rachida, mon avocate, je te remercie pour ton aide technique, pour ton soutien moral et pour les bons moments passés tout au long de ces années. Tu donnes vie au labo et je suis chanceuse de t'avoir comme collègue.

Vincent, le roi du clonage, merci pour ton aide dans les expériences, pour tous les génotypages (on s'en rend compte à ton absence !), pour ton professionnalisme et pour ta bonne humeur (mais pas pour tes blagues...).

Chère Eléonore, une partie de cette thèse n'aurait pas été possible sans toi ! Merci à ma stagiaire brillante qui est devenue mon bras droit (ou cerveau gauche !). Je n'oublierais pas ta gentillesse et ton dévouement, ne change rien je suis sûre qu'une grande carrière t'attend.

Un grand merci aux anciens membres de l'équipe : Iva et Ming, les héroïnes, merci de m'avoir formée et coachée, ainsi que d'avoir initié de beaux projets ; Aurélie et Julia, les grandes sœurs, merci de m'avoir épaulée et d'avoir toujours eu la patience pour répondre à

toutes mes questions; merci à Monika pour sa contribution, à Annaïg et Giuseppe et les autres stagiaires.

Je voudrais également remercier Arturo Londono le directeur de l'UMR3244 et toute l'unité de m'avoir accueillie. Merci à Irena pour sa collaboration, son amitié et son bureau toujours ouvert. Merci à Mike pour le partage de son expertise, protocoles et produits. Merci à Anne G. de m'écouter dans les moments difficiles et de toujours avoir les bons mots. Merci à Julien pour ton amitié, ton grand sourire et tes paroles motivantes.Merci à Maxime, Win-Yan, Céline, Mylène, Nicolas, Anne-Marie, Sandra et tous les autres pour votre bonne humeur, votre humour qui remonte le moral et les moments de complicité. Un grand merci à Marie-France, la meilleure des secrétaires, pour tout le travail administratif mais aussi pour la joie de vivre que tu communiques. Merci aux anciens Dana, Rossella, Karina, Luis, Benoît, Hervé et Thérèse. Enfin un très grand merci à Marion, en qui j'ai trouvé une vraie amie, une épaule forte et un grand cœur pour mes confidences.

Je voudrais remercier l'équipe de l'animalerie et les plateformes de transgénèse, d'histopathologie et de cytométrie de l'Institut Curie. Merci àIsabelle, Céline, Michaël, Maxime et Manon pour leur aide, leur disponibilité et leur expertise. Merci à Christophe et Elodie, qui ont permis la naissance de mes chimères et l'éclosion de mon projet. Merci au Dr Huerre, André et Renaud pour les analyses d'histopathologie. Merci à Zosia et Annick pour leur aide à l'utilisation des cytomètres.

Enfin, je me permets de remercier ma famille et mes amis. Mes parents de qui je tiens cette soif d'apprendre et cette aspiration à l'excellence. Mon frère, mon pilier à l'écorce solide mais au plus tendre des fonds, tu m'inspires le courage et la force à chaque instant. Mes amis merci de croire en moi et de me motiver bien que tout cet univers vous soit inconnu. Je ne remercierai jamais assez celui en qui je puise ma force, mon mari, c'est grâce à ton soutien, ta générosité, ta force d'âme et ta confiance inconditionnelle que j'ai pu affronter tous les défis.

#### RESUME

*TP53* est un gène suppresseur de tumeur muté dans la moitié des cancers humains dont l'étude est d'une importance clinique majeure. Il code pour la protéine p53, classiquement connue sous le nom de « gardien du génome » mais aux fonctions cellulaires variées et aux régulations complexes. Ma thèse s'est articulée autour de ces deux aspects de p53 : son rôle anti-tumoral et son implicationdans de nouveaux processus cellulaires.

La plupart des mutations de *TP53* affectent le domaine de liaison à l'ADN de la protéine, et sont situées au niveau de sept « hotspot » mutationnels. Parmi elles, la mutation Y220C présente un intérêt particulier. Elle est retrouvée dans 100 000 nouveaux cas de cancer par an et dans 10 familles Li-Fraumeni de prédisposition au cancer. Pour étudier cette mutation *in vivo*, j'ai créé au cours de ma thèse le modèle murin exprimant une protéine p53 portant la mutation Y217C équivalente à la Y220C humaine. La caractérisation phénotypique de cette souris nous a permis de démontrer que non seulement la mutation inactive la fonction de la protéine mais qu'elle semble également conférer de nouvelles fonctions oncogéniques. Plus intéressant encore, ce modèle propice au développement de cancers, constitue un très bon outil pour le test d'une nouvelle stratégie thérapeutique spécifique de cette mutation et élaborée par notre collaborateur Alan Fersht.

Par ailleurs, le modèle murin  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$ , créé dans notre laboratoire, a permis de démontrer in vivo le rôle de régulateur négatif du domaine C-terminal de p53 sur son activité, et, de façon surprenante, s'est avéré modéliser la dyskératose congénitale, un syndrome de dysfonctionnement télomérique conduisant à une insuffisance médullaire. Au cours de mes travaux de recherche, j'ai identifié les mécanismes responsables du dysfonctionnement des télomères, et j'ai ensuite montré que les cellules de cette souris miment également les cellules d'un autre syndrome d'insuffisance médullaire ; l'anémie de Fanconi.

Mes deux projets de recherche démontrent qu'une p53 hyperactive est tout autant délétère pour l'organisme qu'une p53 inactive ou dont l'activité est modifiée. Ma thèse place ainsi cette protéine à double facette au sein de nouvelles voies cellulaires mais également au centre de stratégies thérapeutiques prometteuses.

# Table des matières

RESUME	
INTRODUCTION	6
I. LE CANCER	7
I.A. Généralités	
I.B. Le processus de tumorigenèse	
I.C. Oncogènes et suppresseurs de tumeur	9
II. p53 : generalites	
II.A. Historique	
II.B. Famille p53	
II.C. Régulations de p53	
III. P53 : UN FACTEUR DE TRANSCRIPTION	
III.A. Structure modulaire	
III.A.1. La région N-terminale	
III.A.2. La région centrale	
III.A.3. La région C-terminale	
III.B. Fonction de transactivation	
IV. P53 : UN SUPPRESSEUR DE TUMEUR MAJEUR	
IV.A. Réponses anti-tumorales de p53	
<i>IV.B. Alterations de p53 dans les cancers</i>	
IV.B.1. Les mutations germinales	
IV.B.2. Les mutations « notspot »	
IV.C. La mutation « hotspot » Y220C	
<i>IV.D. Therapies anti-cancereuses cibiani la vole p55</i>	
V. P35 : EMERGENCE D AUTRES FONCTIONS	
V.A. FONCTIONS physiopathologiques	
V.D. Les syndromes à insuffisance meautaire V.B. Les syndromes télomériques	
V B 2 I 'anémie de Fanconi	
RESULTATS	
I. P53 ET CANCER	
Article n°1	
APRICIE N°2	
II. F 33 ET INSUFFISANCE MEDULLAIRE	
Article n 5	
DISCUSSION	
I. LES ALTERATIONS DE P53 ET LEURS EFFETS SUR LA TUMORIGENESE	
I.A. Perte de fonction de p53	
I.A.1. Conséquences de la délétion de Trp53	
I.A.2. Conséquences d'unep53 hypomorphe	
I.B. Gain de fonction de p53	
I.C. Stratégie thérapeutique ciblée	
II. LA SUR-ACTIVATION DE P53 ET SES EFFETS PHYSIOPATHOLOGIQUES	
II.A. Le rôle du CTD de p53 in vivo	
II.B. Effets d'une p53 hyperactive	
II.C. p33 et syndromes d'insuffisance medullaire	
II.C.1. Similitudes cliniques	
II.C.2. Implication de p33 dans ces syndromes	
II. C.5. La voie p55 au carrejour entre DC et FA	
III. CONCLUSIONS	
ANNEXE	
Article n°5	
BIBLIOGRAPHIES	

INTRODUCTION

# I. Le cancer

#### I.A. Généralités

Le cancer est une pathologie multifactorielle caractérisée par la présence d'unetumeur maligne formée à partir de la transformation, la croissance incontrôlée et la propagation anarchique de cellules anormales au sein d'un tissu de l'organisme. Le terme cancer recouvre un vaste ensemble de maladies, cataloguées selon les cellules et les tissus à partir desquels les cancers se forment. Les tumeurs sont des tissus complexes composés de types cellulaires multiples et distincts qui participent à l'hétérogénéité tumorale à travers des interactions entre elles et avec le « microenvironnement tumoral »<sup>1</sup>. Au moins 200 types de cancers sont répartis en deux grandes catégories selon leur origine cellulaire : les cancers « solides » (les carcinomes, les sarcomes) et les cancers « liquides» ou hématologiques(les leucémies, les lymphomes). Le cancer constitue un enjeu mondial de santé publique car son incidence ne cesse d'augmenter en raison du vieillissement de la population ainsi que de l'adoption de modes de vie aggravant les risques de cancer (tabagisme, obésité, reproduction tardive, etc.).En 2012, 14,1 millions de nouveaux cas de cancer, 8,2 millions de décès causés par le cancer et 32.6 millions de personnes vivant avec un cancer ont été recensés dans le monde par l'étude « GLOBOCAN 2012 »<sup>2</sup>. Selon cette étude, les cancers des poumons et des seins sont les plus fréquemment diagnostiqués chez les hommes et les femmes respectivement. Selon cette même étude, les données épidémiologiques sont différentes dans les pays développés (cancer de la prostate chez les hommes et des poumons chez les femmes), probablement de par le développement des thérapies anti-cancéreuses et de la détection précoce de la maladie<sup>2,3</sup>.

#### I.B. Le processus de tumorigenèse

Les processus de prolifération cellulaire et de mort cellulaire programmée sont à l'état basal finement régulés pour assurer l'intégrité des tissus et des organes. Le processus de tumorigenèse est caractérisé par des changements au niveau cellulaire, génétique et épigénétique induisant la reprogrammation de la cellule qui va perdre le contrôle des divisions cellulaires. En cas d'agressions environnementales (exposition à des carcinogènes chimiques, des rayonnements, des virus, des xénobiotiques, etc.), génétiques (mutations germinales ou somatiques, réarrangements chromosomiques, etc.) ou même épigénétiques, cette balance peut être déséquilibrée en faveur de la prolifération de la cellule qui va coloniser le tissu et perturber son homéostasie cellulaire. En effet, le cancer est une pathologie clonale qui est caractérisée par une hétérogénéité cellulaire au sein d'une même tumeur <sup>4</sup>. La transformation maligne est un processus avec de multiples étapes d'accumulations successives d'altérations des gènes codant pour des onco-protéines, des suppresseurs de tumeur et des gènes de la réparation de l'ADN(voir paragraphe I.C ci-dessous). Les cancers sporadiques sont majoritaires (90 % des cancers humains) et causés par des mutations somatiques. De plus,desaltérations germinales peuvent entraîner la transmission héréditaire de la prédisposition à certaines formes de cancers. Les cancers héréditaires sont rares (comme le rétinoblastome) et certains syndromes de prédisposition aucancersont définis par le fait qu'il existe des familles présentant une incidence élevée de cancers, comme les cancers coliques familiaux ou des familles avec association de cancers du sein et de l'ovaire.

Les caractéristiques (*hallmarks*) du cancer sont des capacités tumorales acquises progressivement par les cellules et essentielles à leur transformation. Ainsi, selon Hanahan et Weinberg, les cellules cancéreuses peuvent survivre, proliférer et se disséminer grâce à leurs capacités à maintenir les signaux de prolifération, échapper aux suppresseurs de croissance, résister à la mort cellulaire, permettre l'immortalité réplicative, induire l'angiogenèse, activer l'invasion et la dispersion métastatique, auxquelles s'ajoutent les capacités d'échapper à la destruction par le système immunitaire et à déréguler le métabolisme énergétique<sup>1</sup> (Figure 1).



Figure 1 : Les caractéristiques du cancer. Figure adaptée de réf.<sup>1</sup>

Une thérapie anti-tumorale efficace devrait combiner des stratégies qui ciblent plusieurs de ces capacités à la fois, afin d'éviter que les cellules cancéreuses modulent leurs dépendances vis-à-vis de ces différentes voies. Il est important de noter que ces multiples facettes du cancer sont reliées les unes aux autres par certains facteurs clés. L'étude de ces facteurs pourrait donc permettre de mieux comprendre les mécanismes de la progression tumorale et l'élaboration de stratégies thérapeutiques plus efficaces. Un facteur majeur qui agit au niveau de plusieurs voies du processus de tumorigenèse est le suppresseur de tumeur p53.

#### I.C. Oncogènes et suppresseurs detumeur

Les changements que subissent les cellules tumorales au cours de leur transformation impliquent l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur (et de la réparation de l'ADN). Les oncogènes sont une catégorie de gènes dont l'expression favorise la survenue de cancers. Ce sont des gènes qui codent pour des onco-protéines : protéines stimulant la division et qui déclenchent une prolifération désordonnée des cellules. Les plus connus sont les gènes RAS, MYC, et ABL. La seconde catégorie comprend les gènes suppresseurs de tumeur qui sont des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire. Contrairement aux oncogènes qui deviennent hyperactifs dans les cellules cancéreuses (par surexpression ou activation constitutive par exemple), les gènes suppresseurs de tumeur perdent leur fonction dans les cancers. Il peut s'agir soit de délétions d'une région du chromosome contenant le gène, soit de mutations ponctuelles qui altèrent sa fonction. Pour que la fonction d'un gène suppresseur soit perdue, il est nécessaire que les deux copies du gène soient inactivées, alors que les oncogènes subissent des modifications dominantes. Pour qu'un gène soit formellement considéré comme suppresseur de tumeur, deux critères supplémentaires sont requis : des mutations germinales de ce gène devraient pouvoir conférer une susceptibilité au cancer chez l'Homme, et sa perte de fonction dans un modèle animal devrait conduire au développement de tumeurs in vivo. Le premier gène suppresseur de tumeur, RB1, a été découvert dans le rétinoblastome, un cancer de l'œil chez l'enfant. Par la suite de nombreux gènes suppresseurs ont été découverts. Certains sont inactivés plus spécifiquement dans certains types de cancer, à l'instar de BRCA1 et BRCA2 dans les cancers du sein ou d'APC dans les cancers du côlon. D'autres gènes suppresseurs de tumeur ont un spectre d'inactivation plus large commeTP53 qui est inactivé dans au moins la moitié des cancers humains  $^{5,6}$ .

## II. p53 : généralités

#### **II.A. Historique**

Découvert il y a presque 40 ans, p53 est le suppresseur de tumeur le plus étudié avec plus de 80 000 publications recensées à ce jour. L'analyse des tumeurs humaines révèle le rôle crucial de p53 dans la suppression tumorale. Le gène *TP53* humain est situé sur le chromosome 17 et code pour la protéine p53. Il est muté dans plus de la moitié des cancers chez l'Homme, et des altérations de ses régulateurs ou de ses cibles sont retrouvées dans les cas restants <sup>7</sup>. En 1979, la protéine p53 a été initialement identifiée comme un oncogène par différents groupes qui l'ont simultanément retrouvée complexée avec l'antigène T du virus SV40 dans les cellules subissant une transformation tumorale <sup>8-11</sup>. Par la suite, d'autres études ont identifié des interactions entre cette protéine de 53 kDa et des protéines d'adénovirus et du papillomavirus humain. Cet « antigène tumoral » est surexprimé dans des cellules tumorales et semble participer, en coopération avec d'autres oncogènes comme *HRAS*, à la transformation de cellules primaires en culture.

Ce n'est que dans la deuxième décennie de sa découverte que TP53 s'est vu attribué sa vraie casquette de suppresseur de tumeur. Cet erratum découle notamment du fait que « les p53 » étudiées initialementportaient des mutations altérant leur fonction. Ainsi, la surexpression de p53 dans les tumeurs s'avère le résultat de l'accumulation d'une protéine mutée ayant perdu ses fonctions et acquis des capacités oncogéniques. De plus, le gène TP53 utilisé dans les expériences de surexpression était cloné à l'origine à partir d'une séquence portant une mutation faux-sens (à effet dominant négatif) qui inhibe l'activité de la protéine p53 sauvage (Wild-Type ou WT). Une fois cette séquence sauvage déterminée, les démonstrations du rôle majeur de p53dans la suppression tumorale en ont découlé. En effet, des lignées cellulaires de cancer colorectal expriment un allèle TP53 portant une mutation ponctuelle et un allèle portant une délétion, ce qui constitue la signature caractéristique des suppresseurs de tumeur<sup>12</sup>. Des mutations ou délétions de *TP53* ont par la suite été retrouvées dans plusieurs types de tumeurs. De plus des mutations germinales de TP53 causent le syndrome de cancers familiaux Li-Fraumeni de prédisposition à plusieurs tumeurs avant l'âge de 45 ans. Enfin, la démonstration formelle de l'importance de p53 dans la suppression tumorale *in vivo* découle de la création de souris inactivées pour le gène murin Trp53<sup>13</sup>. Ces souris p53 «Knock-Out» (p53KOou KO) sont viables, mais développent spontanément et rapidement des lymphomes et des sarcomes <sup>14</sup>. L'étude de p53 a ainsi pris une place majeure en cancérologie et durant les deux dernières décennies, l'attention a été portée sur l'analyse des fonctions de p53 et de ses régulations, des domaines encore à décrypter aujourd'hui, en projetant sur les applications thérapeutiques possibles.

#### II.B. Famille p53

TP63 et TP73 sont deux homologues de TP53 qui partagent sa fonction, sa structure et son origine qui a dérivé d'un gène ancestral proche d'un gène combiné p63/p73<sup>15</sup>. L'évolution de cette famille de protéines a consisté au passage d'une forme dimérique chez les invertébrés pour le contrôle de la stabilité génétique dans les cellules germinales à une forme tétramérique de p63 et p73 jouant un rôle dans le développement chez les mammifères, pour aboutir à la forme tétramérique du suppresseur de tumeur p53. Les trois membres de cette famille ont une structure modulaire proche qui inclut un domaine de transactivation (TAD), un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et un domaine d'oligomérisation (OD) Cterminal. Du point de vue fonctionnel, ces homologies de séquence et d'architecture structurale avec p53, permettent aux protéines p63 et p73 de former des oligomères, de lier l'ADN et de transactiver des gènes cibles de p53. Elles peuvent ainsi promouvoir certaines des réponses de p53 aux dommages à l'ADN comme l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose, mais également de coopérer avec p53 dans un réseau d'interactions complexes <sup>16</sup>. Chacun de ces trois gènes est exprimé sous formes de multiples isoformes protéiques générées par la présence de promoteurs alternatifs, de sites d'initiation de la traduction internes et de sites d'épissage alternatifs. Au moins 6 et 14 isoformes ont été décrites comme exprimées à partir des gènes TP63 et TP73 respectivement <sup>17</sup> mais d'autres isoformes peuvent être théoriquement traduites à partir de nombreux transcrits potentiels (29 isoformes théoriques pour p73 par exemple)<sup>18</sup>. En effet, l'utilisation de sites alternatifs d'initiation de la transcription génère deux types d'isoformes. Les isoformes longues ou «TA» transactivatrices contiennent un exon N-terminal codant pour un TAD similaire à celui de p53. En général, les isoformes TA exercent des fonctions similaires à cellesde p53 pour la suppression tumorale en raison deleur capacité à transactiver des gènes cibles de p53 impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence, l'apoptose, le maintien de la stabilité génomique et dans la limitation de la migration cellulaire et des métastases. Les isoformes courtes ou «  $\Delta N$  » sont celles qui ont perdu le domaine TAD. Les variants  $\Delta N$ -p63 et  $\Delta N$ -p73 peuvent lier l'ADN mais sont incapables de transactiver les promoteurs cibles canoniques de p53. Ils peuvent même jouer un rôle dominant négatif inhibiteur de l'activité transcriptionnelle des autres membres actifs de la famille<sup>19</sup>.

Le gène TP53 humain, qui a dérivé deduplications géniquesd'un hybride p63/p73<sup>15</sup>, présente la même structure que TP63 et TP73 et code pour au moins 12 isoformes différentes. La majorité de ces isoformes partagent le DBD de la p53 canonique (p53 pleine longueur) mais contiennent des TAD et des extrémités C-terminales distinctes, régulant ainsi différemment l'expression des gènes cibles. De plus, leur expression différentielle dans les cancers humains (ainsi que dans les tissus normaux) suggère qu'elles exercent des fonctions biologiques variées et modulent l'activité de la p53 pleine longueur<sup>17</sup>. Toutes ces observations suggèrent que p53 agit au sein d'un réseau de protéines variées de la même famille mais aux rôles distincts. La séquence des gènes TP53 humain et Trp53 murin (au moins 6 isoformes différentes), ainsi que la structure, les fonctions et les régulations des différentes isoformes pour lesquelles ils codent sont très similaires et conservées au cours de l'évolution (tout comme ses homologues p63 et p73). Cette forte homologie justifie l'utilisation des souris de laboratoire comme modèle pertinent pour l'étude de la complexité de la voie p53.Certains mammifères résistants au cancer présentent au contraire des particularités évolutives comme le grand nombre de copies du gène codant pour p53 chez l'éléphant (environ 20 copies) <sup>20</sup>ou la résistance du rat taupe-nu à la transformation tumorale même dans un contexte de délétion de p53<sup>21</sup>.

p63 et p73 ont également chacune des fonctions biologiques spécifiques et distinctes de celles de p53. Par exemple, p63 joue un rôle majeur dans le développement des cellules épithéliales et la régulation de la différenciation des cellules souches épithéliales, alors que p73 est indispensable pour le développement neuronal. Les données actuelles suggèrent que la réponse cellulaire médiée par p53 résulte d'un groupe d'interactions protéiques entre les différents membres de cette famille d'isoformes plutôt que l'action d'une seule protéine, et ceci dépend du contexte cellulaire ou des conditions de stress <sup>19</sup>.

#### II.C. Régulations de p53

Dans des conditions cellulaires normales, la protéine p53 a une durée de vie courte et est régulée en grande partie par la modulation de sa stabilité protéique. En réponse à divers stress cellulaires, p53 est induite, essentiellement via le blocage de sa dégradation, entraînant une augmentation de ses niveaux cellulaires.Des niveaux élevés de p53 conduisent à l'activation d'une multitude de réponses cellulaires anti-tumorales (voir paragraphe IV.A.). La plupart de ces mécanismes sont cytotoxiques et nécessitent une régulation fine de p53 en absence de stress. Vu son rôle majeur de suppresseur de tumeur, l'inactivation de p53 par

mutations est l'événement le plus commun dans le processus de développement tumoral (plus de 50% des tumeurs humaines invalidées pour *TP53*). Dans les cancers qui retiennent une activité sauvage de p53, des altérations des régulateurs de p53 sont retrouvées. Ces tumeurs non mutées pour p53, sur-expriment souvent un de ses régulateurs négatifs MDM2 ou MDM4, empêchant son activation et conférant ainsi un avantage sélectif aux cellules cancéreuses<sup>22,23</sup>. Eneffet, des niveaux protéiques bas de p53 sont maintenus par sa poly-ubiquitination médiée principalement par le domaine RING de l'E3 ligase MDM2 (*murine double minute 2*) entraînant sa dégradation par le protéasome. MDM4 (également appelé MDMX) est unhomologue structural de MDM2 mais dont le domaine RING n'a pas d'activité E3 ligase fonctionnelle, et qui agit principalement comme un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de p53. L'importance de cette régulation est révélée par la létalité embryonnaire des souris KO pour *Mdm2* ou *Mdm4*, due à une activationde p53 <sup>19</sup>.De plus l'activation excessive de p53 dans certains types cellulaires peut perturber l'homéostasie et le bon développement des tissus <sup>24</sup>.

Six lysines dans le domaine C-terminale (C-terminal domain ou CTD) de p53 sont des cibles majeures de son ubiquitination par MDM2 : K370, K372, K373, K381, K382 et K386 <sup>19</sup>.La régulation de p53 est plus complexe et implique d'autres lysines, d'autres ligases ainsi que d'autres régulateurs <sup>25</sup>. De plus, MDM2 joue un rôle post-ubiquitination en facilitant l'interaction de p53 avec le protéasome. Par ailleurs, en présence de niveaux faibles de MDM2, p53 est mono-ubiquitinylée (et sumoylée), ce qui peut faciliter son export nucléaire par exemple<sup>23</sup>. Par ailleurs, MDM2 et MDM4 peuvent former un dimère via leurs domaines RING respectifs, ce qui augmente l'activité ubiquitine-ligase de MDM2<sup>19</sup>, suggérant que MDM4 joue un rôle de cofacteur ou de E4 ligase. Ainsi, l'activité E3 ligase de MDM2 est elle-même régulée par de multiples paramètres, notamment son domaine RING, son interaction avec MDM4, ainsi que des SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) dans sa séquence régulant son niveau d'expression comme le SNP309 (rs2279744)qui modifie son niveau et donc altère la voie p53<sup>25</sup>. De plus un SNP en 3'UTR du gène MDM4participe à la régulation de l'expression de ce-dernier <sup>26</sup>. Enfin, MDM2 et p53 s'autorégulent via une boucle de rétrocontrôle négative. En effet, MDM2est un gène cible de p53 qui est transactivé suite à l'activation du facteur de transcription p53. Ceci permet de rétablir les niveaux « physiologiques » de p53, après disparition du stress à l'origine de son induction.

Ces principaux régulateurs négatifsde p53, MDM2 et MDM4, peuvent interrompre de manière stérique les associations de la machinerie transcriptionnelle avec p53 et recruter des histones deacétylases. Par ailleurs, MDM2 peut inhiber l'activité transactivatrice de p53 en

liant son TAD N-terminal ou en perturbant la conformation du DBD de p53, inhibant ainsi sa liaison à ses éléments de réponse (Response Elements ou REs) spécifiques. Certaines études suggèrent que MDM2 peut inhiber indirectement la traduction de l'ARNm de p53<sup>27</sup>, alors que d'autres équipes ont conclu que MDM2 peut interagir directement avec l'ARNm de p53 et stimuler sa traduction<sup>28</sup>. De façon surprenante MDM2est également capable de réguler négativement les niveaux de son partenaire MDM4, après irradiation, activant ainsi p53. De plus, en réponse aux dommages à l'ADN, MDM4 peut induire un changement conformationnel de p53 qui la protège de la dégradation par le protéasome <sup>23</sup>.Le fait que p53 est maintenue sous une forme intrinsèquement active mais transcriptionnellement inactive par la liaison de MDM2 et MDM4 a été intégré dans un modèle d'activation de p53 par « dérépression ». Cette levée de la répression peut être médiée par l'ubiquitine protéase HAUSP par exemple, responsable de la dé-ubiquination de MDM2 et MDM4. HAUSP perd son interaction avec p53 en réponse à certains stress, et permet de libérer ce dernier de ses <sup>19</sup>.Tous ces mécanismes inhibiteurs sont coordonnés, contexte-dépendants, et complémentaires pour la régulation de p53.



Figure 2: Schéma simplifié de la régulation de p53 par MDM2 et MDM4. Figure extraite de réf. <sup>29</sup>

A noter que MDM2 et MDM4 peuvent avoir des rôles dans la tumorigenèse indépendamment de p53. Par exemple, MDM2 peut ubiquitinyler et dégrader des régulateurs du cycle cellulaire (RB, p21, et FOXO3A) ou de la transition épithélio-mésenchymateuse (E-cadhérine). De plus, MDM2 peut jouer un rôle dans la suppression de l'apoptose, en augmentant la traduction du gène anti-apoptotique *XIAP*.MDM4 peut lier et inhiber des membres des familles de facteurs de transcription E2F et SMAD. MDM2 et MDM4 sont également impliquées dans la promotion de l'instabilité génomique, notamment via l'interaction avec des protéines de la voie de réponse aux dommages à l'ADN tel ATM<sup>23</sup>.

Il existe au moins 15 ubiquitine E3 ligases capables de réguler p53 (PIRH2, TRIM24, COP1, ARF-BP1, etc.)mais ceci selon le contexte et le type cellulaire. La régulation de p53 est encore plus complexe et implique entre autres, d'autres partenaires, des modifications ainsi que l'expression différentielle de différentes isoformes (de p53, de MDM2 et de MDM4). En effet, p53 a un grand nombre de partenaires en amont et en aval de son action. Par exemple, en réponse aux signaux d'hyerprolifération,p14/p19<sup>Arf</sup> peut stimuler les niveaux de p53 (via une action sur MDM2, MDM4 ou NF- $\kappa$ B). De plus, USP10 dé-ubiquitine p53 et la stabilise en réponse aux stress génotoxiques<sup>25</sup>.

Par ailleurs, p53 est sujette à de nombreuses autres modifications post-traductionnelles (PTM) que l'ubiquitination, comme la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation et la sumoylation qui jouent un rôle dans la régulation de la voie p53. Une des PTM qui semble importante pour la régulation de p53 est son acétylation par CBP et p300 au niveau des six lysines C-terminales qui sont sujettes à l'ubiquitination par MDM2. L'acétylation de ces résidus est mutuellement exclusive avec leur ubiquitination, empêchant ainsi la régulation négative par MDM2. Cette PTM peut également bloquer le recrutement de MDM2 et MDM4, faciliter le recrutement de facteurs de transcription spécifiques aux promoteurs des gènes à transactiver, et améliorer la capacité de p53 à lier certains REs. De plus, l'acétylation de la lysine 320 (situé dans le domaine de tétramérisation) par PCAFfacilite la transactivation des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle, modulant ainsi la réponse à p53. Certaines phosphorylations N-terminales de p53 en réponse aux dommages à l'ADN diminuent la liaison de p53 à MDM2 <sup>19</sup> (voir paragraphe III.A.1).

Des protéines ribosomales (RPs) peuvent également réguler p53. Bien que la plupart des RPs stabilisent p53 en empêchant son ubiquitination par MDM2, certaines peuvent activer p53 via d'autres mécanismes. Par exemple, RPL26 peut lier le 5'UTR de l'ARNm de p53 et augmenter ainsi la traduction de p53. MDM2 peut également interagir avec RPL26 pour contrecarrer cette action. Un autre exemple del'action des RPs sur p53 est la protéine RPL11 qui peutlibérer p53 de la répression transcriptionnelle médiée par MDM2<sup>30</sup>.Enfin, un autre mécanisme de dérégulation de p53 dans certains cancers peut faire intervenir la surexpression de miRNAs. En effet, au moins onze miRNAs régulent négativement l'expression de p53 en ciblant sa région 3'UTR <sup>31</sup>.

# III. p53 : un facteur de transcription

#### **III.A. Structuremodulaire**

Le gène *TP53*humain est situé sur le bras court du chromosome 17 (17p13.1), constitué de 11 exons et code un ARN messager (ARNm) de 2,8 kb. La protéine pleine longueur (*full length* ou FL) traduite compte 393 acides aminés (aa) et a un poids moléculaire empirique d'environ 53 kDa, d'où son nom. p53 est un facteur de transcription (voir paragraphe III.B.) qui, sous sa forme homotétramérique, induit l'expression d'un large éventail de gènes cibles impliqués dans différentes réponses cellulaires<sup>13</sup>. La protéine présente donc une structure modulaire typique des facteurs de transcription à 5 domaines fonctionnellement distincts : un domaine de transactivation N-terminal (*TransActivation Domain* ouTAD), un domaine riche en proline (*Proline Rich Domain* ou PRD), un domaine de liaison à l'ADN (*DNA Binding Domain* ou DBD), un domaine de tétramérisation (*Tetramerization Domain* ou4D) et un domaine régulateur C-terminal (*C-Terminal Domain* ou CTD)<sup>32</sup> (Figure 3).



Figure 3 : La structure modulaire de p53 humaine : une protéine à 5 domaines. Figure adaptée de réf.<sup>33</sup>

Chez la souris, le gène *Trp53* est localisé sur le chromosome 11.Il partage une grande homologie avec le gène humain et code une protéine modulaire de 390 acides aminés ayant une structure très similaire à celle de la protéine humaine (à l'exception d'un décalage de 3 acides aminés).Les fonctions de chaque domaine ont d'abord été largement étudiées dans des expériences *in vitro*. Cependant, les résultats de ces analyses ont souvent été contestés par les études de modèles murins générés par ciblage de mutations au locus *Trp53*<sup>22</sup>. Ces fonctions sont discutées ci-dessous.

#### III.A.1. La région N-terminale

La région N-terminale de p53 est une région intrinsèquement instable et nativement non structurée, composée des 100 premiers acides aminés de p53. Elle consiste en un domaine acide, le domaine de transactivation ou TAD,qui peut être divisé en deux sous-domaines : TAD1 (résidus 1–40)et TAD2 (résidus 41–62), et un domaine riche en proline ou PRD (résidus 63–97), ainsi qu'un signal d'export nucléaire ou NES(voir Figure 3).

Le domaine de transactivation (TAD)est constitué des résidus 1 à 62. C'estle domaine fonctionnel de p53, qui induit la transactivation des gènes cibles de ce facteur de transcription. L'activité du TAD est finement régulée par des cofacteurs, des inhibiteurs et des phosphorylations. En effet, ce domaine constitue un site de liaison à une multitude de protéinesqui interagissent entre elles. Ces liaisons sont favorisées par sa structure intrinsèquement instable, et la phosphorylation affecte surtout la structure du TAD quand celui-ci est lié à ses partenaires<sup>34</sup>. Il interagit avec les composants de la machinerie transcriptionnelle (les TAFs et les TBPs, membres des complexes de facteurs de transcription TFII), avec l'histone acétyl-transférase p300/CBP (CREB-Binding Protein) qui est un activateur de la transcription, ainsi qu'avec les principaux régulateurs négatifs de p53 : MDM2 et MDM4<sup>32</sup>. De plus, le TAD peut subir des modifications post-traductionnelles au niveau de plusieurs résidus, principalement des sérines et thréonines qui sont phosphorylées, en réponse à certains stress cellulaires, par des kinases dont celles impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN comme ATM/ATR, CHK1/CHK2 etHIPK. Par exemple, la phosphorylation des sérines 15 et 20 peut perturber la liaison de MDM2 à p53, et celle de la sérine 46 peut contrôler l'induction des gènes apoptotiquescomme p53AIP1, p53DINP1, PUMA et NOXA<sup>35</sup>. Les résidus leucine 22 et tryptophane 23 (L25 et W26 chez la souris), sont également indispensables à l'interaction avec MDM2, et leurs mutations affectent sévèrement la capacité transactivatrice de p53<sup>36</sup>.

Les délétions et autres mutations du TAD ont suggéré que le TAD1 est nécessaire pour l'arrêt du cycle cellulaire (mutations L22Q/W23S), tandis que le TAD2 serait important pour l'induction de l'apoptose (mutations W53Q/F54S ou délétions des résidus 43–63). Dans le modèle murin p53<sup>25,26</sup> (ou p53<sup>QS</sup>), les mutationsL25Q et W26Sau niveau du TAD1, conduisent à un phénotype de létalité embryonnaire. L'analyse des cellules p53<sup>25,26/25,26</sup> a montré que le mutant p53<sup>QS</sup> présente effectivement un défaut d'induction des gènes cibles

classiques de p53 comme *p21*, *Noxa*, *Puma* et *Perp*, en réponse aux dommages à l'ADN et aux signaux oncogéniques. Ceci montre que le TAD1 est essentiel pour l'activité transactivatrice de p53 pour un grand nombre de gènes cibles connus<sup>37</sup>. Cependant, ce mutant retient une capacité à activer d'autres gènes cibles, notamment *Bax*. D'un point de vue activité biologique, ce mutant est incapable d'induire le cycle cellulaire ou l'apoptose en réponse aux dommages à l'ADN mais est capable d'induire l'apoptose en réponse aux stress non génotoxiques (privation de sérum ou conditions hypoxiques) et conserve même son activité de suppresseur de tumeur (par son activité résiduelle ou un nouveau programme transcriptionnel p53-dépendant)<sup>38</sup>. En revanche, les mutations L25Q, W26S, W53Q, F54S au niveau du TAD1 et du TAD2 entraînent une perte totale des fonctions de transactivation et de suppression tumorale du mutant p53<sup>25,26,53,54</sup> qui se comporte alors comme un mutant nul ou KO (alors que le mutant p53<sup>25,26,53,54/+</sup>a permis de montrer une interaction génétique entre la p53 au TAD inactif et la p53 WT pendant le développement de l'embryon<sup>39</sup>.

Ainsi, le TAD (et essentiellement le TAD1) joue un rôle important dans la fonction transcriptionnelle de p53 mais celle-ci ne semble pas indispensable pour l'activité de suppression tumorale, suggérant l'implication d'autres fonctions (et domaines) de p53. De plus, ceci suggère que TAD1 et TAD2 ont des fonctions redondantes dans la suppression tumorale, ce qui pourrait expliquer pourquoi les mutations dans le TAD sont rares dans les cancers humains<sup>40</sup>.

Le signal d'export nucléaire N-terminal (NES) contient les résidus 11 à 27. Les résidus sérine 15 et sérine20 sont importants pour la réponse aux dommages à l'ADN et sont phosphorylés suite à ce stress. Les substitutions de ces sérines en acide aspartique (S15D et S20D), qui empêchent cette phosphorylation, résultent en une diminution de l'export nucléaire.Cette phosphorylation permettrait donc d'inhiber le NES afin de séquestrer la protéine p53 dans le noyau, où elle exerce sa fonction<sup>41</sup>.

Le domaine riche en proline (PRD)est la région située entre le TAD et le domaine de liaison à l'ADN. Il est constitué des résidus 63 à 97 et contient 15 prolines et 5 motifs PXXP,où P est une proline et X tout autre acide aminé. Ces motifs permettent des interactions protéiques en se liant à des domaines SH3 (Src Homology 3) et facilitent également l'interaction de p53 avec p300.La prolyl isomérase PIN1 affecte la conformation des prolines, réduisant la liaison de MDM2 et facilitant ainsi l'accumulation de p53. Les motifs PXXP ne

sont pas conservés chez les mammifères mais la prévalence des prolines est maintenue (avec deux motifs PXXPchez la souris par exemple)<sup>42</sup>, suggérant un rôle structural et/ou fonctionnel des prolines. Le PRD contribue à la régulation de la stabilité de p53 et à sa capacité de transactivation.

Des modèles murins ont été générés pour étudier le rôle du PRD *in vivo*. La protéine p53<sup>ΔP</sup> est délétée des acides aminés 75 à 91 incluant tous les motifs PXXP et les sites putatifs de fixation de PIN1 (Figure 4). Dans ce modèle, la délétion du PRD entraîne une diminution de la capacité de transactivation et une augmentation de la régulation négative par MDM2. Les cellules p53<sup>ΔP/ΔP</sup> présentent un défaut de l'arrêt du cycle cellulaire, mais une réponse apoptotique conservée. De plus, une forte activité de p53 est létale au cours du développement embryonnaire comme démontré dans les modèles murins inactivés pour un de ses principaux régulateurs négatifs, MDM2 ou MDM4.La protéine p53<sup>ΔP</sup> est capable de sauver*in vivo*le phénotype de létalité embryonnaire causé par la déficience en MDM4, et cecipar réduction de l'activité de p53 <sup>42</sup>. La protéine p53<sup>ΔP</sup> agit donc comme une protéine hypomorphe. Ces résultats, ainsi que l'analyse d'autres mutants (p53<sup>TTAA</sup>etp53<sup>AXXA</sup>), suggèrent que ces sites d'interactions protéiques ne sont pas indispensables pour l'activité anti-tumorale de p53. Ces derniers modèles montrent par ailleurs que la longueur de la région est cruciale. Une hypothèse est que ce domaine joue le rôle de séparateur entre les différents domaines fonctionnels<sup>32</sup>.



Figure 4: La séquence du PRD d'une sourissauvage et destrois souris mutées étudiées dans réf.  $^{\rm 42}$ 

A l'inverse, la délétion des résidus 58 à 88 incluant le PRD (mutant  $p53^{m\Delta Pro}$ ) conduit à un défaut de la réponse apoptotique et un arrêt efficace du cycle dans les cellules hématopoïétiques. Les souris  $p53^{m\Delta Pro/m\Delta Pro}$  présentent une différentiation altérée des lymphocytes B dans la moelle osseuse et la rate et développent des lymphomes B tardifs<sup>43</sup>. Les différences apparentes entre les réponses de  $p53^{\Delta P}$  et  $p53^{m\Delta Pro}$  ont été ultérieurement partiellementexpliquées. En effet, le PRD semble être important dans la réponse aux dommages à l'ADN induits par les radiations gamma, mais pas dans la réponse aux oncogènes ni au stress oxydatif<sup>44</sup>. Par ailleurs une étude récente a montré que le PRD de p53 peut jouer un rôle dans d'autres réponses, comme la régulation des gènes *SPDEF* et *BCL-2*, impliqués dans le phénotype d'hypersécrétion de mucus chez l'Homme et chez la souris <sup>45</sup>.Enfin, il existe un polymorphisme (P72R, rs1042522) dans la séquence du PRD humain qui module les réponses cellulaires dépendantes de p53sans affecter la capacité de suppression tumorale<sup>46,47</sup>. Le PRD semble donc important pour la régulation fine de la réponse cellulaire p53-dépendante.

#### III.A.2. La région centrale

Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) de p53 contient les résidus 102 à 292 (Figure 3). p53 régule la transcription des gènes cibles par la liaison du DBD à des séquences d'ADN double-brin spécifiques dans les promoteurs de ces gènes appelés éléments de réponse ouREs<sup>48</sup> (voir paragraphe III.B).Les études cristallographiques montrent que le DBD consiste en un empilement de feuillets  $\beta$  semblable à celui de l'immunoglobuline (*immunoglobulin-like*  $\beta$ -sandwich) qui fournit l'échafaudage pour la surface de liaison à l'ADN. Cette surface peut être divisée en deux motifs structuraux : le motif boucle-feuillet-hélice (*loop-sheet-helix*),contenant la boucle L1, qui lie le grand sillon de l'ADN cible, et les deux larges boucles (L2 et L3), stabilisées par un ion zinc, qui lient le petit sillon (Figure 5). Le DBD de p53 est peu stable et se dénature à une température proche de la température corporelle<sup>49</sup>. p53 lie ses gènes cibles sous sa forme homo-tétramérique. Cette structure consiste en deux DBD liés à un demi-site du RE, formant ainsi un dimère symétrique<sup>50</sup>.

Les résidus de contact direct à l'interface DBD-ADN sont : Lys-120, Ser-241, Arg-248, Arg-273, Ala-276, Cys-277, et Arg-280. Certains de ces résidus subissent des modifications post-traductionnelles qui fournissent un autre niveau de sélectivité de liaison.Par exemple, le DBD de p53 est acétylé au niveau des lysines 120 et 164 et ces acétylations sont importantes dans l'induction des réponses canoniques de p53. En effet,le modèle p53<sup>3KR</sup> muté pour les trois lysines acétylées du DBD de la p53 murine (K117, K161, K162) exprimeune p53 hypomorphe incapable de transactiver ses principaux gènes cibles en réponse aux dommages à l'ADN ni d'induire les principales réponses de p53 (l'arrêt du cycle, l'apoptose et la sénescence). Cependant ce modèle est résistant au développement de tumeurs spontanées, suggérant que ces fonctions ne sont pas indispensables pour son activité de suppression tumorale, mais importante pour le contrôle de la stabilité génomique<sup>51,52</sup>. Un

autre exemple de modification du DBD est la O-GlcNAcylation de la sérine 149 qui stabilise la protéine notamment en diminuant la phosphorylation de la thréonine 155 et affectant ainsi l'interaction de p53 avec son ubiquitine ligase MDM2 <sup>53,54</sup>.D'autres résidus, pas en contact direct avec la zone d'interaction avec l'ADN,sont tout aussi importants car ils interviennent dans la structure du DBD, comme le résidu tyrosine 220 par exemple.



Figure 5 : La structure du domaine de liaison à l'ADN. Figure extraite de réf.<sup>56</sup>

Dans les cancers humains, *TP53* est le plus souvent muté dans le DBD, au niveau de points chauds de mutations ou « hotspots » représentés par les résidus R175, Y220, G245, R248, R249, R273 et R282<sup>55</sup>. Selon la base de données (R18, Avril 2016) de l'agence internationale pour la recherche sur le cancer (*International Agency for Research on Cancer* ou IARC), environ 75% des mutations de *TP53* retrouvées dans les cancers sont des mutations faux-sens, suggérant un avantage sélectif à garder un allèle muté par rapport à la perte complète de p53. Ces mutations,qui modifient la liaison de p53 à ses gènes cibles, peuvent être séparées en deux catégories: de contact quand elles affectent des résidus se liant directement àl'ADN, ou structurales quand elles affectent la conformation de p53(voir paragraphe IV.B).

III.A.3. La région C-terminale

La partie C-terminale de p53 (Figure 3) est constituée des résidus 293 à 393 et comporte des signaux d'import/export nucléaire (NLS/NES), le domaine de tétramérisation (4D) et le domaine C-terminal régulateur (CTD).

Les signaux d'import (NLS) et d'export nucléaire (NES) (résidus 305–322 et 326–356 respectivement) assurent la mobilisation rapide de p53 entre le noyau et le cytoplasme. Les NLS et NES sont sujets à des modifications post-traductionnelles. La tétramérisation de p53 masque par ailleurs le NES C-terminal et favorise l'accumulation de p53 dans le noyau <sup>57</sup>.

Le domaine de tétramérisation (4D) contient les résidus 326 à 359. La p53 sauvage forme des tétramères de façon réversible via ce domaine de tétramérisation C-terminal. Selon les études de cristallographie, la structure tétramérique est décrite comme un dimère de dimères <sup>50</sup>. Les tétramères se forment à une concentration élevée de protéines p53. Ils sont stabilisés par des interactions hydrophobes, et la rupture d'un des deux résidus hydrophobes leucine 344 ou leucine 348 est suffisante pour tirer l'équilibre vers un état de dimères stables. Des mutations dans ce domaine peuvent entraîner une instabilité des tétramères ou même la perte de leur formation, et certainesde ces mutations (au niveau du résidu arginine 337 par exemple) sont retrouvées dans des familles Li-Fraumeni, prouvant son importance pour l'activité anti-tumorale de p53<sup>32</sup>.

<u>Le domaine C-terminal (CTD)</u>qui est défini comme les 30 derniers acides aminés de p53(résidus 360 à 393),est globalement basique car riche en arginine et lysine. Les études de résonnance magnétique nucléaire (RMN) montrent que, comme le TAD, le CTD a une structure instable et irrégulière<sup>58</sup>. Sa structure relâchée favorise ainsi les interactions avec diverses protéines (telles les protéines YB-1, YIN YANG 1, HAUSP, S100, DMP1 et MDM2) régulant la stabilité, l'activité transcriptionnelle et la localisation cellulaire de p53<sup>59-64</sup>.

Ce domaine contient six lysines chez l'Homme (et septlysines chez la souris) qui peuvent subir denombreuses modifications post-traductionnelles (ubiquitination, neddylation, méthylation, acétylation, sumoylation) supposées jouer un rôle dans la régulation de la réponsep53.La neddylation des lysines semble inhiber la transactivation alors que la sumoylation peut affecter positivement ou négativement la fonction de p53<sup>65</sup>. La lysine 320 (K320) a été impliquée dans la sélection des gènes cibles par p53.En effet, son acétylation et mono-ubiquitination sont importantes pour les décisions du devenir cellulaire : vie (arrêt du

cycle) ou mort (apoptose)<sup>66</sup>. Contrairement aux lysinesK372, K373, K381 et K383 qui sont acétylées par p300 et ubiquitinylées par MDM2, la K320 est quant à elle acétylée par PCAF (p300 and CBP Associated Factor), régulant négativement la réponse apoptotique, et ubiquitinylée par E4F1, ce qui favoriserait l'arrêt du cycle cellulaire plutôt que la dégradation de p53<sup>22</sup>.Récemment, le facteur de transcription KAISO, cible de p53, a également été impliqué dans l'acétylation de la K320 par interaction avec p300, conduisant dans cette étude à l'induction de l'arrêt du cycle et de l'apoptose<sup>67</sup>. La méthylation de la K372 par SET9 stabilise p53, alors que celle de la K370 par SMUD2 la déstabilise<sup>22</sup>. Ces lysines ont donc été étudiées en détail et semblent intervenir dans un réglage fin de l'activité de p53. La substitution des six ou septlysines C-terminales en arginine (R), préservant la charge globale du CTD, n'a initialement pas semblé affecter la fonction de p53 dans des modèles murins (p53<sup>6KR</sup> ou p53<sup>7KR</sup>), suggérant que ces lysines ne sont pas essentielles pour la stabilité et l'activité de p53 68,69. Cependant, les substitutions 6KR ou 7KR confèrent une facilité d'activation de p53 en réponse à des stress plus faibles. Par exemple, les souris p537KR sont plus sensibles aux  $\gamma$ -irradiations et présentent des défauts d'hématopoïèse radio-induits <sup>70</sup>. Le CTD contient également des sérines et thréonines qui peuvent être phosphorylées par des kinases dépendantes du stress, mais le rôle de ces modifications reste controversé. Selon certaines expériences, la phosphorylation des sérines C-terminales semble augmenter la liaison de p53 à l'ADN, mais d'autres analyses montrent que ces phosphorylations pourraient aussirésulter en une diminution de l'affinité de liaison à l'ADN non spécifique. Une mutation de la sérine 392 (389 chez la souris), qui empêche sa phosphorylation, a été analysée in vivo montrant un effet de cette phosphorylation uniquement en réponse aux rayonnements  $UV^{71}$ .

Le rôle du CTD a donc étélargement étudié mais certaines études sont contradictoires. Dans la plupart de ces études *in vitro* visant à étudier le rôle du CTD, des délétions des derniers 30-33 acides aminés (région basique sujette à des modifications post-traductionnelles) ont été analysées <sup>72-74</sup>. Il a été montré que ce domaine fonctionne comme une région de liaison à l'ADN indépendamment de la séquence<sup>75,76</sup>. Les premières analyses ont suggéré que le CTD agit comme un régulateur négatif de liaison du DBD aux séquences spécifiques. Cette conclusion découle des observations que l'absence du CTD *in vitro* (par délétion, épissage, blocage par des anticorps ou par des modifications post-traductionnelles) augmente la liaison de p53 à des petits oligonucléotides contenant les éléments de réponse. Il a ainsi été postulé que p53 se trouve dans un état latent et que la protéine subit un changement conformationnel médié notamment par le CTD qui permet au DBD de fixer les éléments de réponse<sup>77</sup>. Ce modèle allostérique a été remis en cause par d'autres études. En effet, des

analyses RMN ont montré que la protéine p53 pleine longueur et la p53 délétéedu CTD ont des structures tridimensionnelles similaires<sup>58</sup>. De plus l'acétylation au niveau du CTD facilite uniquement la liaison à des petites séquences ADN double brin mais pas à la chromatine ni à de longues molécules d'ADN<sup>78</sup>. Enfin, les expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) n'ont pas permis de démontrer le modèle allostérique<sup>79</sup>. Au contraire, des études plus récentes ont même suggéré un modèle de régulation positive par le CTD, lequel serait requis pour la reconnaissance efficace des promoteurs des gènes cibles de p53<sup>80-83</sup>. Le modèle proposé est que la protéine p53 se fixe à l'ADN via son CTD de façon aspécifique et « glisse » sur cet ADN à la recherche des éléments de réponse spécifiques qu'elle fixe via son DBD. Par ailleurs, selon des études structurales, le CTD est capable de faciliter le contact entre les DBD du tétramère<sup>84</sup>.De plus, le CTD pourrait servir de plateforme de recrutement de cofacteurs de transcription comme CBP et TRAPP et ceci notamment via l'acétylation du CTD<sup>85,86</sup>. Enfin certaines expériences montrent que l'acétylation du CTD(le nombre de lysines activées plutôt que leurposition) facilite la liaison de l'ADN site-spécifique <sup>87,88</sup>, en complet désaccord avec les données d'Espinosa et al. <sup>78</sup>.Il n'est pas clair si cette acétylation est requise pour la liaison du DBD aux éléments de réponse, ou si la p53 liée à l'ADN est plus apte à être acétylée par p300 par exemple. Ces expériences consistent généralement en l'expression ectopique d'une p53 exogène, souvent introduite à des niveaux nonphysiologiques, ce qui rend ces expériences difficiles à interpréter.

De façon intéressante, les études *in vitro* ont suggéré que la délétion du CTD ou des mutations des lysines C-terminales peuvent entraîner des phénotypes différents. Ceci peut être dû au fait que le CTD est requis pour une interaction optimale de p53 avec un de ses principaux régulateurs négatifs : MDM2, une ubiquitine ligase qui régule la stabilité protéique de p53<sup>89</sup>. En raison de ces résultats contradictoires et des biais expérimentaux, il semble nécessaire d'étudier le CTD *in vivo* afin de comprendre son rôle et d'allier ces différents modèles(Figure 6). C'est ce qu'a entrepris notre équipe en créant le modèle murin p53<sup> $\Delta$ 31</sup> exprimant une protéine tronquée des 31 derniers acides aminés afin d'évaluer l'effet de la perte du CTD *in vivo*(Article n°3).



Figure 6 : **Différents modèles proposés pour le rôle régulateur du CTD.** A. Modèle de régulation négative selon les deux hypothèses : conformationnelle et de compétition. B. Modèle de régulation positive. Figure extraite de réf.<sup>90</sup>

#### **III.B.** Fonction de transactivation

La protéine p53 a été bien caractérisée comme facteur de transcription séquencespécifique régulantdirectement des centaines de gènes transcrits par l'ARN-polymérase II et indirectement des milliers d'autres<sup>91</sup>, une liste qui ne cesse de s'allonger. Comme nous venons de le voir, p53 a une structure protéique modulaire typique des facteurs de transcription. Le domaine central (DBD) de p53 joue un rôle très important dans cette fonction par la liaison séquence-spécifique aux promoteurs des gènes cibles. Cette liaison aux éléments de réponse est réalisée sous sa forme homo-tétramérique, d'où l'importance de son domaine de tétramérisation. Suite à cette liaison, les deux domaines de transactivation (TAD1 et TAD2) facilitent indépendamment la transcription des gènes cibles de p53 par le recrutement de protéines remodelant la chromatine (dont des histone-méthyltransferases (HMTs) telles que PRMT1 et CARM1, et des histone-acétyltransferases (HATs) comme p300/CPB) afin de rendre la chromatine accessible aux composants de la machinerie transcriptionnelle basale qui sont ensuite recrutés (comme les complexes TFIID/TAFs et l'ARN polymérase II) pour l'initiation de la transcription<sup>76,91</sup>. Ces domaines recrutent également des complexes co-activateurs comme STAGA<sup>92</sup> et Mediator<sup>93</sup>. Enfin, le domaine riche en proline (PRD) et le domaine C-terminal (CTD) jouent des rôles régulateurs

probablement à travers des modifications post-traductionnelles et conformationnelles comme nous venons de le voir.

Le potentiel transactivateur de p53 est activé en réponse à divers stress cellulaires par la stabilisation de la protéine et ses modifications.Les tétramères de p53 lient ainsi l'ADN en forme de dimère de dimère, sur des séquences spécifiques d'éléments de réponse ou REs (Figure 7). Ces REs sont classiquement définis commecomposés de deux demi-sites double brins de 10 paires de bases (pb) palindromiquesdont la forme canonique (consensus)est 5'-RRRCWWGYYY-3' (avec R = A ou G; W = A ou T; Y = C ou T), séparés par un « spacers »de 0 à 13 pb<sup>48</sup>. Quatre DBD lient ces éléments de réponse de façon très coopérative, avec une stœchiométrie de 4:1, résultant en une torsion de l'ADN qui est augmentée en présence des autres domaines de p53<sup>32</sup>.Les analyses bio-informatiques suggèrent que plus de la moitié des loci potentiels du génome humain contiennent des demisites consécutifs<sup>94</sup>, et que deux demi-sites sont souvent couplés, ce couplage affectant même la nature de la réponse transcriptionnelle (activation ou répression)<sup>95</sup>. Chez l'Homme, parmi les éléments de réponse qui ont été validés expérimentalement, 95% présentent des disparités par rapport au site de fixationcanonique suggérant qu'une dégénérescence de la séquence de fixation est tolérée, comme pour le gène PIG3 par exemple <sup>96</sup>.Les REs sont fréquemment retrouvés soit dans les promoteurs, soit dans le premier intron des gènes cibles de p53. Par ailleurs des clusters d'éléments de réponse inclus dans des répétions en tandem (Fuzzy Tandem Repeats), qui sont rapidement modifiés au cours de l'évolution, peuvent définir des gènes cibles spécifiques à certaines espèces<sup>97,98</sup>.



Figure 7 : Schématisation deA.Fréquence d'observation des nucléotides dans les REs de p53 humain et B. Liaison des tétramères de p53 aux REs. Figure adaptée de réf.<sup>95</sup>

A.

L'architecture des tétramères de DBD liés à l'ADN a été révélée par cristallographie : chaque demi-site lie deux molécules de p53 de manière séquence-spécifique et deux de ces dimères s'assemblent en tétramères symétriques<sup>50,100</sup>(Figure 8). Cependant, une étude récente de biochimie et de microscopie électronique montre que deux tétramères de p53 sont capables de lier un RE en même temps, et que les REs ayant une séquence canonique sans « *spacers* » entre les deux demi-sites sont plus sensibles aux niveaux de p53 <sup>101</sup>. L'étude structurale de Kitayner et al. a révélé l'importance de certains résidus du DBD qui sont en contact direct avec les demi-sites (Lys-120, Ser-241, Arg-248, Arg-273, Ala-276, Cys-277 et Arg-280) dont certains forment des contacts séquence-spécifiques comme l'alanine 276 par exemple<sup>50</sup>. Des modifications post-traductionnelles de certains de ces résidus, telle la lysine 120, peuvent également réguler la sélectivité de la liaison, une fonction cependant non essentielle à la suppression tumorale, ce qui expliquerait pourquoi ce résidu est rarement muté dans les cancers humains. Enfin, cette liaison est également affectée par l'interaction avec des protéines auxiliaires comme les membres de la famille ASPP qui modulent la réponse apoptotique, l'état chromatinien et les modes de réponse non-transcriptionnels de p53<sup>32</sup>.



Figure 8 : La structure des tétramères de DBD liés aux éléments de réponse à p53. Figure extraite de réf.<sup>50</sup>

Une fois active, p53 lie l'ADN et transactive de nombreux gènes codant pour des protéines ainsi que des gènes non-codants.Cette fonction de transactivation est fondamentale pour la majorité des réponses p53-dépendantes. La capacité de p53 à distinguer les différents promoteurs cibles selon les stimuli est très complexe. En effet, une étude génomique a montré que certains sites liés par p53 ne sont pas activés<sup>94</sup>, suggérant que la transactivation de

certains gènes nécessite d'autres éléments régulateurs, en plus des éléments de régulation en cis spécifiques des loci et des affinités variables des éléments de réponse<sup>91</sup>. De manière générale et non stricte, les promoteurs des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN contiennent des sites de liaison de forte affinité et ont la primauté pour une activation rapide, alors qu'un nombre des gènes cibles de p53 impliqués dans la réponse apoptotique lient p53 avec une plus faible affinité mais de façon plus stable. Cette affinité différentielle de p53 à ses REs explique comment la concentration cellulaire de p53(par pulse ou maintenue) peut avoir un aspect déterminant dans le choix de la réponse au stress<sup>66</sup>. En règle générale, mais pas de façonuniverselle, les REs perdent en potentiel transactivateur en s'éloignant du site d'initiation de la transcription (Transcription Start Site ou TSS) et les REs ayant une conformation flexible lient plus facilement p53. La régulation de la réponse transcriptionnelle est encore plus complexe et implique, parmi d'autres, les modifications du CTD (acétylations), les variants d'histone (H2A.Z), les transférases (HMTs et HATs), la machinerie transcriptionnelle (TFIID, TBP, TFIIA et TFIIH), les éléments en cis (MYC) et le contexte épigénétique<sup>91</sup> (Figure 9). De plus, la régulation de l'élongation de la transcription apparaît comme un niveau supplémentaire de contrôle de la réponse p53. Récemment, Liao et al. ont identifié le facteur de l'élongation de la transcription TFIIS.h, comme un nouveau gène cible de p53, qui peut faciliter l'élongation de la transcription du gène apoptotique BAX mais pas de p21, responsable de l'arrêt du cycle cellulaire, modulant ainsi la réponse p53 <sup>102</sup>.



Figure 9 : Schéma de la régulation transcriptionnelle complexe par p53. Figure extraite de réf.<sup>91</sup>

La protéine p53 initialement caractérisée, comme nous venons de le voir, par ses propriétés d'activateur de la transcription, joue également un rôle dans larépression transcriptionnellenotamment de la survivine pour la réponse apoptotique et la sénescence<sup>103</sup>. La répression médiée par p53 met en jeu plusieurs mécanismes. En effet, p53 peut lier directement les séquences inhibées et y recruter des corépresseurs. Dans certains cas, c'est l'orientation de l'élément de réponse qui pourrait dicter le type de réponse. L'orientation activatrice, la plus commune,est« tête à tête » et l'orientation répressive plutôt « tête à queue ». Encore une fois, la longueur du « *spacer* » pourrait jouer un rôle dans la décision de réprimer un gène. p53 pourrait également réprimer des gènes par compétition en se liant aux REs à la placed'activateurs de la transcription<sup>91</sup>. Un autre mode de répression transcriptionnelle est la répression indirecte (sans liaison de p53) en recrutant des corépresseurs par interaction protéique, comme le facteur NF-Y pour la répression du promoteur de la cycline B2<sup>104</sup>, ou en induisant des ARN non-codants, notamment miR34a<sup>105</sup>, lincRNA-p21<sup>106</sup> et PANDA<sup>107</sup>.

Selon Engeland, lemode de répression par p53 qui semble très majoritaire (d'après les méta-analyses) est la répression indirecte via la voie p53-p21-DREAM(E2F4)-CDE/CHR (Figure 10). En effet, p53 transactive p21 qui inhibe les kinases dépendantes des cyclines et donc la phosphorylation de la protéine RB, conduisant au recrutement du complexe répresseur DREAM aux sites de réponse au facteur E2F4 (les sites CDE/CHR)<sup>108,109</sup>. Cette voie a été impliquée dans la répression d'un grand nombre de gènes, notamment ceux codant des régulateurs de l'arrêt du cycle en G2<sup>110</sup>.



Figure 10 : Schématisation de la répression indirecte par p53 via la voie p21-DREAM(E2F4)-CDE/CHR. Figure extraite de réf.<sup>109</sup>

## IV. p53 : un suppresseur de tumeur majeur

#### IV.A. Réponses anti-tumorales de p53

La voie de signalisation p53 est la plus largement étudiée et l'une des voies les plus complexes, avec des fonctions et des régulations émergentes toujours en cours d'investigation, mais qui le plus souvent convergent vers son rôle principal de suppresseur de tumeur. L'importance cruciale de p53 dans la suppression tumorale est largement établie et les premières démonstrations de ce rôledécoulent des observations que le gène TP53 est muté dans au moins la moitié des cancers humains (selon la base de données IARC)<sup>111</sup>, que les familles Li-Fraumeni, caractérisées par la présence d'une mutation germinale de TP53, sont prédisposées à développer des cancers<sup>112</sup>, et que les souris invalidées pour le gène Trp53 développent spontanément des tumeurs<sup>113</sup>. Durant le développement tumoral, une mutation, sporadique ou germinale, de TP53 est typiquement suivie par une perte d'hétérozygotie, ce qui entraîne une déficience complète en protéine p53 fonctionnelle. Les tumeurs déficientes en p53 sont caractérisées par une perte de la différenciation cellulaire<sup>114</sup>, une instabilité génétique<sup>115</sup> et un potentiel invasif accru<sup>116</sup>. Ces effets sont probablement dus à la perte de fonction de la p53 sauvage mais également au gain de fonction oncogénique ou à l'effet dominant négatif de certaines p53 mutées. Les mécanismes qui régissent la réponse cellulaire p53-dépendante ne sont pas complètement décryptés même si leur analyse fait l'objet d'un très grand nombre d'études.

p53 est un détecteur du stress cellulaire induisant, entre autres, un arrêt du cycle cellulaire, transitoire (pour la réparation des dommages à l'ADN) ou permanent (sénescence), et/ou une réponse apoptotique. La nature des signaux activant p53 est diverse : dommages à l'ADN, activation d'oncogènes, stress réplicatif ou déplétion en ribonucléotides, hyperprolifération, hypoxie, stress oxydatif, érosion des télomères, dysfonctionnement des ribosomes, changements métaboliques et manque de nutriments<sup>117</sup>. Les dommages à l'ADN qui activent p53 sont d'origine endogène comme le stress oxydatif, le stress réplicatif et les agents alkylants, ou exogènes comme les rayonnements ionisants, les UV et les chimiothérapies. Ils entraînent une augmentation rapide des niveaux de p53 (dans les 30 à 60 minutes) par stabilisationmais aussi modifications de la protéine. Suite à la détection de ce signal, p53 est principalement phosphorylée sur la sérine 15 par les kinases ATM et ATR (via CHK2et CHK1). La phosphorylation de p53 sur la sérine 20 participe également à sa stabilisation en empêchant son interaction avec son ubiquitine ligase MDM2 <sup>118</sup>.D'autres régulateurs, comme PARP, jouent un rôle dans l'activation de p53 en réponse aux dommages à l'ADN. De plus, les télomères courts sont reconnus comme des foyers de cassures doublebrins (présence de marqueurs x-H2AX, TP53BP1, NBS1, etc.)par la machinerie de réparation. Ainsi, l'érosion des télomères constitue un stress cellulaire qui induit aussi p53 via ATM/ATR<sup>119</sup>. De même, un défaut dans la réparation des dommages à l'ADN dans certaines maladies, comme l'anémie de Fanconi, conduit à une accumulation des signaux de stress et une activation de p53 ainsi que de ses effecteurs (notamment p21). Des études suggèrent que c'est l'activation de la voie p53 suite à ces stress qui est responsable du phénotype de maladies comme les syndromes d'insuffisance médullaire <sup>120</sup>.

En réponse à ces signaux, la protéine p53 est stabilisée et activée par une levée de son inhibition par ses principaux régulateurs négatifs MDM2 et MDM4 (voir paragraphe II.C). Au niveau moléculaire, l'activité biochimique la plus caractérisée de p53 est sa capacité à transactiver une panoplie de gènes suite à son activation, conduisant à une myriade de réponses cellulaires anti-tumorales. De plus,la suppressiontumoralepar p53 fait intervenir d'autres réponses cellulaires comme la régulation négative de certains gènes, la régulation de la traduction, la recombinaison homologue, l'induction de l'apoptose et de l'autophagie indépendamment de la transcription(action cytoplasmique) ainsi que d'autres fonctions cellulaires (voir paragraphe V). Ci-dessous une liste non-exhaustive des mécanismes de suppression tumorale dépendant de p53 en réponse aux stress.

#### IV.A.1. Contrôle du cycle cellulaire :

La première activité décrite de suppression tumorale par p53 est l'induction de l'arrêt transitoire du cycle cellulaire en réponse aux dommages subis par l'ADN, ce qui permet à la cellule de réparer son génome avant de poursuivre sa division et de limiter la transmission de mutations délétères, valant à p53 le titre de « gardien du génome »<sup>121</sup>. Cette réponse est notamment médiée par la transactivation par p53 du gène p21 (ou *WAF1/CIP1/CDKN1A*) qui code pour un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines (les CDK), qui assure un point de contrôle (*checkpoint*) du cycle cellulaire pour le passage G1/S. L'induction de p21 entraîne la répression de gènes du cycle cellulaire codant notamment pour des protéines du « *cell division cycle* » (CDC2, CDC25), des « *checkpoint kinases* » (CHK1) et des cyclines (cyclinA2, cyclinB1). Ce *checkpoint* est en effet compromis chez les souris déficientes pour p21, mais celles-ci développent peu ou pas de tumeurs spontanées<sup>122,123</sup>, suggérant que p53 peut induire plusieurs gènes cibles impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que d'autres réponses. Cette redondance est vérifiée grâce à des modèles murins déficients pour d'autres gènes cibles

de p53 impliqués dans l'arrêt de la prolifération, comme *Ptprv*<sup>124</sup>.De plus, l'activation de l'expression du gène *Prl-3* par p53 induit un arrêt en G1 via la voie PI3K-AKT<sup>125</sup>. p53 joue aussi un rôle dans la progression du cycle cellulaire de la phase G2 à la mitose. La transition G2/M est sous le contrôle du complexe MPF (*Maturation-Promoting Factor*) qui comprend les cyclines B1 et CDC2. Il a été montré que p53 peut induire un arrêt du cycle en G2/M en perturbant les fonctions de ces cyclines via la répression de *CDC25C* et la transactivation de 14-3-3 $\sigma$ , ce facteur empêchant la localisation de ces cyclines au noyau suite aux dommages à l'ADN<sup>126</sup>. *GADD45A* est également un gène cible de p53 impliqué dans le *checkpoint* G2/M<sup>127</sup>. De façon intéressante, la latence dans l'apparition de tumeurs chez certains modèles murins compétents pour l'arrêt du cycle mais déficients pour la réponse apoptotique (p53<sup>R172P</sup> et p53<sup>E177R</sup>), suggèreque d'autres mécanismes que le contrôle du cycle cellulaire sont aussi importants dans la suppression tumorale dépendante de p53<sup>117</sup>.

#### IV.A.2. Réparation de l'ADN :

En plus de l'induction de l'arrêt du cycle pour la réparation de l'ADN (DNA Damage Response ou DDR)en réponse aux stress génotoxiques, le gardien du génome p53 joue un rôle actif dans le maintien de l'intégrité génomique. p53 stimule différents mécanismes de réparation dont la réparation par excision de nucléotide (Nucleotide Excision Repair ouNER), la réparation par excision de base(Base Excision Repair ouBER) et la recombinaison nonhomologue (Non-Homologous End Joining ouNHEJ). En effet, p53 transactive de nombreux gènes impliqués dans différents programmes de réparation comme GADD45A, DDB2, XPC et FANCC. Les souris déficientes pour l'un de ces gènes sont prédisposées à développer un cancer <sup>117</sup>.Cette réparation intervient quand le cycle cellulaire est arrêté et la réversibilité de cet arrêt est essentielle pour que les cellules réparées puissent continuer leur prolifération, d'où l'importance de p21 pour cette fonction également. p53 contribuerait aussi à la stabilité génomique en régulant la duplication du centrosome<sup>128</sup>, en réduisant l'interférence entre transcription et réplication de l'ADN afin de limiter le stress topologique et favoriser la progression des fourches de réplication<sup>129</sup>, et en participant au maintien du génome mitochondria1<sup>130</sup>. Ce maintien de l'intégrité génomique est un frein à la progression tumorale, comme l'indique l'identification de multiples mutations dans les gènes de réparation de l'ADN dans les cancers<sup>131,132</sup>.

### IV.A.3. Sénescence :

La sénescence cellulaire est une forme d'arrêt définitif du cycle cellulaire qui a été initialement décrite dans les fibroblastes humains normaux<sup>133</sup>. Cette réponse cellulaire est à double tranchant pour l'organisme car elle intervient dans les mécanismes de suppression tumorale (bénéfique) et de vieillissement cellulaire (délétère). Elle est induite en réponse à différents stress, notamment le dysfonctionnement des télomères, les dommages à l'ADN non télomériques, les signaux mitotiques excessifs (dont ceux produits par les oncogènes) ainsi que la perturbation de l'organisation chromatinienne<sup>126</sup>. p53 favorise cette inhibition permanente de la prolifération cellulaire par l'induction de la sénescence et de la différentiation qui empêchent la réplication de la cellule mais permettent sa survie et son fonctionnement. p53 induit la sénescence en réponse à l'activation d'oncogènes ou au dysfonctionnement télomérique, via la transactivation du gène p21, qui dans ce contexte contribue plutôt à la sénescence des cellules<sup>134</sup>. En effet, un arrêt du cycle cellulaire prolongé médié par p21 conduit à l'activation de l'inhibiteur des CDK p16<sup>INK4A</sup> et l'activation conséquente de RB, déclenchant ainsi un programme transcriptionnel qui active la sénescence<sup>128</sup>. Par ailleurs, p14ARF peut séquestrer MDM2, activant ainsi p53 et par conséquent p21, créant une coopération entre la voie RB et p53<sup>126</sup>.

Dans certains contextes, p53 peut également induire et maintenir la sénescence indépendamment de p21. Pour cela, il transactive des gènes cibles comme *PML*, *PAI1* (ou serpine1, qui réprime les signaux de croissance via la voie PI3K)<sup>128</sup> ou encore *UBTD1*<sup>135</sup>. A noter que p53 peut induire des enzymes, des cytokines et des chimiokines, responsables entre autres, d'une réponse immunitaire innée qui cible les cellules tumorales et ceci via les sécrétions cellulaires associées à la sénescence (*Senescence Associated Secretory Phenotype* ou SASP)<sup>136</sup>. Ces facteurs sécrétés sous l'induction de p53 peuvent également promouvoir la prolifération et l'invasion<sup>137</sup>, ce qui est surprenant au vu du rôle de suppresseur de tumeur de p53. Des modèles murins ont pourtant permis de corréler la suppression tumorale médiée par p53 à la sénescence cellulaire dans certains contextes (perte de la télomérase, stress oncogénique, etc.). De plus, des marqueurs de sénescence ont été associés à la régression tumorale de certains cancers à la suite de la réactivation de p53 *in vivo*<sup>126</sup>.

#### IV.A.4. Apoptose :

En réponse à des signaux intra et extra-cellulaires, les cellules peuvent enclencher un programme de mort cellulaire programmée dépendant des caspases appelé apoptose. La voie extrinsèque est initiée par la liaison de ligands à leurs récepteurs (*Death Receptors* ou

DRs),comme FAS par exemple, entraînant la mort de la cellule par activation de la caspase 8. La voie intrinsèque conduit à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization* ou MOMP), qui relâche le cytochrome C dans le cytoplasme, activant ainsi en cascade des caspases létales pour la cellule, qui sont également activées par la voie extrinsèque. La voie MOMP est activée par les protéines proapoptotiques BAX et BAK qui forment des pores dans la mitochondrie. Elle est régulée par les protéines anti-apoptotiques BCL2 et BCL-X<sub>L</sub> qui inactivent BAX et BAK. Un groupe de protéines «*BH3-only* », comme PUMA et NOXA, sont des détecteurs qui induisent l'apoptose indirectement en liant BAX et BAK, mais aussi des activateurs directs de la voie MOMP<sup>138</sup>. Dans le cas d'un stress cellulaire prolongé et fort entraînant des dommages non réparables de l'ADN, les cellules peuvent s'engager dans cette voieafin de préserver l'homéostasie tissulaire et empêcher la progression tumorale.

L'apoptose dépendante de p53 a été découverte suite à l'irradiation de thymocytes murins et en réponse à des oncogènes et à des agents endommageant l'ADN<sup>126</sup>. Depuis, d'autres signaux de stress cellulaires capables d'activer la voie apoptotique p53-dépendante dans certains tissus ont été rapportés, comme le dysfonctionnement de la biogénèse des ribosomes dans l'intestin<sup>139</sup>. p53 active la transcription de plusieurs gènes pro-apoptotiques de la famille des protéines BCL2 dont BAX, NOXA (ou PMAIP1) et PUMA (ou BBC3).Comme précédemment, la latence dans l'apparition de tumeurs dansun modèle murin compétent pour la réponse apoptotique mais déficient pour l'arrêt du cycle  $(p53^{\Delta P})^{42}$ , suggère l'importance du contrôle de l'apoptose dans la suppression tumorale, mais aussi la participation d'autres mécanismes. Un modèle de tumeur des plexus choroïdesa permis de démontrer l'implication de l'apoptose dans la suppression tumorale via l'induction par p53 du gène pro-apoptotique BAX.Depuis, de très nombreux gènes cibles de p53 impliqués dans le contrôle de l'apoptose ont été rapportés, reflétant la complexité de cette réponse. Ce rôle a ensuite été validé in vivo dans un modèle de souris transgénique exprimant l'oncogène Eµ-Myc<sup>140</sup>et confirmé dans les tumeurs humaines mutées pour TP53<sup>141</sup>. De plus, la surexpression de l'oncogène antiapoptotique Bcl2 promeut la lymphogenèse chez la souris tout autant que la perte de p53. Cependant, l'inactivation des gènes apoptotiques en aval de p53 comme Puma, Noxa ou Bax n'accélère la tumorigenèse que dans un contexte d'induction de la lymphogénèse par Eµ-Myc, montrant une importance anti-tumorale de la voie apoptotiquedans le contexte des lymphomes B induits, mais également une redondance fonctionnelle entre ces gènes. Par ailleurs, la perte du gène cible apoptotique Perp induit des mélanomes chez la souris en réponse à l'irradiation<sup>117</sup>. De nombreux autres gènes cibles de p53 jouent un rôle dans la promotion de la réponse apoptotique. Ils appartiennent soit à la voie extrinsèque comme les DRs tels*FAS/CD95*, *DR4* et *DR5/KILLER*, soit à la voie intrinsèque comme *ADORA2B* codant pour un récepteur à l'adénosine impliqué notamment dans la réponse à l'hypoxie<sup>128</sup>. Parmi la grande famille des gènes pro-apoptotiques activés par p53, on note également *APAF1*, *PIG3*, *P53AIP1*, *PIDD*, *SIVA*, *TIGAR*et la famille des *miR34* ainsi que *PKC* $\delta^{142}$ ,*TRIML2*<sup>143</sup>et *lincRNA-p21*<sup>144</sup>.

La protéine p53 peut également induire l'apoptoseindépendamment de son action nucléaire de facteur de transcription, en se liant directement, dans le cytoplasme et la mitochondrie, à plusieurs protéines pro- et anti-apoptotiques <sup>145</sup>. p53 fonctionne dans ce contexte comme un détecteur et un activateur. En réponse à des signaux de mort cellulaire comme les rayonnements ionisants, p53 est rapidement relocalisée à la mitochondrie et induitdirectement le processus de perméabilisation membranaire MOMP, ce qui entraîne la libération de facteurs pro-apoptotiques de l'espace inter-membranaire. p53 peut également interagir avec les protéines BCL2, BCL-X<sub>L</sub> et BAK et agir comme un activateur direct ou un dé-répresseur<sup>146</sup>. Les fonctions transcriptionnelles et cytoplasmiques de p53 sont étroitement liées et dépendent de son domaine de liaison à l'ADN<sup>147</sup>. Par exemple laprotéinePUMA induite par p53 peut lier la protéine anti-apoptotique BCL-X<sub>L</sub> et libérer ainsi p53 qui peut activer directement l'apoptose. Par ailleurs, lorsque p53 est constitutivement active, elle peutse substituer à PUMA pour l'activation directe de BAX<sup>148</sup>.

#### IV.A.5. Nécrose :

Outre l'apoptose, il existe une autre forme de mort cellulaire appelée nécrose caractérisée par une libération de contenu cellulaire provoquant une réponse inflammatoire dans le tissu environnant. Plusieurs mécanismes de mort cellulaire par nécrose ont été décrits : nécroptose, parthanatose, pyroptose et ferroptose<sup>149</sup>. p53 a été impliquée dans certaines de ces voies même si les mécanismes ne sont pas encore complètement compris. En l'absence de BAX et BAK, p53 peut induire la transcription de la protéine lysosomale cathepsine Q en réponse aux dommages à l'ADN et provoquer la nécrose de la cellule. Le stress oxydatif peut entraîner la nécrose via p53 en dépit d'une voie apoptotique fonctionnelle. Dans ce contexte, la p53 mitochondriale interagit avec la cyclophine D responsable de la réponse nécrotique. De plus, en réponse aux dommages induits par les dérivés réactifs de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* ou ROS), p53 active la protéine PARP1 pouvant causer la parthanatose, une forme de mort cellulaire induite par les poly(ADP) riboses. Enfin, p53 peut sensibiliser les cellules à la
ferroptose (une forme de nécrose dépendante du fer intracellulaire) en régulant négativement le transporteur SLC7A11<sup>128,150</sup>.

#### IV.A.6. Autophagie :

L'autophagie est la dégradation par la cellule de ses propres composants via la machinerie lysosomale. C'est la réponse principale de la cellule à son manque de nutriments. Ce processus d'auto-dégradation permetà la cellule de se débarrasser des organites endommagés (englobés dans un autophagosome) et à générer des intermédiaires métaboliques l'aidant à survivre. Dans un contexte de normoxie, c'est un processus de survie et d'homéostasie, mais qui peut devenir un effecteur de la mort cellulaire. L'hypothèse est que l'autophagie inhibe les premiers stades du développement tumoral (en inhibant la formation des ROS, les dommages de l'ADN et l'inflammation) mais favorise la progression tumorale aux stades plus tardifs (survie et homéostasie des cellules cancéreuses). Cette hypothèse est vérifiée dans des modèles murins de tumorigenèse induite par l'oncogène RAS.

L'autophagie peut diminuer l'activité de p53 mais aussi induire sa dégradation. p53 peut activer l'autophagie en induisant un grand nombre de gènes cibles comme *DRAM1*, *ULK1* et *cathepsine D*. En réponse au stress métabolique, des composants de la machinerie autophagique, comme la protéine ATG7 qui lie p53 et induit un arrêt du cycle via p21, peuvent même moduler la réponse de la cellule à p53. De plus, p53 peut induire indirectement l'autophagie en inhibant mTOR (via sestrine 1 et 2) et la voie PI3K-AKT par exemple, mais également la limiter par ses fonctions anti-oxydantes ou par son action cytoplasmique en séquestrant les protéines autophagiques BRICC1 et HMGB1 <sup>128</sup>.Selon les études génomiques globales, cette autophagie participe à la fonction de suppression tumorale par p53 <sup>151</sup>.

IV.A.7. Régulation du métabolisme cellulaire et réponses au stress nutritif :

La reprogrammation métabolique est une propriété des cellules cancéreuses caractérisée par l'effet « Warburg » postulant que les cellules tumorales favorisent la glycolyse comme voie catabolique au détriment de la phosphorylation oxydative, même dans des conditions normales d'aérobie. Cette propriété oncogénique essentielle pour la prolifération des cellules cancéreuses est contrecarrée par p53 qui régule le métabolisme énergétique en diminuant les niveaux de la glycolyse et favorisant la respiration mitochondriale. En effet, p53 dérégule les premières étapes de la glycolyse, en inhibant les transporteurs du glucose *GLUT1* et *GLUT4*, via la répression transcriptionnelle, et GLUT3, via l'inhibition de NF- $_{\rm K}$ B,ainsi que les étapes ultérieures de la glycolyse par l'induction de

*TIGAR (TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator)*. L'hexokinase HK2 (potentiellement cible de p53) est impliquée dans la glycolyse et peut induire l'activité de TIGAR dans une voie alternative de métabolisme du glucose (*pentose phosphate pathway*) aux capacités antioxydantes et source de riboses pour la réparation de l'ADN. De façon contradictoire, p53 peut inactiver la G6PDH impliquée dans cette voie alternative. p53 peut également réguler négativement l'expression d'autres enzymes glycolytiques, directement comme pour PGM ou indirectement via l'activation de miR-34a. La régulation des niveaux du glucose par p53 semble être dépendante du contexte et du tissu. En effet, p53 peut réguler également la néoglucogenèse positivement et négativement, notamment via PANK1 et SIRT6 respectivement. Du fait que la glycolyse et la néoglucogenèse génèrent des intermédiaires similaires, l'inhibition de l'une ou l'autre des voies peut limiter la disponibilité des précurseurs anaboliques de la prolifération cellulaire<sup>128</sup>.

Par ailleurs, p53 stimule la phosphorylation oxydative par l'activation de la cytochrome oxydase SCO2 et peut transactiver des gènes comme *GLS2, SESN1* et *SESN2*<sup>117</sup>. p53 induit également la phosphorylation oxydative en inhibant l'expression de *PDK2* et induisant celle de *PARK2* (codant pour la parkine), résultant en une activation de la pyruvate déshydrogénase (PDH)<sup>152,153</sup>. Cette phosphorylation oxydative peut générer des ROS conduisant à un stress oxydatif. Les ROS peuvent activer p53, qui à son tour réduit leurs niveaux, via TIGAR, CPT1C, sestrine, GPX1, ALDH4 et NRF2<sup>128</sup>. Cette activité antioxydante de p53 est nécessairepour la phosphorylation oxydative qui est responsable à son tour de la production de ROS. Les cellules cancéreuses favoriseraient la glycolyse par rapport à la phosphorylation oxydative, en partie pour limiter la production de ROS en l'absence de p53. De plus, l'autophagie p53-dépendante, que nous venons de présenter, est également importante pour la régulation de l'homéostasie métabolique.

En réponse à l'absence de nutriments cellulaires, p53 est activée par la kinase AMPK et par la déshydrogénase MDH1ainsi que par le dysfonctionnement de la biogénèse des ribosomes. Dans ce contexte, p53 peut également promouvoir l'oxydation des acides gras, une fonction activée par le manque de folate et qui peut conduire à une réponse apoptotique. De plus, le manque d'acides aminés, comme la méthionine, la sérine ou la glutamine, peut entraîner un arrêt du cycle ou une apoptose p53-dépendants<sup>128</sup>.Globalement, plusieurs des fonctions métaboliques de p53 semblent reliées à la capacité de la cellule à lutter et survivre au stress nutritif. Dans ce contexte, p53 permet de préserver l'énergie en activant l'arrêt du cycle et inhibant la prolifération cellulaire, tout en facilitant les réponses cataboliques. Le changement métabolique dans les cellules cancéreuses,souvent associé avec la perte de

p53, favorise les capacités anaboliques des cellules cancéreuses (essentielles pour leur prolifération). Il peut également rendre les tumeurs vulnérables aux fluctuations nutritives. Les fonctions métaboliques de p53 constituent donc actuellement un champ de recherche émergeant important.

IV.A.8. Barrière à l'invasion et l'angiogenèse :

La perte de p53 favorise l'agressivité des cellules tumorales. En effet, p53 limite la motilité et l'invasion des cellules primaires en culture et des cellules cancéreuses, inhibant ainsi la dissémination métastatique, par exemple par la répression transcriptionnelle de *LASP1* codant pour une protéine d'adhésion focale<sup>154,155</sup>. De plus, p53 bloque la transition epithéliomésenchymateuse (EMT), importante pour la formation de métastases, en modulant l'expression des familles de facteurs de transcription SNAIL, TWIST et ZEB. Le rôle de p53 dans la formation d'un microenvironnement anti-tumoral s'inscrit dans le cadre de ses fonctions cellulaires non-autonomes(dépendantes des cellules avoisinantes). p53 inhibe le recrutement de vaisseaux sanguins au foyer tumoral. Elle transactive des gènes comme *TSP1*qui code pour un inhibiteur de l'angiogenèse(la thrombospondine 1)<sup>117</sup>. De plus, p53 active l'expression de maspine qui joue un rôle dans l'inhibition de l'angiogenèse mais également dans la migration cellulaire et l'invasion des métastases<sup>156</sup>.

### III.A.9. Action sur les cellules souches :

Par ailleurs, p53 peut aussi contribuer à la suppression tumorale par l'inhibition des caractéristiques des cellules souches. En effet, le rôle de p53 dans le blocage de la reprogrammation des iPS (*induced Pluripotent Stem cells*)et des caractéristiques pluripotentes des cellules souches cancéreusesa été montré, notamment par l'induction de p21, PUMA etmiR145 et la répression de *nestine*<sup>128</sup>.

Ces différentes réponses anti-tumorales de p53, ainsi que les gènes cibles impliqués dans chacune de ces fonctions, sont résumés dans la Figure 11 ci-dessous.



Figure 11 : La suppression tumorale p53-dépendante avec A. les différentes fonctions de p53 en réponse à divers stress et B. les gènes cibles impliqués. Figure extraite de réf.<sup>117</sup>

#### IV.B.Altérations de p53 dans les cancers

Les mutations somatiques de p53 sont les altérations les plus fréquentes dans les cancers humains non hématologiques. Leur incidence dépend du type et du stade de la tumeur : 96% dans les carcinomes ovariens séreux, 54% dans les carcinomes du sein invasifs, 86% dans les carcinomes à petites cellules du poumon, et 75% dans les carcinomes du pancréas<sup>111,157</sup>. L'activité de p53 peut être perdue ou altérée par différents mécanismes (comme la surexpression de MDM2 ou MDM4 ou la liaison à des protéines virales). Cependant, dans la majorité descas (75%), les modifications de l'activité de p53sont dues à des mutations faux-sens du gène TP53 (entraînant l'expression d'une protéine mutée dont la fonction est altérée), plutôt que des délétions (entraînant la perte du suppresseur de tumeur ou une protéine tronquée comme c'est le cas pour d'autres protéines comme PTEN, BRCA1 ou RB). Cette particularité suggère un avantage biologique de ces mutations pour le développement du cancer. Elles se produisent le plus souvent par un mécanisme en deux temps : une mutation faux-sens sur un allèle du gène TP53, et une perte d'hétérozygotie par délétion de l'autre allèle.Les mutations les plus fréquentes (environ 86%), appelées « hotspot », sont présentes dans la séquence du gène TP53 codant pour les résidus de 125 à 300 du domaine de liaison à l'ADN (DBD)<sup>157</sup>. Cependant presque tous les codons du DBD peuvent être mutés dans les cancers humains à des fréquences variables, ainsi que les autres domaines de la protéine. Le spectre des tumeurs diffère selon l'effet de la mutation : perte d'activité de p53, gain de nouvelles fonctions oncogéniquesou capacité de la protéine mutée à inhiber la p53 sauvage. De plus, certaines mutations peuvent avoir des effets différents selon les tissus examinés, ainsi qu'une fréquence de distribution pouvant refléter l'implication du mutagène dans le développement du type de tumeur dans certains cas<sup>158</sup>. Par exemple, le cancer des poumons chez les fumeurs (exposées au carcinogène chimique benzo(a)pyrene)est corrélé à une forte prévalence de conversions de guanine en thymidine le plus souvent aux codons 157, 158, 245, 248 et 273 de p53<sup>159</sup>. De plus, l'aflatoxine est un carcinogène qui a été associé à la mutation « hotspot » R249S dans les carcinomes hépatocellulaires chez les populations soumises à de fortes expositions <sup>160</sup>. Cette « signature » retrouvée par différentes équipes a par la suite été réfutée notamment par Denissenko et al. qui postule qu'elle résulte plutôt d'un phénomène de sélection ultérieur à l'exposition à l'agent mutagène <sup>161,162</sup>.

Une étude récente montre que la délétion du bras court (p) du chromosome 17 humain (qui porte le gène *TP53*), un événement fréquent dans les tumeurs humaines, semble conférer des phénotypes plus sévères que la simple perte de *TP53*, notamment par la délétion d'autresgènes suppresseurs de tumeur<sup>163</sup>.D'autres mutations sont retrouvées dans les cancers

comme les décalages de cadre de lecture (11% des mutations), les mutations silencieuses qui peuvent affecter l'épissage de l'ARN ou sa stabilité et les mutations qui affectent les isoformes de p53 <sup>164</sup>.Par ailleurs, le microenvironnement joue un rôle important dans la progression tumorale. Des mutations de *TP53* ont ainsi été retrouvées dans le stroma de certains cancers du sein et dans des fibroblastes associés à des carcinomes chez l'Homme. Ainsi, des cellules stromales très prolifératives, déficientes en p53, sont capables de faciliter la croissance des cellules épithéliales tumorales exprimant une p53 WT<sup>157</sup>. Les différentes altérations de *TP53* dans les tumeurs peuvent donc conduire à des phénotypes distincts selon la nature de la mutation et l'étendue de la délétion, ce qui contribue à l'hétérogénéité tumorale.

#### IV.B.1. Les mutations germinales

Des mutations germinales du gène TP53 sont responsables d'un syndrome héréditaire deprédisposition au cancer : le syndrome de Li-Fraumeniou LFS (du nom des deux chercheurs, Frédérick Li et Joseph Fraumeniqui l'ont décrit en 1969). Les cellules de ces patients, hétérozygotes pour TP53, perdent souvent le 2<sup>ème</sup> allèle par le phénomène de perte d'hétérozygotie (Loss Of Heterozygocity ou LOH), qui est un phénomène commun aux gènes suppresseurs de tumeur. La définition clinique de ce syndrome selon Li et Fraumeni inclut un cas index présentant un sarcome avant l'âge de 45 ans, un apparenté au premier degré présentant un cancer avant l'âge de 45 ans et un apparenté au premier ou second degré présentant un cancer avant l'âge de 45 ans ou un sarcome à n'importe quel âge<sup>165</sup>. Les familles qui ne présentent pas tous ces critères sont définies comme « Li-Fraumeni Like »<sup>166</sup>. Ce syndrome héréditaire rare se manifeste par l'association familiale d'un large spectre de cancers incluant des ostéosarcomes, des sarcomes des tissus mous, des cancers du sein, des tumeurs du système nerveux centralet des leucémies. Un grand nombre d'autres tumeurs incluant des lymphomes, des mélanomes ainsi que des cancers du poumon et du tube digestif ont également été décrits chez des familles LFS et apparaissent à un âge précoce <sup>167,168</sup>. L'âge moyen d'apparition des cancers est précoce, avant l'âge de 40 ans dans 50 % des cas et avant 60 ans dans 90 % des cas. De plus, les femmes portant une mutation de TP53 sont exposées à un risque plus élevé de développer des tumeurs et à un âge plus jeune que les hommes<sup>166</sup>. Par ailleurs, les patients Li-Fraumeni ont tendance à développer des tumeurs secondaires au traitement par radiations ionisantes 165,169. Des mutations germinales de TP53 ont été rapportées dans environ 80% des familles LFS « classiques » et dans 20 à 40% des familles LFL. Des modificateurs génétiques du phénotype du LFS peuvent exister comme le SNP 309

de MDM2(rs2279744)associé à une apparition plus précoce des tumeurs, surtout en association avec le SNP P72R de TP53(rs1042522)<sup>166</sup>.

IV.B.2. Les mutations « hotspot »

Les neuf mutations du gène *TP53* les plus fréquentes dans les cancers humains : R175H, Y220C, G245S, R248Q, R248W, R249S, R273H, R273C et R282W sont localisées au niveau de sept résidus « *hotspots* » du domaine de liaison à l'ADN (*DNA Binding Domain* ou DBD) de p53 (Figure 12). "L'hypermutabilité" de ces sites pourrait découler de l'association de différents facteurs qui dépendent de la nature de la séquence ADN ainsi que de l'effet de la mutation. Par exemple, ces codons comportent des sites CpG avec des cytosines fréquemment méthylées dont la déamination induit une transition de la cytosine en thymidine, une mutation fréquente dans les cancers <sup>159</sup>. De plus, la position de ses résidus au niveau du domaine de liaison à l'ADN, explique l'impact de leurs mutations sur la fonction de ce facteur de transcription. Un autre avantage sélectif de ces mutations « *hotspot* » est qu'elles peuvent conférer un gain de fonction oncogénique à la protéine mutante.



Figure 12 : Schématisation de la fréquence des mutations de p53 dans les cancers humains et de la structure du DBD avec les résidus « *hotspot* ». Figure extraite de réf. <sup>49</sup>

Classiquement, on distingue deux catégories de mutations *« hotspots »*de p53 : d'une part les mutations de contact concernent des acides aminés qui sont impliqués dans le contact direct avec l'ADN et qui compromettent l'activité transcriptionnelle de p53 etd'autre part les mutations de structure qui modifient la conformation tridimensionnelle de la protéine affectant ainsi sa fonction <sup>170</sup>. Cette classification est simplifiée, et ces différentes mutations peuvent entraîner des changements subtils dans la stabilité et la structure de la protéine. Des expériences *in vitro* suggèrent que ces deux types de mutations peuvent coopérer avec la voie de signalisation H-Ras par des mécanismes distincts mais entraînant un profil d'expression et de tumorigenèse similaire <sup>158</sup>.

Les mutations de contact les plus fréquentes concernent les résidus 248 et 273. Par exemple, les mutations « hotspots » R273H et R273C affectent l'acide aminé arginine 273 qui est en contact direct avec l'ADN (Figure 12). Selon les études structurales, ces deux mutations ont un effet mineur sur la stabilité thermodynamique de la protéine et les changements structuraux qu'elles entraînent sont localisés et ne perturbent pas l'architecture globale de la surface de liaison à l'ADN. Cependant, la liaison de ces protéines mutées à leurs gènes cibles est largement réduite in vitro et la spécificité de leur liaison est perdue.La protéine p53 est intrinsèquement instable, ce qui la rend susceptible à l'inactivation par des mutations oncogéniques qui diminuent sa stabilité thermodynamique entraînant la perte de sa conformation. La mutation G245S induit un changement structural faible qui affecte la dimérisation des DBD et donc la coopérativité de liaison à l'ADN. La mutation R249S induit des changements plus importants entraînant une flexibilité accrue de la boucle L3 qui lie lepetit sillon de l'ADN et perturbant ainsi le contact à l'ADN de l'arginine 248 adjacente et l'interface de dimérisation. Ces deux mutations affectent la liaison du DBD muté à ses gènes cibles. Des effets similaires sont observés avec la mutation structurale R175H qui est supposée perturber la région qui lie l'ion zinc. La mutation R282W résulte en une perte des interactions stabilisatrices comme les ponts d'hydrogènes et les liaisons hydrophobes, entraînant une déstabilisation de l'équilibre thermodynamique de la protéine mutée, même si l'architecture générale du DBD est conservée. Les mutations dans la région en « $\beta$ sandwich »qui sert d'échafaudage pour la structure du DBD, comme la mutation « hotspot » Y220C, sont très déstabilisantes, et diminuent la stabilité thermodynamique de la protéine d'environ 4,8 kcal/mol. A noter que la stabilité thermodynamique qui détermine l'équilibre conformationnel de la protéine (entre structure repliée ou relâchée) est différente de la stabilité protéique qui définit le niveau cellulaire de la protéine (équilibre entre sa production et sa dégradation) <sup>32,49</sup>.

La protéine p53 mutée s'accumulesouvent dans les cellules cancéreuses. Ceci est dû soit à l'inhibition de la dégradation de p53 suite à un défaut d'induction par p53 du gène codant notamment pour son ubiquitine ligase MDM2, soit à l'agrégation de la p53 mutée en raison de ses changements conformationnels. Cette accumulation d'une p53 mutée peut jouer un rôle dans la tumorigenèse par son effet dit dominant négatif sur la protéine sauvage (WT). En effet, p53 agissant sous forme d'un homotétramère, ces protéines mutées peuvent avoir un effet inhibiteur sur la protéine p53 WT en la liant dans un tétramère inactif. Dans ce cas, les cellules hétérozygotes pour la mutation à effet dominant négatif présentent un phénotype de tumorigenèse plus sévère que les cellules  $p53^{+/-}$ . De plus, certains de ces mutants présentent un spectre tumoral plus large à l'état homozygote que celui causé par la simple perte de p53, indiquant que les protéines mutéesont acquis de nouvelles fonctions oncogéniques (mutations à effet néomorphe)<sup>158</sup>. Ce gain de fonction oncogénique des mutants de p53 inclut une tumorigenèse accrue, un potentiel métastatique, une résistance aux thérapies et une instabilité génomique<sup>171</sup>.De plus, les patients Li-Fraumeni portant l'une de ces mutations faux-sens au niveau du domaine de liaison à l'ADN de type gain de fonction, présentent une incidence plus élevée et une apparition des tumeurs plus précoces (9 à 15 ans plus tôt) que ceux portant d'autres types de mutations ou une délétion du gène TP53<sup>157</sup>. Les propriétés des protéines sont très hétérogènes selon les mutations et dépendent probablement des diverses conformations induites par ces différentes mutations. Elles peuvent être le résultat des changements dans la spécificité de liaison à l'ADN induisant ainsi de nouveaux programmes transcriptionnels, ou des interactions avec d'autres protéines affectant l'expression des gènes. De plus, les p53 mutées ayant une structure non repliée, mais pas celles de contact, peuvent spécifiquement lier p63 et p73 et diminuerl'activité apoptotique de ces derniers <sup>171</sup>.

#### IV.B.2.a. Etude des mutations « hotspot » in vivo

Les souris KO pour p53 développent spontanément des tumeurs, en particulier des lymphomes T et des sarcomes. La pénétrance complète du phénotype tumoral causé par la perte de p53 *in vivo* a conforté l'idée que p53 est un suppresseur majeur de tumeur. Cependant, la plupart des cancers humains sont des carcinomes, qui sont rarement observés dans ces modèles murins. La création de souris *« Knock-In »* (KI) exprimant des mutations ponctuelles de p53 et notamment les mutations *« hotspot »,* induit, à la différence des souris KO, un phénotype tumoral proche du spectre humain, avec un degré élevé d'hétérogénéité, des carcinomes plus fréquents et des tumeurs très invasives et métastatiques <sup>171</sup>. Les mutations R172H ou R270H par exemple (équivalentes aux R175H et R273H chez l'Homme) sont

respectivement des mutations de structure et de contact qui ont un effet gain de fonction. Les mutants R246S (R249S humain) et G245S (mutant humanisé) au contraire ne montrent aucune acquisition de nouvelles fonctions, mais la protéine mutée R246S semble avoir un effet dominant négatif sur la protéine WT chez les souris p53<sup>+/R246S</sup>. Cependant, seules les souris humanisées R248Q développent des tumeurs plus rapidement que les souris KO avec une durée de vie significativement plus réduite, concordant avec l'apparition précoce de tumeurs chez les patients Li-Fraumeni exprimant cette mutation. De façon intéressante, cet effet n'est pas observé chez les souris humanisées R248W même si les deux mutations du résidu arginine 248 sont des mutations de contact <sup>158</sup>. La mutation R282W semble avoir des effets gain de fonction dans les études sur les cellules de patients <sup>172</sup>, et n'a pas encore été étudiée chez des modèles murins, tout comme la mutation Y220C. L'analyse de cesmutations « hotspot »in vivo est donc essentielle pour comprendre leur effet et pour développer des stratégies thérapeutiques les ciblant, d'autant plus que les effets de ces mutations sont différents dans les tumeurs humaines et sont reflétés par l'hétérogénéité du syndrome Li-Fraumeni. En effet, le codon 248 est plus souvent muté dans les tumeurs pancréatiques, alors que dans les tumeurs du sein par exemple les mutations les plus fréquentes affectent les codons 275 et 175, suggérant des activités spécifiques de certaines mutations <sup>157</sup>. Concernant les deux mutations les moins étudiées, Y220C et R282W, elles sont le plus fréquemment retrouvées dans les cancers de l'ovaire et de l'os respectivement (selon la base de données IARC TP53 R18 Avril 2016).

#### IV.B.2.b. Mécanismes de gain de fonction

L'étude de toutes ces souris KI a permis d'établir plusieurs mécanismes d'acquisition de fonctions oncogéniques par la p53 mutée dont : son rôle inhibiteur sur la protéine MRE11 entraînant une instabilité génomique <sup>173</sup>, l'activation de certaines voies de signalisation comme PDGFRβ pour le cancer du pancréas <sup>174</sup>et l'activation transcriptionnelle de protéines oncogéniques comme la phospholipase PLA2G16<sup>175</sup>, ainsi que de confirmer le rôle de p63/p73 dans l'inhibition de l'activité anti-tumorale de p53 <sup>176</sup>. En effet, certaines p53 mutées sont capables d'induire une panoplie de gènes favorisant la tumorigenèse comme *IGF1R*, *EGFR*, *TIMM50*, *ITGB4*, etc<sup>157</sup>. D'autres mécanismes sont en jeu comme l'activation de la prolifération cellulaire par certaines cyclines et par d'autres signalisations prolifératives (telles les récepteurs de la vitamine D ou la synthèse des stéroïdes) ou encore de l'angiogenèse, via ID4. De plus la p53 mutée peut lier différents partenaires et avoir même des activités cytoplasmiques comme la séquestration de la protéine DAB2IP pour la reprogrammation de la

signalisation TNFα. L'hypothèse principale est que la p53 mutée interagit avec plusieurs facteurs de transcription (comme NF-Y, SREBP1/2, ETS2, etc.) induisant l'activation aberrante de voies oncogéniques. Des études de surexpression d'une p53 mutée ont permis de découvrir le rôle de ces mutants dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), un processus qui favorise les métastases<sup>177</sup>. Des études récentes montrent que plusieurs mutants de p53 stimulent l'effet Warburg dans les cellules cancéreuses, et qu'ils peuvent avoir un effet gain de fonction indépendamment de la transcription en régulant négativement AMPK (*AMPactivated protein Kinase*) impliquée dans le métabolisme <sup>171</sup>. Plus récemment, Zhu et al. ont montré que des p53 mutées, et pas la WT, peuvent lier et induire des gènes régulateurs de la chromatine dont les méthyltransférases MLL1 et MLL2 et l'acétyltransférase MOZ (des transférases qui sont régulées positivement dans les tumeurs exprimant une p53 mutée uniquement), résultant en une augmentation globale de la méthylation et l'acétylation des histones <sup>178</sup>. Ainsi, différents mécanismes peuvent contribuer au phénotype de gain de fonction.

#### IV.C. La mutation « *hotspot* » Y220C

Y220C est la 9<sup>ème</sup> mutation « hotspot » par ordre de fréquence dans les cancers humains. Selon la base de données IARC-TP53, cette mutation concerne environ 100 000 nouveaux cas de cancers sporadiques par an et a été retrouvée dans 38 tumeurs germinales (correspondant à 10 familles Li-Fraumeni) et le plus souvent dans les ostéosarcomes. C'est la mutation la plus fréquente du DBD de p53 en dehors de la surface de contact avec l'ADN. En effet, selon les études structurales, la tyrosine 220 est située à la base de la structure en  $\beta$ sandwichet en position distale par rapport à l'interface de liaison à l'ADN (Figure 12). Par ailleurs, la mutation de la tyrosine en cystéine crée une cavité accessible aux solvants, en raison de la perte des interactions hydrophobes<sup>49</sup>.Du fait des changements conformationnels qu'elle induit, cette mutation structurale déstabilise la structure du DBD et diminue sa stabilité thermodynamique de 4 kcal/mol avec plus de 80% des protéines p53<sup>Y220C</sup> sous une forme non repliée du DBD et inactive à la température corporelle, sans pour autant changer la conformation globale du reste de la protéine<sup>179</sup>. Cette déstabilisation thermodynamique est également favorisée par la formation d'un déhydron, une structure accessible par les molécules d'eau et donc instable <sup>180</sup>. Par ailleurs, cette cavité créée par la mutation et qui est éloignée de la surface de contact avec l'ADN constitue une stratégie de ciblage prometteuse pour une thérapie anti-tumorale spécifique de réactivation de la protéine mutée (voir paragraphe IV.D. ci-dessous).

#### IV.D. Thérapies anti-cancéreuses ciblant la voie p53

L'efficacité des chimiothérapies par des agents anti-cancéreux (doxorubicine, cisplatine) et des irradiations gamma reposent en partie sur la réponseaux dommages à l'ADNdépendante de p53. Ainsi, des mutations dans la voie p53 conduisent souvent à une résistance de la tumeur à ces traitements. Des stratégies variées visent à restaurer la fonction de p53 ou à inhiber sa signalisation aberrante. La restauration de l'activité de p53 a pu être obtenue chez des patients, par exemple par l'introduction de p53 par un adénovirus<sup>181</sup>. Cette stratégie constitue une preuve de principe pour lesthérapies géniquesvisant à restaurer p53, mais les patients traités développent des métastases, réduisant ainsi l'efficacité de ces thérapies. D'autres approches exploitent plutôt le statut des mutations de p53 puisque dans la plupart des tumeurs le gène *TP53* est muté et que la protéine résultante s'accumule sous sa forme inactive et peut même avoir des propriétés oncogéniques. Dans ces cas, des drogues sont administrées qui induisent la conformation sauvage de la protéine et restaure son activité ainsi que sa dégradation pour éviter ses effets délétères ou son interaction non désirée avec des partenaires <sup>182</sup>.

Par exemple, des études de criblage *in silico*d'une librairie de peptideset par cristallographie ont permis d'élaborerdes molécules dérivées du carbazole (comme PhiKan083), qui fixent la cavité créée par la mutation « *hotspot* » Y220C du DBD<sup>183</sup>. Cette liaison augmente la température de dénaturation du DBD et diminue son agrégation, pouvant ainsi restaurer la fonction de la protéine sauvage *in vitro*. Des molécules dérivées comme le PK7088, ont été testées dans les lignées humaines de cellules cancéreuses portant la mutation<sup>179</sup>. Des modifications chimiques (rajout de groupes halogénés, études de la plasticité structurale par cristallographie dynamique en présence de différents ligands) sont toujours en cours afin de stabiliser ces molécules, de diminuer leur constante de dissociation et d'obtenir ainsi des composés biologiquement actifs <sup>184</sup>. Ces composés sont donc très prometteurs en matière de stratégie thérapeutique ciblée et spécifique de la protéine p53 mutée. Leurs effets secondaires sont présumés minimes en raison de l'éloignement de la cavité visée du reste de la structure fonctionnelle. Ainsi, ils doivent cibler spécifiquement une région qui n'est pas en contact direct avec l'ADN<sup>49</sup>. Cependant,leur étude *in vivo* est importante pour valider leur efficacité et spécificité mais aussi pour évaluer leur toxicité dans des modèles pré-cliniques.

D'autres molécules permettent d'inhiber les interactions oncogéniques de la p53mutée en empêchant par exemple son interaction avec p63 ou p73, ce qui conduit à un effet antitumoral illustré par la régression de tumeurs xénogreffées chez la souris <sup>181</sup>.Concernant les mutations non-sens de p53 conduisant à une protéine tronquée, des thérapies à base d'antibiotiques permettent l'expression de la p53 pleine longueur mais à partir de la séquence mutée du gène TP53<sup>171</sup>.Par ailleurs, dans les tumeurs exprimant une p53 WT, la fonction de p53 est souvent compromise par différentes altérations conduisant souvent à l'augmentation d'activité de ses principaux inhibiteurs MDM2 et/ou MDM4. Ces tumeurs sont déficientes dans leur capacité à activer p53 en réponse au stress et présentent une dégradation excessive de p53, notamment par MDM2. Dans ce type de tumeurs, les stratégies consistent à cibler ces régulateurs par de petites molécules qui miment le peptide p53 par exemple et qui vont interagir avec la cavité hydrophobe de MDM2, agissant ainsi par encombrement stérique<sup>181</sup>.La Nutlin3fait partie de ces molécules qui stabilisent et activent p53, mais son action unique n'est pas suffisante pour la régression tumorale. Sa combinaison à d'autres thérapies, comme des inhibiteurs des kinases CDK (par DRB et roscovitine par exemple), sensibilise p53 à la réponse à la Nutlin<sup>185</sup>. Ces thérapies réactivant p53(Tableau 1) sont utilisées avec précaution à cause des effets toxiques de l'activation de p53 sur les cellules non-tumorales. La stabilisation de certains peptides par des hydrocarbones (méthodede « peptide stapling ») permet d'augmenter l'efficacité de ces traitements mais présentent des limites notamment en raison de leur coût élevé et de leur risque de précipitation.

Molécule		Action	Cible	Test
Advexin, Gendicine ou SCH58500	Adénovirus	Thérapie génique		patients
Inhibition de miR-17/20a	Létalithé syntétique	Cibler les cellules tumorales inactivées pour p53 et Rb	cellules du retinoblastome	in vivo
Peptide 46	Peptide issu du domaine C-terminal de p53	Restaurer l'activité de plusieurs mutants « hotspot »	p53 mutée (hotspot)	in vitro et in vivo
Chetomin	Petite molécule naturelle	Restaurer la conformation de p53R175H via HSP40	p53 mutée (p53R175H)	in vitro et in vivo
CDB3	Petit peptide	Lier le DBD de la p53 mutée et restaurer le repliement	p53 mutée	in vitro et in cellulo
Ganetespib	Inhibiteur des chaperones HSP90	Compromettre la stabilité de la p53 mutée	p53 mutée	
SAHA	Inhibiteur des histones déacétylases	Dégradation de la p53 mutée	p53 mutée	phase II d'essai clinique
Cetuximab	Inhibiteurs de EGFR	Réduire le potentiel invasif de la p53 mutée	cellules tumorales mutées pour p53	
PRIMA-1, APR-246 ou MIRA-1	Petites molécules (crible cellulaire)	Induire le repliement de la p53 mutée et augmenter l'expression de plusieurs gènes cibles de p53	p53 mutée	cellules tumorales humaines et les xénogreffes murines
RITA	Petites molécules (crible cellulaire)	Induire un changement conformationnel et empêcher l'interaction de régulateurs négatifs	p53 mutée	
CP-31398 ou STIMA-1	Petites molécules	Lient des résidus cystéine du DBD et réactivent la p53	p53 mutée (et sauvage)	
PhiKan083 ou PK7088	Petites molécules (crible in silico)	Fixer la cavité créée par la mutation « hotspot » Y220C et restaurer la conformation du DBD	p53 mutée (p53Y220C)	in vitro etsur cellules tumorales humaines
Gentamicine ou G418	Antibiotiques	Expression de la p53 pleine longueur à partir d'une séquence portant une mutation non-sens	p53 mutée tronquée	
RETRA	Petites molécules	Inhiber le complexe oncogénique p53mutée/p73	p53 mutée	xénogreffes chez la souris
Nutlin3 ou MI-888	Petites molécules mimétiques du peptide p53	Interagir avec la cavité hydrophobe de Mdm2 et inhiber la dégradation de p53	Interaction p53WT-Mdm2	xénogreffes chez la souris
RG7112	Petite molécule antagoniste de Mdm2	Bloquer la poche de liaison de p53 à Mdm2	Mdm2	phase I d'essai clinique
HLI98C ou MEL23/MEL24		Inhiber Mdm2 et bloquer son activité E3 ligase	Mdm2	
XI-100 ou SJ-172550	Petites molécules antagonistes de Mdm4	Bloquer la transcription de Mdm4 ou son site de liaison à p53	Mdm4	
Pep3	Peptide mimetique du C-ter de Mdm4	Bloquer la liaison de p53 à Mdm2 et à Mdm4	Mdm2 et Mdm4	in vitro
ATSP-704	Peptide (stapled)	Bloquer la liaison de p53 à Mdm2 et à Mdm4	Mdm2 et Mdm4	in vitro et in vivo sur tumeurs amplifiées pour M2/M4
RO-5963	Petite molécule	Formation de dimères Mdm2-Mdm4 incapables de lier p53	Mdm2 et Mdm4	in vitro sur cellules tumorales humaines

Tableau 1 : Récapitulatif de quelques exemples de thérapies anti-tumorales ciblant la voie p53.Données extraites de réf.<sup>171,181,182,184,186-190</sup>

Les cellules tumorales développent une dépendance à la p53mutée pour leur survie, leur prolifération et leur potentiel invasif. Des stratégies alternatives de létalité synthétique consistent à exploiter la vulnérabilité des cellules tumorales imposée par les altérations de la voie de signalisation de p53. Par exemple, dans les tumeurs déficientes pour p53, l'inhibition d'ATM peut les sensibiliser à la chimiothérapie génotoxique par des inhibiteurs de topoisomérase. Ainsi, les dommages à l'ADN non réparés induisent une catastrophe mitotique et donc la mort des cellules tumorales. De plus, des stratégies de létalité synthétique reposent sur l'inactivation de miRNAs ciblant spécifiquement les cellules tumorales selon le statut de p53 ou d'autres suppresseurs de tumeurs<sup>189</sup>.De plus, certaines p53mutées induisent l'effet Warburg par exemple chez les souris p53<sup>R172H/R172H</sup> via RhoA/ROCK, et l'inhibition de cettesignalisation peut contrecarrer cet effet. Enfin, le potentiel invasif de la p53 mutée peut être dû à la signalisation EGFR et des inhibiteurs de l'EGFR peuvent alors agir spécifiquement sur les cellules tumorales mutées pour p53<sup>182</sup>.Par ailleurs le statut de certaines isoformes de p53 (comme les isoformes tronquées du CTD) est corréléàcertaines réponses, comme la réponse à la chimiothérapie <sup>191</sup>. De plus, des ratios d'expression d'isoformes spécifiques sont des marqueurs de mauvais pronostic et des stratégies ciblant les facteurs qui les régulent peuvent être envisagées pour limiter la progression tumorale <sup>17</sup>. De plus, l'activation de l'immunité anti-tumorale semble importante pour l'efficacité des thérapies conventionnelles <sup>192</sup>.

De par la complexité de la voie p53, la combinaison de plusieurs stratégies thérapeutiques semblenécessaire pour espérer obtenir des résultats en clinique. Ces stratégies conduisent souvent à des effets secondaires comme le développement de tumeurs secondaires ou encore l'acquisition d'une résistance aux traitements. Certaines de ces molécules peuvent aussi avoir des effets indésirables en raison de leur action non spécifique comme par exemple l'inhibition de ligases non spécifiques dans le cas des stratégies ciblant MDM2. De plus, la plupart de ces approches présentent des toxicités dues à l'activation systémique de p53, à l'effet dominant négatif de la p53mutée sur la p53 WT réintroduite ou à l'hétérogénéité phénotypique des différentes p53mutées.Ainsi, « les thérapies anti-tumorales doivent être façonnées au statut de p53 propre à chaque tumeur » <sup>193</sup>.

### V. p53 : émergence d'autres fonctions

#### V.A. Fonctions physiopathologiques

Outre son rôle majeur et crucial dans la suppression tumorale, p53 est impliquée dans d'autres processus physiologiques et pathologiques. p53 joue notamment un rôle clé dans la protection de la peau à l'exposition aux UV, via son rôle dans la pigmentation.En effet, il induitl'expression de POMC, un complexe contenant  $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -Melanocyte-Stimulating Hormone),qui active le facteur de transcription des mélanocytes MITF. Par ailleurs, certaines études montrent que p53 peut modérer la réponse immunitaire innée en inhibant la voie NF- $\kappa$ B. p53 peut également restreindre la longévité et promouvoir le processus de vieillissement. Enfin, p53 régule la prolifération et la différentiation des cellules souches, ainsi que le métabolisme cellulaire et la respiration mitochondriale, des fonctions liées à son rôle de suppresseur de tumeur <sup>19</sup>(voir paragraphe IV.A.).

En plus de ces effets protecteurs, un domaine émergeant de la recherche sur p53 est que cette protéine, à l'état sauvage peut être impliquée dans certaines pathologies. Ainsi, l'activation de p53 entraîne certains des phénotypes délétères des accidents vasculaires et cérébraux, des maladies neuro-dégénératives et des effets génotoxiques de la thérapie antitumorale. En effet, en plus de l'induction de ses gènes cibles canoniques, p53 peut réguler, souvent au niveau basal non induit, un nombre additionnel de gènes impliqués dans des processus cellulaires variés. Par exemple, dans les modèles animaux de la maladie de Parkinson, la perte de l'expression de la protéine DJ-1 conduit à une augmentation des niveaux de p53, résultant en une mort des cellules neuronales. De la même façon, une déficience en activité de la protéine parkine, un facteur de transcription qui peut réprimer p53, aggrave le phénotype de mort cellulaire chez les patients atteints de maladie de Parkinson. Durant le développement de la maladie de Huntington, l'induction de p53 par la voie des dommages à l'ADN contribue à la mort cellulaire. Des études associent également l'induction de p53 à la mort neuronale dans la maladie d'Alzheimer. L'induction de p53 par les dommages à l'ADN contribue aussi aux effets secondaires de la radiothérapie et de la chimiothérapie et à leur toxicité cellulaire. Par ailleurs, l'apoptose p53-dépendante induite par l'ischémie et l'infarctus cardiaque, contribue aux lésionstissulaires associées à ces maladies. Récemment desmodèles murins ont permis de montrer que p53 peut médier certains effets pathologiques de l'inflammation chronique<sup>19</sup>. L'activation de p53 est également impliquée dans certaines maladies génétiques comme la DBA (Diamond Blackfan Anemia)<sup>24</sup>. Des études récentes suggèrent le rôle de variations génétiques au locus p53 et de l'instabilité génomique de la région 17p13.1, dans la prédisposition à certaines maladies comme l'obésité, le diabète de type 2 et l'autisme <sup>194,195</sup>.

p53 joue également un rôle au cours du développement embryonnaire. En effet, certaines souris invalidées pour le gène Trp53 (p53KO) présentent un phénotype d'exencéphalie embryonnaire létale affectant 23% des embryons femelles p53<sup>KO</sup>, suggérant un rôle de p53 dans la fermeture du tube neural probablement par l'induction de l'apoptose <sup>196</sup>. p53 est également capable de contrôler l'implantation de l'embryon en régulant l'expression du gène LIF (Leukaemia-Inhibitory Factor), ce qui explique la petite taille des portées des souris p53<sup>KO</sup>. De plus, l'étude d'un modèle murin exprimant de facon concomitante, une p53 WT et une p53 extrêmement stable mais transcriptionnellement inactive, a montré que l'activation inappropriée de la p53 WT dans ce contexte entraîne le syndrome CHARGE caractérisé par des anomalies du développement et une létalité embryonnaire (plus tardive que celle causée par la perte des régulateurs de p53)<sup>39</sup>. Par ailleurs, p53 est exprimée dans les cellules souches hématopoïétiques (Hematopoietic Stem Cells ou HSCs) et régule leur quiescence et leur auto-renouvèlement. Dans certaines conditions, l'inhibition de p53 peut permettre la prolifération des HSCs et accélérer la reconstitution de la moelle osseuse sans compromettre la pluripotence de ces cellules. Cependant, une augmentation excessive du niveau de p53 ou une p53 constitutivement active (souris transgéniques ou KI par exemple) résulte en une perte des cellules souches adultes dans plusieurs tissus, dont la moelle osseuse, et peut entraîner un phénotype de vieillissement. Ce rôle d'inhibition de l'auto-renouvèlement par p53 concerne également les cellules souches neurales et mammaires ainsi que les iPS (induced Pluripotent Stem cells)<sup>197</sup>. Dans l'intestin de la souris, p53 peut jouer un rôle dans la différentiation des cellules souches en cellules caliciformes, dans certaines conditions comme le défaut des ribosomes <sup>139</sup>. Ainsi l'activité de p53 peut être bénéfique ou néfaste selon le contexte, d'où l'intérêt de la régulation fine de p53.

### V.B. Les syndromes d'insuffisance médullaire

Les syndromes d'insuffisance médullaire héréditaire (*Inherited Bone Marrow Failure Syndrome*ou IBMFS) sont un groupe de maladies rares, biologiquement distinctes mais qui partagent des ressemblances cliniques. Cette famille hétérogène comprend des maladies génétiques complexes : la dyskératose congénitale (DC), l'anémie de Fanconi (FA), l'anémie de Blackfan-Diamond (DBA), le syndrome de Shwachman-Diamond (SDS), la

thrombocytopénie avec aplasie radiale (TAR), la thrombocytopénieamégacaryocytaire congénitale (CAMT) et la neutropénie congénitale sévère (SCN). Ces syndromes sont tous caractérisés par ladiminution importante, dans la moelle osseuse, d'au moins une des trois lignées hématopoïétiques (érythrocytes, leucocytes et plaquettes). Le plus souvent les trois lignées sont atteintes, d'oùune pancytopénie (anémie, leucopénie et thrombocytopénie). Ces syndromes sont également caractérisés par des malformations physiques, plus ou moins spécifiques de chaque maladie, et par une prédisposition au cancer. Dans certains de ces syndromes, les désordres hématologiques peuvent apparaître dès la période néonatale comme pour laneutropénie congénitale sévère. Pour les autres syndromes, comme la dyskératose congénitale ou l'anémie de Fanconi, lespatients développent une cytopénie plus tardive mais peuvent présenter dès la naissance des anomalies congénitales et des malformations caractéristiques. De nombreux gènes responsables de ces syndromes ont été identifiés, notamment ceux impliqués dans le métabolisme des télomères pour la dyskératose congénitale, dans la réparation de l'ADN pour l'anémie de Fanconi ou encore dans la biogénèse des ribosomes pour l'anémie de Blackfan-Diamond et le syndrome de Shwachman-Diamond (Tableau 2). Cependant il reste un grand nombre de patients atteints d'aplasie médullaire idiopathique dont la cause génétique n'est pas identifiée<sup>198,199</sup>.

Syndrome	Manifestations hématologiques	Traits caractéristiques majeurs	Voies impliquées	Gène(s)	Hérédité
Dyskeratose Congenitale (et Syndrome Hoyeraal-Hreidarsson)	Très rare, pancytopénie, fibrose pulmonaire	Hyperpigmentation cutanée, dystrophie unguéale, leucoplasie orale, cœur hypertrophique, petite taille, atrophie testiculaire , hypoplasie cérébelleuse	Maintenance des telomères	TERT, TERC, DKC1, NOP10, NHP2, WRAP53/TCAB1, TINF2, ACD/TPP1, CTC1, RTEL1, PARN	AR, AD, RX
Anémie de Fanconi	Très rare, pancytopénie	Hyperpigmentation cutanée avec táches café-au-lait,petite taille, microcéphalie, anomalies du pouce et raduis (hypoplasiques, bifides, rudimentaires), anomalies rénales	Réparation des ponts inter- brins de l'ADN	FANC : A , B, C, D1/BRCA2, D2, E, F, G/XRCC9, I, J/BACH1/BRIP1, L, M, N/PALB2, O/RAD51C, P/SLX4, Q/ERCC4, R/Rad51, S/BRCA1, T/UBE2T	AR, RX
Anémia de Diamond-Blackfan	Anémie macrocytique, non chromatique avec retuculocytopénie	Retard de développement prénatal, petite taille, malformation craniofaciale, des lèvres et/ou du palais, pouces malformés	Biogenèse des ribosomes	RP519, RP517, RP524, RPL35A, RPL5, RPL11, RP57, RPL26, RP526, RP510, RP529 GATA1	AR, AD, RX
Syndrome de Shwachman-Diamond	Neutropénie	Petite taille, insuffisence pancreatique exocrine, dyspepsie chronique, anomalies du squelette	Maturation des ARN ribosomiques	SBDS	AR

# Tableau 2 : Caractéristiques cliniques et génétiques des principaux syndromes d'insuffisance médullaire.

Le diagnostic précoce de ces syndromes peut être difficile alors qu'il est crucial pour l'administration des bons traitements, l'anticipation des complicationset le conseil génétique des familles. Comprendre les bases moléculaires qui différencient ces syndromes permettrait de mieux les diagnostiquer et de développer de meilleurs traitements. Des perturbations dans certaines des voies cellulaires responsables de ces maladies peuvent induire la voie p53. En effet, l'érosion des télomères, l'accumulation de dommages à l'ADN ou encore un défaut de biogénèse des ribosomes, qui sous-tendent les syndromes de DC, FA et DBA/SDS respectivement, constituent des stress cellulaires en amont de l'activation de p53. Au cours de ma thèse, j'ai pu établir un nouveau lien entre les voies du métabolisme télomérique et de la réparation de l'ADN d'une part et le « gardien du génome » p53 d'autre part (Articles n°3 et 4).

#### V.B.1 Les syndromes télomériques

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques qui protègent les extrémités des chromosomes de la dégradation et des fusions chromosomiques. Ils sont donc essentiels pour le maintien de l'intégrité génomique. Au cours des divisions cellulaires successives, la réplication incomplète des télomères entraîne leur raccourcissement, jusqu'à atteindre une longueur critique. En effet, les télomères raccourcissent de 50 à100 paires de bases(pb) à chaque division cellulaire in vitro et de 20 à 30 pb environ par an dans les cellules sanguines périphériques. Ces chiffres sont variables selon les facteurs environnementaux et génétiques. Ce raccourcissement progressif interfèreavec la protection des extrémités des chromosomes de par l'incapacité des télomères trop courts à former les structures topologiques protectrices (*T-loop*) ou par le défaut de recrutement de protéines protectrices (*shelterin*). Finalement cette longueur critique compromet la capacité des télomères à inhiber la machinerie de reconnaissance des dommages à l'ADN. Ceci induit des foyers de dommages au niveau des télomères (Telomere dysfunction-Induced Foci ou TIFs), qui activent la voie p53, conduisant à un arrêt définitif de la prolifération cellulaire appelé sénescence réplicative<sup>200</sup>ainsi qu'à une réponse apoptotique <sup>201</sup>. Les cellules avant ainsi atteint leur nombre limite de divisions cellulaires (appelé «Hayflick limit») activent ce processus de sénescence responsable du phénomène de vieillissement cellulaire, mais aussi de protection anti-tumorale. La longueur des télomères constitue donc une « horloge mitotique » des cellules. La télomérase, une ribonucléo-holoenzyme qui contient l'activité catalytique de la réverse transcriptase TERT et son ARN matrice TERC, est capable de rajouter des séquences télomériques au brin 3' des télomères dans les cellules qui l'expriment. Chez l'Homme, ces cellules sont rares et se limitent aux cellules souches embryonnaires, certaines cellules souches adultes, quelques cellules somatiques (telles les lymphocytes activés) et la plupart des cellules cancéreuses<sup>202</sup>. L'importance de la télomérase dans l'oncogenèse est soulignée par l'identification de mutations activatrices, récurrentes dans les cancers humains, au niveau du promoteur du gène TERT. Le résultat du dérèglement du métabolisme des télomères est soit l'immortalité

réplicative (une des caractéristiques du cancer) dans le cas d'un maintien perpétuel(par la réactivation de la télomérase ou via un mécanisme alternatif appelé ALT), soit des téloméropathies dans le cas d'un défaut de maintenance<sup>203</sup>. Ces téloméropathies(ou syndromes télomériques) sont un groupe de maladies génétiques dont la plupart sontcaractérisées par un raccourcissement télomériqueexcessif. Elles comprennent des syndromes hétérogènes mais imbriqués allant des manifestations d'aplasie médullaire et/ou de fibrose pulmonaire à des maladies complexes comme la dyskératose congénitale ou ses formes plus sévères, et sont responsables d'une mort précoce due à l'insuffisance médullaire <sup>204</sup>.

La dyskératose congénitale (DC) est un syndrome d'insuffisance médullaire causée par des mutations germinales entraînant un défaut dans la biologie des télomères<sup>204</sup>. La DC est diagnostiquée par la triade classique : hyperpigmentation cutanée, dystrophie unguéale et leucoplasie orale<sup>205</sup>. Certains patients souffrant de DC ne développent pas cette triade diagnostique, mais présentent un risque élevé d'insuffisance médullaire affectant les trois lignées du sang (pancytopénie), une fibrose pulmonaire, des maladies du foie (cirrhose et fibrose) et des cancers. Il peut s'y associer une nécrose vasculaire des têtes fémorales ou de l'humérus, une sténose de l'œsophage, de l'urètre ou du canal lacrymal, ainsi que des retards du développement (petite taille, atrophie testiculaire, hypoplasie cérébelleuse et cœur hypertrophique)<sup>200,206</sup>. Les patients DC sont prédisposés à plusieurs cancers, avec un risque de 40% à l'âge de 50 ans, comme les carcinomes de la sphère ORL et ano-génitale ainsi que des leucémies et des myélodysplasies<sup>207</sup>. L'aplasie médullaire est la cause principale de décès et existe chez 90% des patients de DC, mais peut se manifester tardivement chez certains patients, rendant le diagnostic difficile.La cytopénie peut toucher une seule lignée hématopoïétique puis progresser vers une pancytopénie et une aplasie sévère. Le diagnostic clinique peut être difficile à cause de l'hétérogénéité phénotypique, la variabilité de l'âge d'apparition des symptômes et la présence de différents variants de DC<sup>199</sup>.

La caractéristique commune aux patients souffrants de téloméropathies est la présence d'undysfonctionnement dans la maintenance des télomères résultant de mutations germinales dans des gènes clés du métabolisme télomérique. Souvent, la longueur des télomères est inférieure au premier percentile d'âge dans les leucocytes et est mesurée pour valider le diagnostic de DC<sup>199,208</sup>. Ainsi, en cas de doute sur la maladie gouvernant l'insuffisance médullaire, la petite taille des télomères peut trancher le diagnostic en faveur d'une forme de DC (téloméropathies). La DC est traitée par transplantation de cellules souches hématopoïétiques (HSCT) ou par des androgènes (avec un taux de réponse entre 50 et

70%).Ces traitements peuvent être à l'origine de complications secondaires, comme la fibrose pulmonaire en cas de HSCT ou des tumeurs du foie après le traitement par des androgènes 209,210

D'autres syndromes très rares présentent des similitudes avec la DC comme le syndrome de Hoyeraal-Hreidarsson (HHS), le syndrome de Revesz (RS) et le syndrome de Coats Plus (CPS)<sup>200</sup>. Pour ces syndromes, les complications hématologiquesapparaissent très tôt chez l'enfant et peuvent se manifester même chez les nouveau-nés. Dans ces cas, les enfants développent entre autres une hypoplasie cérébelleuse, des retards développementaux et une immunodéficience<sup>199</sup>. HHS est une forme sévère de DC caractérisée en plus par un retard de développement intra-utérin, une hypoplasie cérébelleuse et une microcéphalie.Les enfants HHS présentent des télomères très courts et un fort taux de mortalité <sup>211</sup>. Les rares patients de RS présentent les symptômes de HHS ainsi que des rétinopathies exsudatives alors que des patients CPS peuvent présenter en plus des calcifications du cerveau<sup>200</sup>.Plus intéressent, certains patients CPS ne présentent pas des télomères courts <sup>212,213</sup>, indiquant que le dysfonctionnement télomérique est plus complexe dans certaines téloméropathies.

Chez l'Homme, les télomères sont constitués de répétitions hexa-nucléotidiques en tandem TTAGGG de 5 à 15 kb double brins sauf pour l'extrémité 3' qui est simple brin (Goverhang ou G-tail) et qui constitue le substrat de la télomérase. Cet ADN simple brin s'hybride à l'amorce du composant ARN de la télomérase (TERC ou TR), permettant à l'enzyme TERT de synthétiser plusieurs répétitions télomériques de par son caractère très processif<sup>203</sup>. L'unité catalytique minimale de la télomérase consiste en l'enzyme TERT(Telomerase Reverse Transcriptase) et sa matrice ARN TERC (Telomerase RNA Component). TERC est un snoRNA (small nucleolar RNA) qui se localise aux corps de Cajal (Cajal Bodies ou CBs) par son interaction (en complexe avec TERT) avec la protéine TCAB1 via la CAB-box. La localisation la télomérase aux CBs est nécessaire pour son bon trafic et sa mobilisation.Par ailleurs, TERC contient un motif H/ACA qui lie les snoRNPs dyskerin (DKC1) et GAR1 (qui sont également impliquées dans la biogénèse des ribosomes) ainsi que NOP10 et NHP2.Ces protéines font partie du complexe de la télomérase et jouent un rôle dans sa stabilisation et sa localisation nucléaire. De plus, l'ADN télomérique est lié par un groupe de protéines protectrices appelées « shelterin ». Le complexe shelterin humain compte 6 protéines : TRF1 et TRF2 (Telomere Repeat Factor 1 and 2), RAP1 (Repressor/Activator protein 1), TIN2 (TRF-Interacting Nuclear protein 2), TPP1 (TIN2-interacting protein 1) et POT1 (Protection Of Telomeres 1)<sup>204</sup>. Les protéines TRF1 et TRF2 lient spécifiquement les répétitions télomériques double brins. Elles jouent un rôle dans la suppression des dommages

à l'ADN et recrutent le reste du complexe *shelterin*. POT1 se lie à l'extrémité 3' simple brin et la protège de la machinerie de reconnaissance des dommages à l'ADN. Elle est reliée aux *shelterin* via TPP1 (qui participe au recrutement de la télomérase aux télomères) et TIN2 (qui sert de linker)<sup>203</sup>.

Les mutations les plus fréquemment observées dans les syndromes télomériques portent surles gènes codant pour les composés essentiels de la télomérase, notamment TERT, *TERC* et *DKC1*. De plus, des défauts de TCAB1 (codée par le gène *WRAP53* $\beta$ ) entraînent un phénotype de DC. En effet, des mutations germinales chez des patients DC ont été retrouvées dans la séquence du gène  $WRAP53\beta$  dont le locus code également le transcrit  $WRAP53\alpha$  qui stabilise p53<sup>203,214</sup>. Ces syndromes sont également causés par des mutations dans certaines shelterin (TPP1, TIN2et POT1) mais aussi dans le gène CTC1 (CST Telomere protection Component 1) qui fait partie du complexe CST<sup>204,213,215</sup>. Ce complexe qui comprend également STN1 (Suppressor of cdc Thirteen 1) et TEN1 (Telomeric pathway with STN1) joue potentiellement un rôle dans la synthèse du brin retardé. De plus, le gène TERF1 codant pour la shelterin TRF1 semble impliqué dans l'aplasie médullaire (une forme moins sévère de DC), mais ce lien reste à vérifier<sup>204</sup>. Par ailleurs, les télomères sont protégés de la machinerie de réparation en partie grâce à des boucles appelées « T-loop ». Ces structures topologiques doivent être relâchées pendant la réplication de l'ADN afin de prévenir leur excision par la nucléase SLX4 causant la perte rapide des télomères. Cette résolution des T-loop est assurée par l'hélicase RTEL1<sup>200</sup>. Des mutations ont récemment été trouvées dans le gène RTEL1 (Regulator of Telomere Elongation helicase 1) chez des patients souffrant deHHS<sup>211,216-</sup> <sup>218</sup>.Enfin, le gène PARNa récemment été trouvé muté chez des patients DC. Il code pour une 3'-exoribonuclease spécifique des poly(A) impliquée dans la déadénylation des ARNmà queue poly-A.Cette action de PARN peut entraîner la dégradation des ARNm par le système NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay). PARN est également impliqué dans la maturation de certains ARN non-codants dont les H/ACA-snoARNs<sup>219</sup>, comme TERC par exemple. L'implication de PARN dans la biologie des télomères est peu comprise au niveau moléculaire, mais les patients déficients pour PARN présentent une réduction dans les niveaux des transcrits de DKC1, RTEL1 et TERF1, ainsi qu'une augmentation de l'ARNm de p53<sup>220</sup> et un rôle de PARN dans la maturation de l'ARN TERC a récemment été montré<sup>221,222</sup>.

Au total, des mutations causales dans douze gènes ont été trouvées à ce jour chez des patients souffrant de téloméropathies : *TERT, TERC, DKC1, NOP10* et *NHP2* (complexe télomérase) ; *TPP1, TIN2* et *POT1* (complexe *shelterin*) ; *CTC1* (complexe CST) ;  $WRAP53\beta$ (TCAB1) ; et plus récemment *RTEL1* et *PARN* (Figure 13). Des mutations causales

dans de nouveaux gènes continuent d'être découvertes et des dizaines d'autres protéines sont impliquées dans le métabolisme des télomères. Ces protéines pourraient être mutées chez les patients pour lesquels aucune mutation n'a encore été identifiée (30% des patients DC).La compréhension des mécanismes moléculaires qui régissent le maintien des télomères est donc très importante pour l'étiologie de ces maladies.



Figure 13 : Schéma de la télomérase et des principales protéines impliquées dans la maintenance des télomères. Les gènes dont des mutations ont été retrouvées chez des patients souffrants de téloméropathies sont surlignés en rouge. Figure adaptée de réf.<sup>223</sup>

En plus des téloméropathies classiques causées par des mutations de gènes de maintenance des télomères, un nombre de syndromes non directement associés à la biologie des télomères présentent un phénotype de dysfonctionnement télomérique et sontappelés « téloméropathies secondaires ». Ils incluent des syndromes causés par des défauts dans la machinerie de réparation de l'ADN (qui pourrait interagir avec des composants télomériques) comme *FANCD2* (anémie de Fanconi) et *RECQL4* (syndrome de Rothmund-Thomson), oupar des mutations dans des gènes non reliés aux télomères comme *MPN1* et *DNMT3B*. Il n'est pas encore établi si le défaut télomérique est la cause ou une des conséquences de ces syndromes<sup>200</sup>.

Les mécanismes de maintenance des télomères chez la souris sont semblables à ceux de l'Homme, néanmoins avec quelques différences notamment dans la réponse aux

dommages à l'ADNet la régulation de la télomérase. Chez la souris de laboratoire, les télomères sont très longs et leur raccourcissement, secondaire à une absence de télomérase, n'apparaît qu'après plusieurs générations. Ainsi, les premières générations de souris déficientes en *mTerc*(mTR) ou *mTert*présentent un phénotype sauvage <sup>224,225</sup>. De plus, les souris mutées pour *Tinf2* ne présentent qu'un phénotype léger de DC après plusieurs générations <sup>226</sup>. De même, les souris déficientes pour la télomérase développent uniquement une fibrose pulmonaire en présence de dommages à l'ADN accrus, tout comme les souris dont les cellules alvéolaires du poumon sont délétées dugène*Terf1* <sup>227</sup>. Un moyen de modéliser la DC chez la souris dès la première génération a été de déléter *Pot1b* dans le contexte d'haploinsuffisance de la télomérase<sup>228,229</sup>. Les modèles murinsde DC, qui présentent un intérêt pour les études fondamentales et thérapeutiques de cette maladie, s'avèrent difficile à créer et nécessitentl'association de différents défauts de maintenancedes télomères notamment dans un composant du complexe *shelterin* et de la télomérase.

#### V.B.2. L'anémie de Fanconi

Une des lésions de l'ADN les plus cytotoxiques et clastogènes sont les pontages interbrins (*Interstrand CrossLinks* ou ICLs) qui sont des liaisons chimiques covalentes et donc très stables entre les brins opposés d'un filament d'ADN. La génotoxicité de ces lésions découle du fait qu'elles empêchent l'ouverture de la double hélice d'ADN, créant un obstacle à la transcription et, surtout, à la réplication du matériel génétique. Ces lésions sont créées par des agents pontant l'ADN endogènes, notamment les aldéhydes, ou exogènes d'origine naturelle comme la mitomycine C (MMC) ou chimique comme le cisplatine (utilisés dans les chimiothérapies). Le génome est constamment exposé à ce type de lésions que la cellule répare afin de prévenir les mutations, les cassures et la mauvaise ségrégation des chromosomes ainsi que les catastrophes mitotiques qui peuvent en découler. La cellule déclenche une réponse aux dommages à l'ADN (DDR) complexe, dont la voie Fanconiet la voie ATR/CHK1<sup>230</sup>.

Les défauts de réparation des ICLs peuvent causer l'anémie de Fanconi (FA) qui est une maladie génétique rare (incidence de 1/200000 à 1/400000) d'instabilité chromosomique<sup>231</sup>.Elle est causée par des mutations germinales des gènes codant pour les protéinesFANC de la voie Fanconi de réparation des dommages à l'ADN.Elle est associée à une myriade de caractéristiques cliniques dont les anomalies congénitales, l'insuffisance médullaire précoce et progressive qui entraîne une anémie sévère, et la prédisposition au cancer<sup>230</sup>. Les anomalies congénitales sont très variées et plus ou moins fréquentes : retard de croissance, anomalies du pouce (qui peut être absent, hypoplasique ou surnuméraire)et du radius, hyperpigmentation cutanée et/ou tâches café au lait, fertilité réduite, anomalies des reins, microcéphalie, microphtalmie, anomalies de l'appareil digestif et anomalies faciales. L'aplasie médullaire peut se développer à tout âge mais apparaît le plus souvent durant la première décennie. Elle peut affecter initialement une ou deux lignées hématopoïétiques et se présenter comme une cytopénie simple ou une pancytopénie <sup>199,232</sup>. Elle est liée chez ces patients à une réponse inflammatoire excessive et une apoptose médiée par TNF $\alpha$ , IFNy et les ROS<sup>233</sup>.Les patients peuvent également présenter une macrocytose et un niveau élevé d'hémoglobine fœtale. Cette atteinte médullaire est traitée par transfusion de globules rouges ou de plaquettes, par transplantation de cellules souches hématopoïétiques<sup>234</sup> ou par des androgènes (avec un taux de réponse de 50%). Les patients traités avec des androgènes présentent un risque élevé de développer des tumeurs du foie<sup>235</sup>. Outre la prédisposition auxmêmescancersobservés chez les patients DC (le plus souvent des myélodysplasies, des leucémies myéloïdes aigues et des carcinomes de la sphère ORL) les patients FA présentent également un risque élevé de développer des carcinomes de la peau, du tube digestif et génitaux <sup>199,230</sup>. De plus, les patients du groupe FANCD1 exprimant des mutations bialléliques du gène BRCA2, présentent un risque très élevé de leucémies aigues précoces, de tumeurs cérébrales et de tumeurs du rein chez les enfants (tumeurs de Wilms)<sup>236</sup>.

Le diagnostic le plus précoce possible de l'anémie de Fanconi est nécessaire pour une prise en charge rapide, la prévention et le conseil génétique des familles. Cependant, 30% des patients FA ne présentent pas les traits pathognomoniques (malformations physiques) et le diagnostic de la maladie est retardé voire confondu avec une DC, d'autant plus que certains patients peuvent présenter des défauts des télomères. Ainsi, le diagnostic nécessite une série d'examens cliniques et cytogénétiques combinés à l'étude de l'histoire familiale. Le test diagnostique pour l'anémie de Fanconi est la détection d'une augmentation des aberrations chromosomiques (cassures ou formes radiales des chromosomes, échanges entre chromatides sœurs) dans des cellules en culture traitées avec un agent induisant des ICLs, comme le diepoxybutane ou la mitomycine C. Dans certains cas cette analyse peut s'avérer peu concluante à cause d'un mosaïcisme somatique des cellules du sang périphérique, ce qui complique le diagnostic. Ce mosaïcisme phénotypique résulte le plus souvent d'une réversion génétique dans certaines cellules Fanconi, consistant avec le mode de transmission récessif de cette maladie<sup>237</sup>. Dans ce cas le test est réalisé sur des fibroblastes de la peau qui ne présentent pas ce mosaïcisme <sup>209,210</sup>.

Au jour de l'étude, dix-neuf gènes FA ont été identifiés et les mutations dans ces gènes sont responsables de 95 % des cas de FA. Les dix-neuf protéines peuvent être divisées en trois groupes selon leur fonction dans la voie : le complexe central ou « core complex », le complexe ID2 et le complexe effecteur (Figure 14). Le complexe central joue un rôle dans la reconnaissance des ICLs. Il est formé par huit protéines FANC : FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL et FANCM, et trois protéines associées : FAAP24, FAAP20 et FAAP100 (notées 24, p20 et p100 sur la Figure 14). De plus, BLM, TOPOIIIA et RPA interagissent avec FANCA, C, E, F et G pour former le complexe BRAFT qui joue un rôle potentiel dans cette voie, étant donné que la déficience de BLM entraîne une hypersensibilité à la mitomycine C. Par ailleurs, les protéines MHF1 et 2, liant FANCM, sont recrutées aux fourches de réplication bloquées par les ICLs. Le complexe central ainsi que l'enzyme FANCT (UBE2T) sont responsables de la monoubiquitination du complexe FANCD2/FANCI, l'enzyme catalytique étant FANCL qui est une E3 ligase. Le complexe ID2 monoubiquitiné qui orchestre le recrutement des effecteurs est crucial pour la réparation des ICLs. Les protéines effectrices sont FANCD1 (BRCA2), FANCJ (BRIP1), FANCN (PALB2), FANCO (RAD51C), FANCP (SLX4), FANCQ (XPF), FANCR (RAD51) et FANCS (BRCA1).De plus, BRCA1, BRCA2, BRIP1, PALB2, RAD51 et RAD51C jouent aussi un rôle essentiel dans la recombinaison homologue, un mécanisme important pour la réparation des ICLs par la voie Fanconi, Par ailleurs, FANCJ (BRIP1) est une hélicase qui interagit avec BLM et joue un rôle potentiel dans la réponse au stress réplicatif. FANCP (SLX4)est une nucléase qui interagit avec XPF/ERCC1, MUS81/EME1 et SLX1 et dont l'interaction avec XPF semble importante pour défaire les ICLs<sup>230</sup>.

En plus des dix-neuf protéines FANC et des protéines associées, d'autres protéines ont été impliquées dans la réparation des ICLs, comme UHRF1, FAN1 et SNM1A. Par ailleurs, FANCD2 monoubiquitinée peut recruter FAN1 ainsi que BLM, FANCJ et BRCA2, indépendamment du complexe central, pour la bonne progression de la fourche de réplication et la stabilité génomique. De plus, FANCD2, FANCI et BLM peuvent faciliter le relâchement des ponts (U*ltra-Fine Bridges* ou UFBs) d'anaphase en liant les sites fragiles communs, sources des UFBs, pour assurer la bonne ségrégation des chromosomes durant la mitose. Enfin, FANCD2 est dé-ubiquitinée par le complexe enzymatique USP1/UAF1, une étape importante pour sa remobilisation <sup>230</sup>. A noter que plus récemment un vingtième gène Fanc a été retrouvé muté chez des patients d'anémie de Fanconi (voir Discussion II.C.2.)



Figure 14 : Schéma de la voie Fanconi de réparation de l'ADN. Les protéines FANC retrouvées mutées, à ce jour, chez les patients souffrant de l'anémie de Fanconi sont labélisées par une lettre. Figure adaptée de réf.<sup>238</sup>

Les souris déficientes pour une protéine FANC développent peu ou pas d'anomalies hématologiques spontanées. Le phénotype d'insuffisance médullaire peut être induit par des agents pontant comme la mitomycine C, mais ces souris KO ne présentent pas toutes les caractéristiques Fanconi. De plus, leur moelle est incapable de reconstituer le pool de cellules sanguines chez des souris receveuses irradiées<sup>239</sup>.

Une relation entre la voie Fanconi et p53 découle du fait que les dommages à l'ADN activent la voie p53 qui induit une réponse cellulaire antiproliférative (voir paragraphe IV.A.). En effet, p53 est le régulateur majeur de l'induction de la mort cellulaire induite par les dommages à l'ADN  $^{35,118}$ . Des études ont montré que les cellules (de patients ou murines) déficientes pour un des composants de la voie Fanconi (notamment FANCD2 et FANCG), accumulant les dommages à l'ADN non réparés, induisent un arrêt du cycle en G1 p53-dépendant, et que l'activation exacerbée de p53 dans ces cellules « stressées » est probablement responsable du phénotype d'insuffisance médullaire. De plus, la délétion de p53 peut réparer les défauts hématopoïétiques des cellules Fanconi humaines et murines. Cependant la perte de p53 accélère la formation de tumeurs chez les souris Fancd2<sup>-/-</sup> et Fancc<sup>-/-</sup>, suggérant une coopération entre les deux voies pour la suppression tumorale  $^{239}$ . Enfin il a été montré que p53 peut activer l'expression du gène *FANCC*<sup>240</sup>.

RESULTATS

Mes projets de thèse se sont articulés autour de deux aspects du suppresseur de tumeur p53. J'ai, d'une part, étudié son rôle anti-tumorale et des stratégies visant à réactiver sa voie *in vivo*. D'autre part, j'ai participé à la découverte de son implication majeure dans de nouveaux processus cellulaires tels ceux en jeu dans les syndromes d'insuffisance médullaire que je viens de présenter. Afin d'évaluer ces deux facettes de p53, j'ai participé à l'étude de plusieurs modèles murins à différentes étapes de leur analyse. Je présente dans la partie « Résultats » ces différentes études sous formes d'articles scientifiques.

J'ai créé au cours de ma thèse le modèle p53<sup>Y217C</sup> exprimant une p53 inactive pour les fonctions de suppression tumorale suite à une mutation particulière du domaine de liaison à l'ADN de ce facteur de transcription. Dans l'article n°2 « The mouse model p53<sup>Y217C</sup> exhibits acute gender specific embryonic lethality and an oncogenic gain of function » (manuscrit en préparation), je présente mon travail de création et d'analyse de ce modèle. Ce premier projet principal de thèse est toujours en cours et déjà bien abouti. Il a pour but d'évaluer in vivo les effets de cette mutation qui est fréquemment retrouvée dans les cancers humains, mais qui semble différente des autres mutations hotspot de p53 selon les études in vitro et de cristallographie. En effet, les résultats de l'analyse des souris p53<sup>Y217C/Y217C</sup> suggèrent un effet néomorphe de cette mutation. Les expériences futures nous permettront de déterminer le(s) mécanisme(s) de gain de fonction oncogénique conféré par cette mutation. Plus encore, l'intérêt de ce modèle murin est qu'il va nous permettre d'évaluer in vivo l'efficacité d'une stratégie thérapeutique anti-tumorale ciblée. La création et l'analyse d'un modèle murin étant un processus assez long, j'ai participé également aux étapes finales d'un projet visant à évaluer le potentiel thérapeutique des stratégies anti-tumorales ciblant MDM4, un régulateur négatif de p53, dans un contexte tumoral exprimant une p53 hypomorphe. Ce projet a abouti à une publication dans Oncogene (article n°1 « Mdm4 loss in mice expressing a p53 hypomorph alters tumor spectrum without improving survival») à la révision duquel j'ai participé. Concernant ce projet secondaire, j'ai notamment réalisé les expériences permettant de valider l'importance de la répression p21-dépendante dans la suppression tumorale via p53 et l'implication de ce mécanisme dans la résistance des tumeurs thyroïdiennes exprimant une p53 hypomorphe aux stratégies ciblant MDM4.

Mon second projet principal de thèse a consisté en l'analyse d'un modèle murin déjà établi dans notre laboratoire et exprimant une p53 hyperactive de par la délétion de son domaine Cterminal ou CTD (derniers 31 acides-aminés :  $p53^{\Delta 31}$ ). Ce modèle a ainsi permis à notre équipe de déterminer le rôle de régulateur négatif du CTD de p53 sur son activité. L'analyse plus poussée des souris  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$ a constitué une grande partie de mes travaux de thèse et m'a ainsi permis de co-signer deux publications dans *Cell Reports*(article n°3 « Mutant Mice Lacking the p53 C-Terminal DomainModel Telomere Syndromes ») et dans *Nature Communications* (article n°4 « p53 downregulates the Fanconi anemia DNA repair pathway »). Ces deux études complémentaires nous ont notamment permis de montrer que les souris  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$ modélisent le syndrome de dysfonctionnement télomérique dyskératose congénitale et que p53 est un régulateur négatif du métabolisme des télomères et de la voie Fanconi de réparation de l'ADN, des rôles insoupçonnés de ce « gardien du génome ».

### I. P53 ET CANCER

## Article n°1

### <u>Mdm4 loss in mice expressing a p53 hypomorph alters tumor spectrum</u> without improving survival.

Ming Fang, Iva Simeonova, Boris Bardot, Vincent Lejour, <u>Sara Jaber</u>, Rachida Bouarich-Bourimi, Aurélie Morin and FranckToledo.

#### Oncogene (2014) 33, 1336-1339

#### **Résumé :**

Le domaine riche en proline (PRD) contribue à la régulation de la stabilité de p53 et à sa capacité de transactivation. Des modèles murins ont été générés pour étudier le rôle du PRD *in vivo*. La délétion du PRD ( $p53^{\Delta P}$ ) entraîne une diminution de la capacité de transactivation et une augmentation de la régulation négative par MDM2. Les cellules  $p53^{\Delta P/\Delta P}$  présentent un défaut de l'arrêt du cycle cellulaire, mais une réponse apoptotique conservée <sup>42</sup>. La protéine  $p53^{\Delta P}$  agit donc comme une protéine hypomorphe. Nous avons utilisé ce modèle murin pour évaluer une stratégie thérapeutique basée sur un régulateur négatif de p53 : MDM4. Nous avons d'abord estimé la capacité de  $p53^{\Delta P}$  à supprimer des tumeurs induites par une mutation de Rb, puis étudié l'impact de la perte de MDM4 dans ce contexte oncogénique. De façon surprenante, les cohortes de souris  $Rb^{+/-} p53^{\Delta P/\Delta P}$  et  $Rb^{+/-} p53^{\Delta P/\Delta P}$  Mdm4<sup>-/-</sup> présentent des courbes de survie similairesmais des spectres de tumeurs différents. Les souris des deux génotypes développent fréquemment des carcinomes de la thyroïde, mais les adénomes hypophysaires, observés dans 80% des animaux  $Rb^{+/-} p53^{\Delta P/\Delta P}$ , ne sont détectés que dans 20% des souris  $Rb^{+/-}p53^{\Delta P/\Delta P}$  Mdm4<sup>-/-</sup>. Ainsi, dans ce modèle, l'absence de MDM4 a un effet antitumoral dans le cas des tumeurs hypophysaires, mais pas thyroïdiennes. Nous avons identifié des gènes cibles de p53 permettant d'expliquer cette observation et de démontrer l'importance de la répression de certains gènes par la p53 sauvage dans la suppression tumorale, notamment du gène *Plk1* impliqué dans le développement des tumeurs thyroïdiennes. Au cours de ma thèse j'ai participé de façon secondaire à cette étude et j'ai notamment réalisé les expériences permettant d'identifier ce dernier mécanisme d'action. Cette étude montre l'intérêt d'analyser en détail le statut de TP53 dans les tumeurs et le typede protéine p53 mutée afin d'élaborer des stratégies anti-tumorales efficaces et adaptées à chaque tumeur.

www.nature.com/onc

# SHORT COMMUNICATION Mdm4 loss in mice expressing a p53 hypomorph alters tumor spectrum without improving survival

M Fang<sup>1,2,3</sup>, I Simeonova<sup>1,2,3</sup>, B Bardot<sup>1,2,3</sup>, V Lejour<sup>1,2,3</sup>, S Jaber<sup>1,2,3</sup>, R Bouarich-Bourimi<sup>1,2,3</sup>, A Morin<sup>1,2,3</sup> and F Toledo<sup>1,2,3</sup>

The p53 pathway is inactivated in most human cancers, and its reactivation in tumors appears as a promising therapeutic strategy. Overexpression of Mdm4, a p53 negative regulator, occurs in a significant fraction of human cancers. Mouse models were used to evaluate the therapeutic potential of strategies against Mdm4, and encouraging results were obtained for tumor cells in which Mdm4 overexpression prevents wild-type p53 to exert its tumor suppressive functions. However, missense mutations in the p53 gene occur in about half of human cancers, and 15% of such mutations lead to the expression of a mutant protein that retains partial activity. In this report, we used mouse models to address the therapeutic potential of strategies against Mdm4 in tumors, decreased Mdm4 levels improved the survival of mice expressing wild-type p53, but not that of mice expressing p53<sup>ΔP</sup>, a p53 hypomorph lacking the proline-rich domain. Importantly, however, most Rb <sup>+/-</sup> p53<sup>ΔP/ΔP</sup> mice developped pituitary adenomas, but these tumors were rare in Rb <sup>+/-</sup> p53<sup>ΔP/ΔP</sup> Mdm4<sup>-/-</sup> minals, because Mdm4 loss led to increased p21 levels, a suppressor of pituitary tumor growth. On the contrary, Rb <sup>+/-</sup> p53<sup>ΔP/ΔP</sup> and Rb <sup>+/-</sup> p53<sup>ΔP/ΔP</sup> Mdm4<sup>-/-</sup> mice developped anaplastic thyroid carcinomas at equal frequencies. Importantly, wild-type p53 represses the *Plk1* gene, which encodes a promising therapeutic target in anaplastic thyroid negression this repression wild-type p53 may not work in cells expressing an hypomorphic p53. Furthermore, p53<sup>ΔP/ΔP</sup> Mdm4 levels are decreased. On the opposite, p53<sup>ΔP/ΔP</sup> more dwend when Mdm4 levels are decreased. On the opposite, p53<sup>ΔP/ΔP</sup> mediace transcriptional repression this is not improved by Mdm4 loss. In sum, depending on the tumor type, strategies against Mdm4 that work in cells expressing wild-type p53 may not work in cells expressing an hypomorphic p53. Furthermore, p53-mediated transcriptional repression should be considered when evaluating strategies to reactivate p53 in tumors.

Oncogene (2014) 33, 1336-1339; doi:10.1038/onc.2013.62; published online 11 March 2013

Keywords: p53; Mdm4; p21; Plk1; Rb

#### INTRODUCTION

npg

The p53 pathway is altered in most, if not all human tumors. Mutations in TP53, the gene encoding p53, are found in about half of human cancers, and at least 20% of the other tumors present an overexpression or an amplification of Mdm2 or Mdm4 (also known as Mdmx), which encode major negative regulators of p53.1,2 Strategies to reactivate p53 in tumors are thus attractive therapeutic approaches, because they might apply to a wide variety of cancers. In recent years, Mdm4 has emerged as a promising therapeutic target: reduced Mdm4 expression, achieved by decreasing Mdm4 gene dosage, or by using RNA interference or molecules that target Mdm4, were shown to suppress tumor growth in several studies.<sup>3–8</sup> Most of these studies were performed in cancer cells expressing a wild-type p53 protein and overexpressing Mdm4, so that inhibiting Mdm4 in these cells allowed an efficient recovery of p53 tumor suppressive functions. However, about 15% of TP53 missense mutations in human cancers lead to the expression of a mutant p53 with partial activity.<sup>1,9</sup> In this report, we wanted to determine if reducing Mdm4 levels in cells expressing an hypomorphic p53 mutant might improve tumor suppression and survival. We found that a decrease in Mdm4 levels improves the survival of mice expressing a wild-type p53, but is inefficient in mice expressing  $p53^{\Delta}$ an hypomorphic mutant p53. Thus, although one should be careful about extrapolating these conclusions to human cancers, our results indicate that strategies against Mdm4 that work in cells expressing wild-type p53 may not work in cells expressing a p53 hypomorph. Furthermore, they suggest that the capacity of p53 to act as a transcriptional repressor should be taken into account when evaluating the therapeutic potential of strategies aimed at reactivating p53 in tumors.

#### **RESULTS AND DISCUSSION**

In order to determine if targeting Mdm4 may improve the survival of animals expressing an hypomorphic p53, we used mice expressing p53<sup>AP</sup>, a p53 lacking its proline-rich domain.<sup>3</sup> p53<sup>AP/AP</sup> mice appeared as a tool of choice for this study, because unlike wild-type mice, they are viable in an Mdm4-deficient background. The p53<sup>AP</sup> protein is an inefficient transcriptional activator that has lost cell cycle control but reained a partial capacity to induce apoptosis. Although p53<sup>AP</sup> does not model a specific human cancer mutant, most hypomorphic p53 mutants reported in human tumors appear, like p53<sup>AP</sup>, to transactivate the pro-apoptotic *Bax* gene more efficiently than the cell cycle control gene p21 (Leroy *et al.*<sup>10</sup> and Supplementary Figure 1). Previous experiments showed that p53<sup>AP</sup> is a rather good suppressor of spontaneous tumors, because 90% of p53<sup>AP/AP</sup> mice remained tumor-free after 1 year. On the contrary, experiments with tumor xenografts indicated that p53<sup>AP</sup> is a poor suppressor of oncogene-

<sup>1</sup>Institut Curie, Centre de recherche, Genetics of Tumor Suppression, Paris, France; <sup>2</sup>UPMC Univ Paris 06, Paris, France and <sup>3</sup>Genetics of Tumor Suppression, CNRS UMR 3244, Paris, France. Correspondence: Professor F Toledo, Genetics of Tumor Suppression, UMR 3244, Institut Curie, Centre de recherche, 26, rue d'Ulm, Paris, 75248 Paris Cedex 05, France. E-mail: franck.toledo@curie.fr

Received 19 October 2012; revised 2 January 2013; accepted 7 January 2013; published online 11 March 2013

1337

induced tumors.<sup>3</sup> These observations led us to analyze the effects of Mdm4 loss on p53<sup>ΔP</sup> in a Rb<sup>+/-</sup> background to accelerate tumor onset, because germline Rb and p53 mutations were reported to exhibit cooperative tumorigenic effects.<sup>11</sup> To estimate the capacity of p53<sup>ΔP/ΔP</sup> mice to suppress tumors in a Rb<sup>+/-</sup> background, we first compared survival curves and tumor spectra in Rb<sup>+/-</sup>, Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>+/-</sup>, Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>-/-</sup> and Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>ΔP/ΔP</sup> mice. As shown previously,<sup>11</sup> we found that an haploinsufficiency or deficiency in p53 accelerates tumorigenesis in a Rb<sup>+/-</sup> background, and that Rb<sup>+/-</sup> and Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>+/-</sup> mice develop pituitary adenomas and thyroid carcinomas, whereas Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>-/-</sup> mice developped the same tumors, but also the thymic lymphomas and sarcomas typical of p53-deficient animals (Figures 1a and b). Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>ΔP/ΔP</sup> mice lived longer than Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>-/-</sup> mice, but died before Rb<sup>+/-</sup> or Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>+/-</sup> mice (Figure 1a). Furthermore, they developped pituitary adenomas nor sarcomas (Figure 1b, Supplementary Figure 2). In all the pituitary and thyroid tumors tested, p53<sup>ΔP/ΔP</sup> was still expressed (Figure 1c) and did not exhibit any mutation other than the

deletion of the proline-rich domain (data not shown). Together, the results indicated that  $p53^{AP}$  exhibited a weak but significant capacity to delay tumor onset in a Rb<sup>+/-</sup> background, suggesting that these genetic contexts were appropriate to evaluate the impact of decreased Mdm4 levels on an hypomorphic p53.

that these greater contracts were appropriate to evaluate the impact of decreased Mdm4 levels on an hypomorphic p53. Next, we compared the survival of Rb<sup>+/-</sup>, Rb<sup>+/-</sup> Mdm4<sup>+/-</sup>, Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>AP/AP</sup> Mdm4<sup>-/-</sup> and Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>AP/AP</sup> Mdm4<sup>-/-</sup> and Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>AP/AP</sup> Mdm4<sup>-/-</sup> mice. We observed that the loss of a single Mdm4 allele improved survival in a Rb<sup>+/-</sup> background, but that the loss of one or both Mdm4 alleles had no impact on survival in a Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>AP/AP</sup> context (Figure 2a). The only notable effect of decreased Mdm4 levels in a Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>AP/AP</sup> background was a change in tumor spectrum in Mdm4-deficient animals; while thyroid tumors were as frequent with or without Mdm4, Mdm4 loss led to a significant decrease in pituitary adenomas (Figure 2b). Previous analyses in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) showed that Mdm4 loss improves the transactivating capacity of p53<sup>AP,AP</sup>, leading to increased levels of several p53 target genes, including the cyclin-dependent kinase inhibitor p21.<sup>3</sup> p21 is known to have a major role in the senescence limiting pituitary tumor



**Figure 1.** Rapid development of pituitary and thyroid tumors in Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>ΔP/ΔP</sup> mice. (a) Rb<sup>+/-</sup>, p53<sup>+/-</sup> and p53<sup>ΔP/ΔP</sup> mice, described previously.<sup>3,21,22</sup> were intercrossed to generate cohorts of Rb<sup>+/-</sup>, Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>+/-</sup>, Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>-/-</sup> and Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>ΔP/ΔP</sup> mice, whose survival were followed for 650 days (cohort sizes are in parentheses). (b) The mice plotted in (a) were dissected when moribund or shortly after death and their tumors were classified. Tumor types could be assessed by gross necropsy, but a subset of each tumor type was confirmed histologically by using hematoxylin and eosin staining according to standard procedures.<sup>23</sup> All experiments were carried out according to IACUC regulations. (c) p53<sup>ΔP/ΔP</sup> is still expressed in pituitary and thyroid tumor cells from Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>ΔP/ΔP</sup> mice. Total RNA, extracted using nucleospin RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Germany), was reverse transcribed using superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Real-time quantitative PCRs were performed on an ABI PRISM 7500 using Power SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as recently described.<sup>24</sup> p53 mRNAs were quantified using real-time PCR, normalized to control mRNAs, then the amounts in tissues from p53<sup>ΔP/ΔP</sup> mice



Figure 2. Mdm4 loss suppresses most pituitary tumors in Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>AP/AP</sup> mice, but does not affect survival. (a) Survival curves of Rb<sup>+/-</sup>, Rb<sup>+/-</sup> Mdm4<sup>+/-</sup> Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>AP/AP</sup> Mdm4<sup>+/-</sup> and Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>AP/AP</sup> Mdm4<sup>-/-</sup> mice over 650 days. Mdm4<sup>+/-</sup> mice, a kind gift from JC Marine, were described previously.<sup>25</sup> The loss of one Mdm4 allele extended the survival of Rb<sup>+/-</sup> mice, but similar survival curves were observed in Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>AP/AP</sup> Mdm4<sup>+/-</sup> mice. Mdm4 status. (b) Tumor types were assessed upon the necropsy of Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>AP/AP</sup> Mdm4<sup>-/-</sup> mice. Mdm4 loss led to a three-fold decrease in the frequency of pituitary tumors, but had no effect on thyroid tumors. \*\*\*P $\leq$ 0.001, NS: not significant by Student's t-test.

© 2014 Macmillan Publishers Limited

Oncogene (2014) 1336-1339



**Figure 3.** p21 is required for the suppression of pituitary tumors in  $Bb^{+/-}$  p53<sup>AP/AP</sup> Mdm4<sup>-/-</sup> mice. (a) The expression of p21 is significantly increased in pituitary glands from  $Bb^{+/-}$  p53<sup>AP/AP</sup> Mdm4<sup>-/-</sup> animals. Total RNA were extracted as in Figure 1c from five pituitary glands of each genotype, then p21 mRNAs were assigned a value of 1. \*P $\leq$ 0.05 by Student's t-test. (b) Tumor types, assessed upon the necropsy of  $Bb^{+/-}$  p53<sup>AP/AP</sup> Mdm4<sup>-/-</sup> and  $Bb^{+/-}$  p53<sup>AP/AP</sup> Mdm4<sup>-/-</sup> and  $Bb^{+/-}$  p53<sup>AP/AP</sup> Mdm4<sup>-/-</sup> p21<sup>-/-</sup> mice, revealed an increase in pituitary tumors upon p21 loss. \*\*\*P $\leq$ 0.001, NS: not significant by Student's t-test.

growth.<sup>12</sup> We thus hypothesized that pituitary tumors were less frequent in Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>AP/AP</sup> Mdm4<sup>-/-</sup> than in Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>AP/AP</sup> mice, because in the former group Mdm4 loss led to increased p21 levels in the pituitary gland. To test this, we dissected 7-month-old Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>AP/AP</sup> and Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>AP/AP</sup> Mdm4<sup>-/-</sup> mice, and measured p21 mRNA levels in those pituitary glands that appeared normal upon dissection. Results, from five pituitary glands per group, revealed a two-fold increase in p21 mRNA levels in Mdm4-deficient animals (Figure 3a). Furthermore, when we used p21<sup>-/-</sup> mice<sup>13</sup> to generate and compare cohorts of Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>AP/AP</sup> Mdm4<sup>-/-</sup> and Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>AP/AP</sup> Mdm4<sup>-/-</sup> p53<sup>AP/AP</sup> Mdm4<sup>-/-</sup> p33<sup>AP/AP</sup> Mdm4<sup>-/-</sup> mice had similar lifespans and tumor spectra (Figure 3b and Supplementary Figure 3). Together, the data indicated that in these models Mdm4 loss limits tumor growth in the pituitary gland by activating p53<sup>AP,AP</sup>

Importantly, the fact that  $\text{Rb}^{+/-}$  p53<sup> $\Delta P/\Delta P$ </sup> and  $\text{Rb}^{+/-}$  p53<sup> $\Delta P/\Delta P$ </sup> Mdm4<sup>-/-</sup> mice had different tumor spectra but identical survival curves (Figure 2) suggested that the primary cause of death, for all animals, was the development of anaplastic thyroid carcinomas. Furthermore, because a Mdm4 haploinsufficiency improved survival in a Rb<sup>+/-</sup> context but not in a Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>Ab/AP</sup> context, it was reasonable to assume that if decreased Mdm4 levels had no effect in the latter context it was due to an intrinsic defect of the mutant  $p53^{\Delta P}$  protein. To evaluate the functionality of  $p53^{\Delta P}$ thyroid tumors, we first quantified p21 mRNA levels in thyroids from Rb<sup>+/-</sup> p53<sup> $\Delta P/\Delta P$ </sup> and Rb<sup>+/-</sup> p53<sup> $\Delta P/\Delta P$ </sup> Mdm4<sup>-/-</sup> animals, and found that the Mdm4 deficiency correlated with a two-fold increase in p21 levels (Supplementary Figure 4). This indicated that  $p53^{\Delta P}$  is still functional in thyroid tumors and that, as in is still functional in thyroid tumors and that, as in pituitary tumors, its transactivation capacity can be increased by Mdm4 loss. Importantly however, p21 was found to have a major role in preventing pituitary, but not thyroid tumors.<sup>12</sup> Rather, the development of anaplastic thyroid carcinomas was correlated with an upregulation of a set of genes involved in the control of cell cycle progression and chromosome segregation.<sup>14</sup> Among these, the gene encoding polo-like kinase 1 (Plk1), a kinase with a pivotal role in mitosis, appears particularly important. Indeed, RNA interference or compounds against Plk1 caused the mitotic arrest of anaplastic thyroid carcinoma cells, suggesting that this protein

Oncogene (2014) 1336-1339



might be a therapeutic target in thyroid carcinomas.14,15 Importantly, the binding of p53 at the promoter of *Plk1* was shown to induce its repression,<sup>16</sup> leading us to evaluate if this gene was less efficiently repressed in cells expressing p53<sup>ΔP</sup> than in cells expressing wild-type p53. Direct evidence for this was obtained by comparing WT and  $p53^{\Delta P/\Delta P}$  MEFs, before or after treatment with Nutlin, a specific Mdm2 inhibitor that enabled p53 activation;<sup>17</sup> we found that  $p53^{\Delta P}$  was partially impaired in the repression of *Plk1* (Figure 4a). Furthermore, Mdm4 haploinsufficiency led to modest, but significant decreases in Plk1 mRNA levels in MEFs expressing WT p53, whereas the loss of both Mdm4 alleles had no impact on the repression of Plk1 in cells expressing  $p53^{\Delta P}$ (Figure 4b). Consistent with this, similar Plk1 mRNA levels were observed in tissues of  $Rb^{+/-}$  p53<sup>AP/AP</sup> and  $Rb^{+/-}$  p53<sup>AP/AP</sup> Mdm4<sup>-/-</sup> mice, in both thyroid tumors (Figure 4c) and other tissues (for example, Supplementary Figure 5). Collectively, these results suggest that Mdm4 loss does not improve the survival of mice with Rb  $p53^{\Delta P/\Delta P}$  mutations owing to, at least in part, a reduced car and mutations owing to, at least in part, a reduced capacity of  $p53^{\Delta P}$  to mediate the transcriptional repression of *Plk1*, a gene important in thyroid tumorigenesis. Two non-exclusive mechanisms might contribute to make  $p53^{\Delta P}$  a poor transcriptional repressor. (1) the mutant protein might be impaired in recruiting co-repressors such as mSin3a, known to interact with human p53 via the p53 proline-rich domain;<sup>18,19</sup> (2) as an hypomorphic transactivator

© 2014 Macmillan Publishers Limited

Mdm4 loss in tumors expressing a p53 hypomorph M Fang *et al* 

1339

p53<sup>AP</sup> would induce p21 less efficiently, and p21 levels are known to contribute to the p53-mediated repression of many genes,<sup>20</sup> including *Plk1* (Supplementary Figure 6). The second possibility would imply that in a Rb<sup>+/-</sup> p53<sup>AP/AP</sup> context, p21 levels might be too low to enable efficient *Plk1* repression even after Mdm4 loss.

In sum, we provide evidence that, depending on the tumor type, strategies against Mdm4 that are efficient in cells expressing a wild-type p53 may fail in cells expressing a mutant p53 with only partial functionality. In addition, our study suggests that the capacity of p53 to repress target genes should be considered in the evaluation of therapeutic anti-cancer strategies.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank members of the Curie technological platforms for their contribution to this study: I Grandjean, C Daviaud and M Garcia from the Animal facility and Richardson, M Huerre and A Nicolas from the Pathology service. We also thank L Plancke and L Charbonnier for their help with mouse dissections, and GM Wahl and M Debatisse for their support. Funding was provided from the Fondation de France (Comité Tumeurs), the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Ligue Nationale contre le Cancer (Comité lle de France) and the Institut National du Cancer. MF and IS received predoctoral fellowships from the Cancéropôle lle de France, the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the Ligue Nationale Contre le Cancer.

#### REFERENCES

- 1 Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. Nat Rev Cancer 2006; 6: 909–923.
- 2 Marine JC. MDM2 and MDMX in cancer and development. Curr Top Dev Biol 2011; 94: 45–75.
- 3 Toledo F, Krummel KA, Lee CJ, Liu CW, Rodewald LW, Tang M et al. A mouse p53 mutant lacking the proline rich domain rescues Mdm4 deficiency and provides insight into the Mdm2-Mdm4-p53 regulatory network. Cancer Cell 2006; 9: 273–285.
- 4 Laurie NA, Donovan SL, Shih CS, Zhang J, Mills N, Fuller C et al. Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. Nature 2006; 444: 61–66.
  5 Bernal F, Wade M, Godes M, Davis TN, Whitehead DG, Kung AL et al. A stapled p53
- 5 Bernal F, Wade M, Godes M, Davis TN, Whitehead DG, Kung AL et al. A stapled p53 helix overcomes HDMX-mediated suppression of p53. Cancer Cell 2010; 18: 411–422.
- 6 Vaseva AV, Yallowitz AR, Marchenko ND, Xu S, Moll UM. Blockade of Hsp90 by 17AAG antagonizes MDMX and synergizes with nutlin to induce p53-mediated apoptosis in solid tumors. *Cell Death Dis* 2011; 2: e156.
- 7 Garcia D, Warr MR, Martins CP, Brown Swigart L, Passegué E, Evan Gl. Validation of MdmX as a therapeutic target for reactivating p53 in tumors. *Genes Dev* 2011; 25: 1746–1757.

- 8 Gembarska A, Luciani F, Fedele C, Russell EA, Dewaele M, Villar S et al. MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. Nat Med 2012; 18: 1239–1247.
- 9 Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 2007; **28**: 622–629.
- 10 Leroy B, Fournier JL, Ishioka C, Monti P, Inga A, Fronza G et al. The TP53 website: an integrative resource centre for the TP53 mutation database and TP53 mutant analysis. Nucleic Acids Res 2012; 41: D962–D969.
- 11 Williams BO, Remington L, Albert DM, Mukai S, Bronson RT, Jacks T. Cooperative tumorigenic effects of germline mutations in Rb and p53. Nat Genet 1994; 7: 480–484.
- 12 Chesnokova V, Zonis S, Kovacs K, Ben-Shlomo A, Wawrowsky K, Bannykh S et al. p21(Cip1) restrains pituitary tumor growth. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105: 17498–17503.
- 13 Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 1995; 82: 675–684.
- 14 Salvatore G, Nappi TC, Salerno P, Jiang Y, Garbi C, Ugolini C et al. A cell proliferation and chromosomal instability signature in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2007; 67: 10158–10158.
- 15 Nappi TC, Salerno P, Zitzelsberger H, Carlomagno F, Salvatore G, Santoro M. Identification of polo-like kinase 1 as a potential therapeutic target in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2009; 69: 1916–1923.
- 16 McKenzie L, King S, Marcar L, Nicol S, Dias SS, Schumm K et al. p53-dependent repression of polo-like kinase-1 (PLK1). *Cell Cycle* 2010; 9: 4200–4212.
- 17 Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. Science 2004; 303: 844–848.
- 18 Murphy M, Ahn J, Walker KK, Hoffman WH, Evans RM, Levine AJ et al. Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. Genes Dev 1999; 13: 2490–2501.
- 19 Zilfou JT, Hoffman WH, Sank M, George DL, Murphy M. The corepressor mSin3a interacts with the proline-rich domain of p53 and protects p53 from proteasomemediated degradation. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3974–3985.
- 20 Lohr K, Moritz C, Contente A, Dobbelstein M. p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53. J Biol Chem 2003; 278: 32507–32516.
- 21 Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA et al. Effects of an Rb mutation in the mouse. Nature 1992; 359: 295–300.
  22 Jacks T. Reminaton L. Williams BO. Schmitt EM. Halachmi S. Bronson RT et al.
- Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 1994; **4**: 1–7.
- 23 Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobin L. Afip—Laboratory methods in histotechnology. American Registry of Pathology: Washington DC, USA, 1992.
- 24 Simeonova I, Lejour V, Bardot B, Bouarich-Bourimi R, Morin A, Fang M et al. Fuzzy tandem repeats containing p53 response elements may define species-specific p53 target genes. PLoS Genet 2012; 8: e1002731.
- 25 Migliorini D, Lazzerini Denchi E, Danovi D, Jochemsen A, Capillo M, Gobbi A et al. Mdm4 (Mdmx) regulates p53-induced growth arrest and neuronal cell death during early embryonic mouse development. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 5527–5538.

Supplementary Information accompanies this paper on the Oncogene website (http://www.nature.com/onc)

# SUPPLEMENTARY INFORMATION



# **Supplementary Figure 1.**

**Transactivation capacity of human p53 mutants.** The capacity to transactivate p21 (a major determinant of cell cycle arrest) and Bax (a pro-apoptotic gene) were plotted for each of the 843 p53 mutants found in human tumors and reported as inactive or partially active in transcriptional assays (according to the TP53 Mut Assessor database <sup>10</sup>). Although most p53 mutants exhibit a significant decrease in the induction of both genes, mutants with partial activity often appear more affected in their capacity to transactivate p21 than Bax.
**Pituitary gland** 





## Supplementary Figure 2.

**Tumors observed in \mathbf{Rb}^{+/-} \mathbf{p53}^{\Delta P/\Delta P} mice. a.** Pituitary adenoma. **b.** Anaplastic thyroid carcinoma. Organs were fixed in formol 4% for 24h, then ethanol 70%, and embedded in paraffin wax. Serial sections were stained with hematoxylin eosin using standard procedures <sup>23</sup>.

а

b



Supplementary Figure 3. Survival curves of  $Rb^{+/-} p53^{\Delta P/\Delta P}$ ,  $Rb^{+/-} p53^{\Delta P/\Delta P} Mdm4^{-/-}$  and  $Rb^{+/-} p53^{\Delta P/\Delta P} Mdm4^{-/-} p21^{-/-}$  mice.  $p21^{-/-}$  mice were described previously <sup>13</sup>.



Supplementary Figure 4.

Thyroid tumors from Rb<sup>+/-</sup> p53<sup> $\Delta P/\Delta P$ </sup> Mdm4<sup>-/-</sup> mice express more p21 than thyroid tumors from Rb<sup>+/-</sup> p53<sup> $\Delta P/\Delta P$ </sup> mice. Total RNA were extracted as in Figure 1c from 5 thyroid tumors of each genotype, then p21 mRNAs were quantified using real-time PCR, normalized to control mRNAs, and the amounts in tumors from Rb<sup>+/-</sup> p53<sup> $\Delta P/\Delta P$ </sup> mice were assigned a value of 1. \*\*P  $\leq$  0.01 by Student's *t* test.



#### Supplementary Figure 5.

Similar Plk1 mRNA levels in the pituitary glands of  $\mathbf{Rb}^{+/-}$ **p53**<sup> $\Delta P/\Delta P$ </sup> and  $\mathbf{Rb}^{+/-}$  **p53**<sup> $\Delta P/\Delta P$ </sup> Mdm4<sup>-/-</sup> mice. Total RNAs were extracted as in Figure 1c from 5 pituitary glands of each genotype, then Plk1 mRNAs were quantified using real-time PCR, normalized to control mRNAs, and the amounts in pituitary glands from  $\mathbf{Rb}^{+/-}$  **p53**<sup> $\Delta P/\Delta P$ </sup> mice were assigned a value of 1. n.s. : not significant by Student's *t* test.





p21 is required for an efficient p53-mediated repression of *Plk1*. Primary MEFs, isolated from 13.5 days old WT and p21<sup>-/-</sup> embryos, were treated or not with 5  $\mu$ M Nutlin 3a for 24h, before RNA extraction and quantification by real-time QPCR. Nutlin activates p53, leading to a very efficient repression of *Plk1* in WT cells, but a more modest repression in p21<sup>-/-</sup> cells. \*\*P  $\leq 0.01$  and \*\*\*P  $\leq 0.001$  by Student's *t* test.

## Article n°2

## <u>The mouse model p53<sup>Y217C</sup> exhibits acute gender specific embryonic</u> <u>lethality and an oncogenic gain of function</u>

Sara Jaber, Rachida Bouarich-Bourimi, Monika Licaj, John Spencer, Alan Fersht and Franck Toledo

#### (Manuscrit en préparation)

#### Résumé :

Au cours de ma thèse j'ai créé le modèle murin p53<sup>Y217C</sup> exprimant une protéine p53 ayant une mutation « *hotspot* » particulière : la mutation Y217C. Cette mutation est homologue à la mutation humaine Y220C retrouvée dans environ 100 000 nouveaux cas de cancers chaque année dans le monde et dans 10 familles souffrant du syndrome Li-Fraumeni de prédisposition aux cancers. A l'inverse des autres mutation avec l'ADN mais déstabilise néanmoins le DBD de p53. L'équipe du Pr Alan Fersht (notre collaborateur de l'Université de Cambridge, UK) a montré que la mutation Y220C crée une poche à la surface de la protéine.Nos collaborateurs ont identifié des molécules candidates prometteuses pouvant s'y loger et stabiliser ainsi le DBD <sup>49</sup>, ce qui constituerait une stratégie thérapeutique novatrice et spécifique de la p53 mutée. Le modèle murin p53<sup>Y217C</sup> permettra d'évaluer précisément les propriétés de la protéine mutée et de tester l'efficacité thérapeutique de ces molécules *in vivo*.

L'analyse de ce modèle murin est toujours en cours et je présente dans ce manuscrit en préparation les résultats préliminaires que j'ai obtenus, une étude à poursuivre et à approfondir. Nous avons observéque les cellules p53<sup>Y217C/Y217C</sup> sont incapables d'activer les principaux gènes cibles de p53 et d'induire les réponses cellulaires comme l'arrêt du cycle ou l'apoptose après irradiation, un phénotype similaire à celui des cellules p53<sup>-/-</sup>. Ces résultats montrent que la mutation Y217C inactive la fonction de p53 et valident ainsi notre modèle. De plus, les embryons homozygotes pour la mutation souffrent d'une létalité spécifique aux femelles qui développent une exencéphalie avant 13,5 jours de développement. Ce phénotype

est plus sévère que celui observé chez les souris p53<sup>-/-</sup>. De plus, les souris p53<sup>Y217C/Y217C</sup> (majoritairement des mâles) meurent un peu plus tôt que les souris KO et surtout présentent un spectre tumoral plus varié, ce qui suggère que la mutation p53<sup>Y217C</sup> confère des propriétés oncogéniques particulières. En effet, les souris p53<sup>-/-</sup> meurent vers 6 mois généralement d'un lymphome thymique, un phénotype qu'on retrouve chez les souris p53<sup>Y217/Y217C</sup> mais auquel s'ajoutent des tumeurs d'autres types(lymphomesde localisation autre que thymique et sarcomes)et des tumeurs métastatiques. De plus, les souris hétérozygotesp53<sup>+/Y217C</sup> seront des modèles de patients p53<sup>+/Y220C</sup>, décrits dans des familles du syndrome Li-Fraumeni de prédisposition au cancer.

Ce projet devrait également permettre de tester *in vivo* une stratégie prometteuse de thérapie anti-cancéreuse ciblée, en collaboration avec l'équipe d'Alan Fersht. En effet, je teste des molécules ciblant la cavité de la mutation Y217C, d'abord sur des cellules en culture issues des souris mutées, afin d'établir leur efficacité et leur spécificité.J'ai déjà obtenu des résultats préliminaires mais encourageants sur ce point. Une fois validées, je testerai les molécules les plus prometteuses *in vivo* afin d'analyser leur capacité à réactiver la protéine mutée et à réduire la progression tumorale spécifiquement dans les souris qui portent la mutation, mais aussi d'évaluer leur toxicité sur l'organisme. Notre modèle murin devrait donc nous permettre de valider cette stratégie *in vivo* avant de pouvoir l'appliquer en recherche clinique, ce qui constitue un enjeu de taille pour lutter contre les tumeurs exprimant cette mutation « *hotspot*».

# The mouse model p53<sup>Y217C</sup> exhibits acute gender specific embryonic lethality and an oncogenic gain of function

Sara Jaber<sup>1,2,3</sup>, Rachida Bouarich<sup>1,2,3</sup>, Monika Licaj<sup>1,2,3</sup>, John Spencer<sup>4</sup>, Alan Fersht<sup>4</sup> and Franck Toledo<sup>1,2,3,5</sup>

<sup>1</sup>Genetics of Tumor Suppression, Equipe Labellisée Ligue, Institut Curie, Centre de recherche, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France. <sup>2</sup> Sorbonne Universités, UPMC Paris 06, Paris, France. <sup>3</sup> CNRS UMR 3244, Paris, France.<sup>4</sup> University of Cambridge, UK. <sup>5</sup> Corresponding author: <u>franck.toledo@curie.fr</u>

#### ABSTRACT

p53 tumor suppressor activity is frequently lost in human tumors with the predominant event being point missense mutations in the DNA-binding domain (DBD) sequence of TP53. Mutantp53 proteins not only lose their tumor-suppressor function but some acquire oncogenic gain of function (GOF). Seven residues within the DBD are mutational hotspots harboring the nine most frequent p53 mutations in cancer.Many of them have been studied and mouse models show that their effect can be mutation-specific. We created a novelKnock-In (KI)mouse harboring one of these hotspots, the Y220C (Y217C equivalent in mouse) which creates a localized structuralchange in the DBD. We show in this report that this mutation invalidates p53 function *in vivo*. Intriguingly, p53<sup>Y217C/Y217C</sup> mice exhibit acute gender specific embryonic lethality and female embryo died in utero suffering from excencephaly. Moreover, p53<sup>Y217C</sup> mutation caused a broadening of tumor spectrum and an increase in invasiveness and metastasis potential of the tumors. Thus, this mutant allele appears to harbor an oncogenic gain of function in vivo compared to the loss of Trp53 allele. Furthermore, this single amino acid change creates a cavity within the DBD of the human protein, which seems a good "druggable" candidate for reactivating p53 anti-tumoral activity.Our mouse model will be very useful to assess *in vivo* the efficiency of specific drugs designed to bind the cavity created by the mutation, thus serving as a preclinical animal model for this promising strategy.

Key words: p53, Y220C, hotspot, tumor, therapy

## **INTRODUCTION**

Somatic alterations in the TP53 gene, encoding the human tumor suppressor p53 are the most common events in human tumors <sup>1</sup>. p53 protein is a stress sensor which is stabilized in the nucleus in response to DNA damage or oncogenic signals among others. In its homotetrameric active form, p53 can trigger a transcriptional program of cell cycle arrest, DNA repair, senescence, apoptosis and many other transcriptional or cytoplasmic tumor suppressive responses. The nine most frequent mutations within the TP53 gene (R175H, Y220C, G245S, R248Q, R248W, R249S, R273H, R273C and R282W) are missense substitutions affecting seven hotspot residues localized in the DNA-binding domain (DBD) of this transcription factor. These mutational "hotspots" are commonly classified in two categories: contact mutations affect amino acids in direct contact with DNA (248 and 273), whereas structural mutations cause a conformational change in the mutant protein  $^{2}$ . In fact, the p53 protein is intrinsically unstable and oncogenic mutations that lower its melting temperature have strong effect on its functional conformation causing the protein to rapidly unfold, aggregate, and lose its transcriptional activity<sup>3,4</sup>. In particular, the Y220C mutation causes a structural change in the DBD that is localized on the « β-sandwich » scaffold of the DBD, far from the surface contact with DNA<sup>5</sup>. Nonetheless, the mutation of the tyrosine to a cysteine leads to loss of hydrophobic interactions and markedly lowers the thermodynamic stability of the DBD. The localized conformational change leads to an unfolded and inactive protein according to the crystallographic and *in vitro* studies<sup>6</sup>. Indeed, this special mutation accounts for an estimated 100.000 new cancer cases per year worldwide and 10 families suffering from the Li-Fraumeni syndrome of cancer predisposition were found to harbor this germline mutation.

All the "hotspot" point mutations lead to the inactivation of p53 function *in vitro* but some display different phenotypes inmouse models. In fact, reports show that mutant p53 protein can acquire new oncogenic functions and promote tumorigenesis to a further extent than the complete loss of the allele <sup>7,8</sup>. For example, R172H and R270H (equivalent to human R175H and R273H) are respectively structural and contact mutations that harbor gain of function (GOF) phenotypes *in vivo*. In fact, Knock-In (KI) mouse models expressing these hotspot mutant alleles display a broader tumor spectrum and a more invasive and metastatic phenotype compared with tumors of p53<sup>-/-</sup> or p53<sup>+/-</sup> mice<sup>9,10</sup>. This GOF effect is also seen in the HUPKI (Humanized p53 Knock In) mouse model carrying the hotspot mutation R248Q, but not the G245S mutation. Furthermore, the R246S (equivalent to human R249S) mutant

protein exhibits a dominant negative effect over the wild type (WT) protein in p53<sup>+/R246S</sup> mice, without acquiring oncogenic properties independently of the WT protein <sup>11</sup>.

Thus the outcome of p53 alteration on the whole organism seems mutation-specific and the study of these various mutant allelesin vivo is crucial for a better understanding of their contribution in promoting tumorigenesis. To gain a better understanding of the effect of the Y220C mutation in vivo, we generated the KI mouse models expressing the Y217C allele (equivalent to human Y220C) from the endogenous promoter. Interestingly, the p53<sup>Y217C</sup> mutant protein is inactive for the canonical p53 tumor suppressive responses but also harbors a gain of oncogenic functions *in vivo*. In fact, we find that p53<sup>Y217C/Y217C</sup> mice die at the same rate as p53 Knock-Out (p53<sup>KO</sup> or p53<sup>-/-</sup>) mice but suffer from a larger tumor spectrum. Tumors from p53<sup>Y217C/Y217C</sup> are more aggressive than their KO counterparts and display a high metastasis potential. Histological analysis confirmed the invasive phenotype with presence of lymphoma cells in various organs. Even more intriguing, p53<sup>Y217C/Y217C</sup> were not born in mendelian proportions but show a deficit in the number of female homozygous mice suggesting a gender specific embryonic lethality. We show that this severe phenotype is associated with the development of a lethal female-specific excencephaly in the embryo, which appears more severe than in p53<sup>KO</sup>. Thus, this mutant allele appears to harbor an oncogenic gain of function in vivo compared to the loss of Trp53 allele.

Furthermore, the substitution of a tyrosine on the surface of the protein to a smaller cysteine residue opens up an extended but narrow crevice created by the loss of the hydrophobic side chain in the mutant protein <sup>12</sup>. Small molecules that would restore the conformation of the mutant protein and induce its proper folding can target this mutation-specific cavity. These specific drugs should be able to prevent the aggregation of the mutant protein and potentially reactivate its functions without affecting the overall structure of the protein nor binding the WT p53in noncancerous cells<sup>13</sup>. The p53<sup>Y217C</sup> mouse model is apowerful tool to evaluate the ability of these molecules protein specifically reactivate the function of the mutant protein *in vivo*. Hopefully, this strategy will lead to the regression of tumor onset and a better survival of mutant mice, and ultimately of patients harboring this frequent mutation.

## RESULTS

## Generation of the p53<sup>Y217C</sup> mouse model

By homologous recombination, we generated a Knock-In mouse expressing a conditional p53<sup>Y217C</sup> (or p53<sup>YC</sup>) missense mutation based on the Lox-Stop-Lox (LSL) strategy (Figure 1). We first introduced a point mutation in exon 6 coding for the cysteine amino acid at codon 217 (instead of tyrosine) into a targeting vector containing transcriptional Stops flanked by LoxP sites (LSL), a neomycin selection cassette and a 5' homology arm upstream the coding sequence of the Trp53 gene in the intron 1, and a negative selection cassette downstream the 3' homology arm (Figure 1A). We purified and fully sequenced the obtained p53LSL-Y217C vector that was linearized and electroporated into 129/Sv embryonic stem (ES) cells. After neomycin selection of the recombinant clones, the homologous recombination was verified by PCR (Figures 1B and C) and Southern blot analysis (Figures 1D) of ES clones. Two positive p53<sup>+/LSL-Y217C</sup> clones were injected into C57BL/6J(B6) blastocysts and reintroduced into pseudo-pregnant females to obtain chimeras that were crossed with Wild-Type (WT) B6 mice to generate litters of mixed genetic background. p53<sup>+/LSL-Y217C</sup> thus obtained were crossed with mice carrying the PGK-Cre transgene to excise the LSL cassette. Then the p53<sup>+/Y217C</sup>mice (called below p53<sup>+/YC</sup>or +/YC) mice werebackcrossed with a WT B6mouse to purify the genetic background. F1 intercrosses were generated to create the cohorts of different genotypes: p53<sup>+/+</sup> (or p53<sup>WT</sup> or WT), p53<sup>+/YC</sup> and p53<sup>YC/YC</sup> and in parallel intercrosses allowed to generate p53<sup>+/-</sup> and p53<sup>-/-</sup> (p53<sup>KO</sup> or KO)mice for the comparative studies. During the breeding time we also generated primary cell lines by isolating and culturing Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) from 13.5 day embryos from these intercrosses (Figure 1E) and the cDNA prepared from these cells was also fully verified by sequencing (Figure 1F).

## p53<sup>YC/YC</sup> primary cells are defective in p53 tumor suppressive activities

We first studied the functional impact of the p53<sup>YC</sup> mutation in primary cells using MEFs and thymocytes from KI and control mice to assess the p53 activity*ex vivo* in normal or stressed conditions (Figure 2). As expected, the mutant p53<sup>YC</sup> protein was transcriptionally inactive as indicated by the nearly undetectable mRNA levels of main p53 target genes at baseline and upon p53 activation (Figure 2A). In fact, the expression levels of four p53 target genes,*p21* (responsible for the cell cycle arrest in G1 among other responses), *Mdm2* (a major negative regulator of p53), *Puma* and *Noxa* (implicated in the apoptotic response to p53), were measured by real-time quantitative PCR, showing that relative mRNA levels are

increased in WT MEFs after 24h of treatment with Nutlin-3a (Nutlin), a specific MDM2 inhibitor.Similar to p53<sup>KO</sup> MEFs, p53<sup>YC/YC</sup>MEFs were unable to induce these target genes expression even after Nutlin treatment. The heterozygous MEFs (p53<sup>+/-</sup> and p53<sup>+/YC</sup>)showed little differences with the WT except for a slight decrease for the *Noxa* mRNA levels in p53<sup>+/-</sup> and p53<sup>+/YC</sup> cells compared to the WT MEFs and an increase in *Puma* mRNA level in p53<sup>+/-</sup> cells, after treatment with Nutlin. These results show that p53<sup>YC</sup> protein has no transactivation activity as demonstrated in homozygous MEFs while heterozygous MEFs retain the ability to transactivate these p53 target genes, probably by the action of the p53<sup>WT</sup> protein in these cells. Doxorubicin, a drug that induces genotoxic stress leading to p53 activation, leads to similar responses with the exception of a slight activation of target genes in p53<sup>YC/YC</sup>MEFs. However, this activation is p53-independent because it is also seen in p53<sup>KO</sup>MEFs (Figure S1).

Next, we quantified the protein levels of MDM2, p53, and p21 in these MEFs treated or not with Nutlin for 24h (Figure 2B). As for the mRNA levels, MDM2 and p21 protein levels were increased upon Nutlin treatment in p53<sup>WT</sup> and heterozygous MEFs, whereas nearly no protein was detected in p53<sup>KO</sup> nor p53<sup>YC/YC</sup>MEFs even after treatment with Nutlin. This strengthens the idea that p53<sup>YC</sup> protein is unable to induce its target genes and is defective in its function as a transcription factor. In our experiments (as in all other reports), p53<sup>WT</sup> protein levels also increased in p53<sup>WT</sup> MEFs treated with Nutlin, because Nutlin impairs the MDM2-mediated ubiquitination of p53 and subsequent p53degradation. As expected, no p53 protein was detected in p53<sup>KO</sup> MEFs showing that the KO construct expresses null alleles. Interestingly however, p53<sup>YC</sup> protein accumulated in p53<sup>+/YC</sup> and even more in p53<sup>YC/YC</sup>MEFs and these protein levels were higher than in p53<sup>WT</sup> cells treated with Nutlin (see the quantification on the right panel). One explanation is that Mdm2 is not induced by the p53<sup>YC</sup> proteinwhich is not functionalandthus accumulates due to the defect in its degradation. Consistent with this, Nutlin treatment had no effect on p53<sup>YC</sup> protein levels, because the ubiquitination of this mutant p53 is already impaireddue to the absence of MDM2. These results indicate that thep53<sup>YC</sup> mutation leads to the accumulation of an inactive mutant protein in p53<sup>YC/YC</sup>MEFs, consistent with previous findings in cultured primary cells harboring other hotspot mutations<sup>14</sup>.

To verify that  $p53^{YC}$  protein was fully inactivated and incapable of inducing p53 main responses to genotoxic stress (cell cycle arrest and apoptosis), we performed two typicalexperiments for assessing p53 response to DNA damage by  $\gamma$ -irradiation (Figure 2C and D). By flow-cytometry analysis, we measured the G1/S ratios of MEFs and the

percentage of apoptotic thymocytes before and after irradiation. In response to a 3Gy and even more to a 12Gy irradiation, WT MEFs activated a cell cycle arrest checkpoint in G1 phase. The ratio of cells in G1 phase over those in S phase was increased by almost 5 fold after a 12Gy irradiation (Figure 2C). Heterozygous MEFs (p53<sup>+/-</sup> and p53<sup>+/YC</sup>) showed slightly lower, although not statistically significant, G1/S ratios than WT MEFs. As expected, p53<sup>KO</sup> MEFs were unable to induce cell cycle arrest in G1. Similar to the null cells, p53<sup>YC/YC</sup>MEFs showed low G1/S ratios at baseline that did not increase even after a 12Gv irradiation, showing that p53<sup>YC</sup> protein is unable to induce a cell cycle arrest response to DNA damage, which is consistent with its inability to transactivate the CDK inhibitor p21. Moreover, WT thymocytes undergo a potent apoptotic response, with almost a 3fold increase in the percentage of apoptotic cells after a 10Gy irradiation. However, p53<sup>YC/YC</sup> thymocytes were completely resistant to apoptosisafter 10Gy irradiation as observed in p53<sup>KO</sup> irradiated mice which exhibited a similar percentage of apoptotic thymocytes (Figure 2D).p53<sup>+/YC</sup>thymocytes showed a small reduction in the apoptotic response to 10Gy irradiation when compared to irradiated WT and p53<sup>+/-</sup>cells (the latter showing an intermediate phenotype). Even though we did not measure the expression level of apoptotic p53 target genes in the thymus, we can note a reduction in mRNA levels of the pro-apoptotic gene *Puma* in p53<sup>+/YC</sup>MEFs compared to p53<sup>+/-</sup>MEFs (Figure 2A).

Altogether these data show that p53<sup>YC</sup> mutation leads to the expression of an inactive protein that exhibits null features regarding to the main tumor-suppressor functions of p53 including transcription of canonic target genes, cell cycle arrest response to DNA damage and irradiation induced apoptosis. We also found that this dysfunctional protein accumulates in MEFs, suggesting that it could harbor gain-of-function properties by novel interactions.

## p53<sup>YC/YC</sup> animals exhibit gender-specific embryonic lethality

To analyze the effect of  $p53^{YC}$  mutation *in vivo*, we generated 5 different mice cohorts by crossing heterozygous  $p53^{+/YC}$  mice to generate  $p53^{+/+}$ ,  $p53^{+/YC}$  and  $p53^{YC/YC}$  mice, as well as intercrossing  $p53^{+/-}$  mice to generate  $p53^{+/+}$ ,  $p53^{+/-}$  and  $p53^{-/-}$  mice(Figure 3).  $p53^{YC/YC}$  mice were not born in mendelian proportions. In fact, we noticed a deficit in  $p53^{YC/YC}$  mice at weaning, particularly for female  $p53^{YC/YC}$  mice (Figure 3A). Indeed, we found a ratio of 1  $p53^{YC/YC}$  female for almost13  $p53^{YC/YC}$  males at weaning, whereas this ratio was around 1 female for 2 males for  $p53^{KO}$  mice according to the literature <sup>15</sup>. In sum, over the 43  $p53^{YC/YC}$  mice that we genotyped, only 3 were females (Figure 3A) and when the intercrosses were well backcrossed over the B6 genetic background (around 96,9% B6), no p53<sup>YC/YC</sup>female was found at birth. However, when we genotyped MEFs prepared at embryonic day (E) 13.5, mendelian proportions of homozygous females were found, showing that the p53<sup>YC</sup> mutation causedan embryonic lethality of female embryos after E13. We then analyzed litters between E12 and E14 and found exencephaly in80% of the p53<sup>YC/YC</sup> female embryos (Figure 3B). This phenotype has already been reported in some p53<sup>KO</sup> females but to a lesser extent (23% of female embryos) <sup>15</sup>. In our mouse facility, we detected no exencephaly in the few p53<sup>KO</sup> embryos that we analyzed. Together, these data indicate a more severe phenotype caused by the p53<sup>YC</sup>

## p53<sup>YC/YC</sup> mice develop a wide spectrum of highly invasive tumors

We next compared the survival curves of 24 p53<sup>YC/YC</sup> mice to those of23 p53<sup>KO</sup>miceand of 35 p53<sup>+/YC</sup>mice to 32 p53<sup>+/-</sup>mice and monitored their spontaneous tumor onset and spectrum over a period of around 10 months, using p53<sup>WT</sup> mice of both intercrosses as control of tumor free survival (Figure 4). Compared to the WT, all four genotypes showed an accelerated tumor developmentshowing a defect in tumor suppressor functions of p53<sup>YC</sup> proteinin vivoas seen for the null protein. p53<sup>KO</sup> mice have been reported to develop cancer with a 100% incidence and to die around the age of 6 months mostly of thymic lymphomas and sometimes from other tumor types such as sarcomas <sup>16-18</sup>. In accordance with these previous reports, in our cohorts p53<sup>KO</sup>mice died at a median age of 160 days (Figure 4A),of thymic lymphomafor most cases (89%) and of sarcomas for the remaining cases.p53<sup>YC/YC</sup>mice died at about the same age (Figure 4A) and suffered from thymic lymphomas, but they also developed other tumors with a larger spectrum and higher invasiveness rate than null mice of the same genetic background. Thus, of the 22 p53<sup>YC/YC</sup> mice analyzed, in 45% of the cases(10 mice) the lymphoma was localized only to the thymus, whereassome mice (32%, 7 mice)showed a highly invasive lymphoma with localization to thymus and other various organs. Moreover, 23% of p53<sup>YC/YC</sup>mice (5 mice) developed lymphomas -mostly in the liver and spleen- and sarcomas without a thymic lymphoma, as assessed by the macroscopic autopsy and histological analysis of tumor organs (Figure 4B, 4C and S2).Furthermore, some homozygous mutant mice exhibited a severe phenotype with multiple tumor sites and all the 24 monitored p53<sup>YC/YC</sup> mice were dead by the age of 7 months, whereas at least 10% of the p53<sup>KO</sup> mice were still alive at 10 months (Figure 4A). Thus, p53<sup>YC/YC</sup> mice appear to exhibit a modest decrease in survival at the end of life compared to the p53<sup>KO</sup> mice-but the data are not significant with the current size of the cohorts-and p53<sup>YC/YC</sup> micedevelop a large spontaneous tumor spectrum with a strong invasive

potential when compared to the p53<sup>KO</sup>mice (Figure 4A). Altogether these data suggest that the homozygous p53<sup>YC/YC</sup>mice exhibit a gain of function phenotype and that even though in primary cells the p53<sup>YC</sup>protein acts as a null protein, under physiological conditions in the whole organism context, the p53<sup>YC</sup>mutation confers new oncogenic properties to the encoded mutant protein. Finally, to evaluate the status of p53<sup>YC</sup>protein *in vivo*, we quantified by immunoblot the p53 protein levels from various organs of WT, KO and p53<sup>YC/YC</sup>mice and observed an accumulation of the mutant protein in tissues from p53<sup>YC/YC</sup>mice compared to WT and KO, and even more in tumors from p53<sup>YC/YC</sup>mice compared to non tumoral tissues from the same mouse or from other mice (Figure 4D). The result shows that the p53<sup>YC</sup>protein is also found at high levels *in vivo* and that this accumulation is probably responsible for the oncogenic properties on tumor development and metastasis in p53<sup>YC/YC</sup>mice.

Surprisingly the survival of  $p53^{+/YC}$  mice was increased compared to the  $p53^{+/-}$  mice (Figure S3 left), although animals carrying one mutant allele showed a higher rate of tumor incidence (70% vs. 50% for  $p53^{+/-}$ , data not shown) and a broader tumor spectrum. Both genotypes exhibit a strong onset of sarcomas (67% for  $p53^{+/-}$  mice) and lymphomas affecting other organs than the thymus (Figure S3 right). The differences in survival curves were steep at early age but get narrower if pursued up to 2 years, and this phenotype appears to be due to a higher survival rate of male  $p53^{+/YC}$  (data not shown).

#### DISCUSSION

#### A mouse model of an oncogenic hotspot mutation

In this work we report a novel mouse model ( $p53^{Y217C}$  or  $p53^{YC}$ ) harboring the murine equivalent of a specific hotspot p53 mutation ( $p53^{Y220C}$ ) frequently found in human tumors. Mutant mice allowed us to evaluate the effect of this structural mutation on p53 activity and tumorigenesis *ex vivo* and *in vivo*. While *ex vivo* analysis of main p53 responses showed that  $p53^{YC}$  protein is defective in its tumor suppression functions and acts as a null protein in  $p53^{YC/YC}$  primary cells, *in vivo* studies of  $p53^{YC/YC}$  mice suggested a gain of function phenotype when compared to  $p53^{KO}$ mice.

p53<sup>YC/YC</sup>MEFs displayed features of p53<sup>KO</sup>cells such as the inability to activate the transcription of p53 main target genes and a compromised cell cycle arrest in response to irradiation-induced DNA damage. Similarly, p53<sup>YC/YC</sup>thymocytes were unable to mount a p53-dependent apoptotic response upon whole body irradiation. These assays confirmed the hypothesis that the Y217C mutation inactivates p53 function despite the fact that this mutation affects a residue of the DNA binding domain (DBD) of p53 that is distant from the contact surface with DNA, confirming the *in vitrospeculations*. An explanation for this may come from crystallographic in vitro analyses of the human mutant protein, which suggested that this mutation disturbs the conformational state of the DBD by disrupting hydrophobic bonds upon the loss of the side chain of tyrosine<sup>2</sup>. These localized structural alterations lead to lowering of the melting temperature of the DBD therefore affecting its thermodynamic stability toward an unfolded state at body temperature<sup>6</sup>. Preliminary results suggest that the apoptotic response to irradiation is more affected by the presence of one p53<sup>YC</sup> allele in  $p53^{+/YC}$  thymocytes than by the complete loss of one p53 allele (in the  $p53^{+/-}$  cells, see Figure 2D). At this level we cannot yet confirm a dominant negative effect of the mutant protein, but our observations may suggest that the mutant inactive protein accumulates in the cells and can sequester the WT protein (that usually acts in its homotetrameric form), thus preventing its activity and leading to a more severe phenotype.

p53<sup>YC/YC</sup>mice died rapidly of various tumor types that were of a larger spectrum and higher invasive potential than p53<sup>KO</sup> tumors. These resultssuggest that p53<sup>YC</sup> mutation not only causes the loss of p53 tumor suppressive functions but also confers new oncogenic properties to the mutant protein such as a gain in metastatic activity. These phenotypes seem more severe than those seen in p53<sup>KO</sup> mice but are consistent with mouse models of other p53 hotspot mutations. Indeed, it has been previously shown in mouse models engineered to express one of the hotspot p53mutations, that many of these mutations confer a gain of

oncogenic properties to the mutant protein, associated with a tumorigenic effect dependent or not on p53<sup>WT</sup> protein. These acquired functions include the promotion of tumor cell proliferation, resistance to cell death, angiogenesis, metastasis and metabolic changes. For example, Knock-In mice harboring the murine equivalent to the hotspot R175H or R273H (R172H or R270H mice respectively) develop an altered spectrum of tumors and more metastases compared with p53<sup>KO</sup> mice<sup>9,10</sup>. Furthermore, mice expressing the human R248W mutation also resemble the p53<sup>YC/YC</sup> mice as they die rapidly of a larger tumor spectrum than usually found in p53<sup>KO</sup>. These mice also show a phenotype of increased genetic instability and altered G2-M checkpoint upon DNA-damage<sup>19</sup>. The authors of this study show that this gain of function is mediated by the inactivation of MRE11/ATM pathway<sup>20</sup>. However, not all the nine hotspots have the same effect in vivoas shown in two recently created mouse models carrying the human R248O or G245S mutations. While mutant p53<sup>R248Q</sup> had a robust gain of function effect with a strong decrease in survival ofp53<sup>R248Q/-</sup>mice compared to p53<sup>KO</sup> mice (and to all the other hotspot mutant mice), the phenotype of p53<sup>G245S/-</sup>mice was similar to the null ones <sup>14</sup>. Intriguingly, R248Q and R248W mutations affect the same residue and are contact hotspot mutations but have diverse outcomes in mouse models. These different phenotypes strengthen the notion that the nine hotspot mutations lead to different effects explaining why they are all found in human tumors and have a different tumor spectrum in humans but also may explain the heterogeneity of Li-Fraumeni families depending on the carried germline mutation. Studying each of these mutations in vivo using animal models is thus crucial to understanding their effect. Here we show that the Y220C mutation, which is different from the other hotspots by its position and conformational effect, can also lead to a gain of oncogenic function of the mutant protein *in vivo* affecting mostly the tumor spectrum and invasiveness potential without a strong change in survival in comparison to the loss of the p53 protein. This observation may explain why p53<sup>YC</sup> mutation is frequently found in human cancers with an aggressive tumorigenic phenotype.

Regarding the mechanism of gain-of-function, it has been shown that mutant p53 can have oncogenic functions by acting via various pathways. In addition to its loss of transcriptional activity on regular response elements, it may be able to bind other DNA sequences leading to the activation of oncogenic pathways. Moreover, some p53 mutants are able to interact with other transcription factors to either promote their oncogenic function such as NF-Y or to sequester them and inhibit their activity, such as for p63 and p73<sup>21</sup>. This latter interaction is thought to be the major mechanism of action of mutant p53. Indeed, p63<sup>+/-</sup> or p73<sup>+/-</sup> mice were found to develop metastatic tumors spontaneously and in a similar spectrum to those developed by mutant p53 mice, suggesting that the oncogenic properties of mutant p53 are driven by the inhibition of TAp63/p73 tumor suppressors and/or the promotion of  $\Delta$ Np63/p73 tumorigenic activities<sup>22</sup>. Moreover, mutant p53 can also directly interact with effector proteins to impairtheir activity, as already discussed for MRE11, or to enhance their function such as for TOP1 <sup>23,24</sup>. Concerning p53<sup>YC</sup> protein, we have yet to define if this mutant protein can bind specific or other DNA sequences, which is a plausible hypothesis knowing that its conformational changes are localized and distant from the contact surface of the DBD. However, given the accumulation of p53<sup>YC</sup> protein in tumors and non-tumoral cells, it is most likely that this unfolded mutant protein will allow novel interactions with partners due to its high cellular concentration.

Additionally, most p53<sup>YC/YC</sup> females suffered from a highly penetrant phenotype of exencephaly development and died *in utero*. The exencephaly is probably caused by a defect in neural tube closure due to an impaired p53-dependent apoptosis as shown for p53<sup>KO</sup> mice<sup>15</sup>. In this study, theauthors also observed an embryonic lethality in p53<sup>KO</sup> females (and one male) but in a less severe manner than in our study of p53<sup>YC/YC</sup> females. This suggests that p53<sup>YC</sup> mutation is more detrimental at this stage of development than the absence of WT protein. Moreover, the fact that this defect affects mainly the females raises the hypothesis that p53<sup>YC</sup> protein may play a hormonal or epigenetic dependent role in this embryonic process. In support of the hypothesis of a hormonal role for p53<sup>YC</sup>, a high rate (30%) of the female hormone-dependent breast and ovarian tumors is observed among human tumorsharboring the p53<sup>YC</sup> somatic mutations (according to the IARC-TP53 database R18 April 2016), but the causal effect is yet to be determined.A more plausible hypothesis is that the mutant protein is able to alter the expression of genes implicated in the neural tube closure during embryogenesis, in a gender specific manner (via the direct or indirect regulation of X-linked genes for example).

## Perspectives: p53<sup>Y217C</sup> as a preclinical mouse model to evaluate anti-cancer strategies

According to the IARC TP53 database,  $p53^{Y220C}$  mutation occurs sporadically in about 100.000 new cancer cases per year –making it the ninth most frequent p53 mutation in human sporadic cancers– and its germinal form has been reported in 10 families with the Li-Fraumeni syndrome (LFS)<sup>1</sup>. Here we show that this mutation leads to an oncogenic effect at the homozygous state, thus demonstrating its impact*in vivo* in a mammalian animal model. As for heterozygotes, the survival curves are still on going, but they already suggest that  $p53^{+/YC}$  die prematurely of cancer displaying a large spectrum of tumors. It will be interesting to

pursue these survival curves knowing that p53<sup>+/YC</sup>mice are a good model of the Li-Fraumeni syndrome (LFS) caused by heterozygote Y220C mutation. These patients develop mostly sarcomas and other highly invasive tumor types at an early age but have a good survival prognosis in comparison to LFS families carrying other p53 mutations <sup>25,26</sup>, a phenotype resembling the one in p53<sup>+/YC</sup>mice.

A common event in human tumors is the loss of heterozygosity (LOH) at the TP53 locus, resulting in the absence of a functional p53 protein (among other consequences)<sup>27</sup>. Thus, tumors would express p53<sup>Y220C</sup> from one allele, and have lost the WTTP53 allele. In this regard the Y220C mutation appears as an interesting target for cancer therapy. Structural studies showed that the loss of hydrophobic bonds, by the substitution of the tyrosine by a cysteine (Tyr to Cys or Y to C), creates a cavity in the mutant protein that is absent in the WT protein due to the side chain of the tyrosine amino acid. This mutantspecific pocket is responsible for lowering the thermodynamic stability of the mutant DNA binding domain resulting in an unfolded and inactive protein in *in vitro* studies. On the other hand, this same cavity may be the Achilles' heel of the mutant protein given that it is potentially druggable by targeting small molecules that bind its surface specifically <sup>12</sup>. The asset of such molecules would be that they target a surface that is distant from the functional site of the mutant protein and that the conformational changes caused by the mutation are localized so the binding of these drugs will restore the protein's function without affecting the DNA binding interface per se. Even more, their mutation-binding specificity-dueto the absence of the cavity in the WT protein-will ensure they do not interfere with the WT p53 protein in normal cells thus targeting only cancerous cells<sup>13</sup>.

The team of Alan Fersht (at the University of Cambridge, UK) took up the challenge to design such molecules and succeeded –by using *in silico* screening and crystallographic studies– to identify specific carbazole derivatives that are able to bind this mutant-specific crevice and would stabilize its thermodynamic state by raising its melting temperature and slowing down its aggregation rate. A member of this family of reactivating molecules, the PK7088, was tested *in vitro* and showed encouraging results on human cancer cell lines harboring the p53<sup>Y220C</sup> mutation<sup>28</sup>. However, these studies were conducted in cancer cell lines that are by definition subjected to many genetic alterations and genomic instabilities making it hard to confer the success of these drugs solely to their effect on the mutant protein and to ensure their specificity. Hence, it is essential to test the pharmacological action of a drug in an animal model to establish its specificity, as well as its toxicity on the whole organism. In this context, our p53<sup>Y217C</sup> mouse model constitutes a perfect tool to evaluate candidate molecules.

We thus initiated a collaboration with the team of Alan Fersht, who is still improving candidate molecules by adding halogen derivatives and integrating dynamical high-resolution crystal studies and hydration patterns in the drug-discovery process in order to "design high-affinity Y220C mutant binders [...] with increased potency, and stabilize these molecules by lowering their dissociation constant  $(K_D)^{*29}$ . While awaiting these potent and stably modified molecules, we started to test the available drugs of the same family. Our preliminary results (Figure S4) suggest a partial reactivation of the transcriptional activity of p53 in p53<sup>YC/YC</sup>MEFs, but at a rather high concentration (250 or 300  $\mu$ M). This result is a preliminary test from one experiment that should be reproduced and confirmed using the proper controls (on WT and KO MEFs). The molecules are used at high concentrations due to their low affinity that is being currently improved by our collaborators <sup>30</sup>. Further experiments with next generation molecules should allow us to exploit the p53<sup>YC/YC</sup> mice as a preclinical model to investigate this promising and specific anti-cancer therapeutic strategy.

In conclusion, p53<sup>Y217C</sup> mouse is a great model of a unique oncogenic mutation which harbors strong gain of function properties. Even more, the severe gender specific embryonic lethality phenotype confers an intriguing specificity to this special mutation. Having established the tumorigenic effect of this mutation *in vivo*, future work will allow to rescue their phenotype using a promising specific anti-cancer targeted therapy. If successful, this novel strategy should benefit to all the patients harboring this mutation (in sporadic tumors or in the germline), but also a validation of this *in silico* structural-based technique for the screening of p53-reactivating drugs.

#### **FIGURE LEGENDS**

#### Figure 1: Targeting the Y217C missense mutation at the mouse *Trp53* locus.

(A) The Lox-Stop-Lox (LSL) targeting strategy by homologous recombination in ES cells. EcoRI (RI) restriction sites (fragment 17kb long) flank the Trp53 gene. The coding exons are represented by black boxes and the UTRs by white boxes. The targeting vector was obtained by directed mutagenesis on a previous LSL construct <sup>19</sup> to introduce the TAT to TGT (Tyr to Cys) point mutation at the codon 217 and a silent mutation nearby creating a BanII restriction site. This construct (first line) contains: a 1.5kb and 2.8kb long 5' and 3' homology regions respectively; a LSL cassette with a neomycin positive selection gene (Neo), 4 transcription termination sequences (STOP) and a RI site, all flanked by LoxP sites in the same orientation(arrowheads); p53 exons 2 to 11 containing the Y217C mutation in exon 6 (indicated by an asterix) and the additional BanII site; a diphtheria  $\alpha$ -toxin (DTA) negative selection gene. The probe used for Southern Blot and the primers with the expected size are also indicated. (B-D) The screening of the recombinant ES clones by (B) PCR in the 5' arm with the primers a and b to amplify a 2.4kb long positive band (asterix); (C) PCR with primers c and d flanking the regions with the mutation followed by BanII digestion of the amplified (830bp) sequence: heterozygote clones (asterix) for the mutation (p53LSL-YC) show a profile of 3 bands (830bp for the WT allele and 630+200bp for the LLS-YC allele); (D) Southern Blot with the indicated probe: the positive clones (asterix) contain a WT band of 17kb and an additional band of 10.5kb after EcoRI digestion. (E) An example of genotyping by PCR with primers c and d and BanII digestion of MEFs prepared from embryos of a p53<sup>+/YC</sup> intercross. (F) p53-YC sequence around the codon 217. Total RNA was extracted from p53<sup>YC/YC</sup>MEFs and the retro-transcribed cDNA was amplified with primers flanking the exon 6 and the high-fidelity PCR product was sequenced and aligned to a p53-WT mouse cDNA sequence. The integrated mutation  $A \rightarrow G$  is highlighted and the rest of the sequence is similar to the WT.

## Figure 2: p53<sup>YC/YC</sup> primary cells show no p53 activity.

(A)  $p53^{YC/YC}$ MEFs are unable to induce p53 target genes transcription. The expression levels of four p53 target genes are plotted. mRNAs from indicated MEFs –treated or not with 10µM Nutlin-3a for 24h– were quantified by real-time qPCR normalized to control mRNAs, then the amount in WT untreated cells was assigned the value of 1. (B)  $p53^{YC}$  protein accumulates in  $p53^{YC/YC}$ MEFs. Protein expression levels of p53 and of two of its target genes are assessed by Western Blot as shown in a typical example. MEFs were treated or not with 10µM Nutlin-

3a for 24h and proteins were extracted then immunoblotted with antibodies against MDM2, p53, p21 and actin. Bands were quantified and normalized to the actin and the value from WT untreated cells was assigned the value of 1 (quantification on the right). (C) p53<sup>YC/YC</sup>MEFs are unable to induce cell cycle arrest in G1 after irradiation. Cell-cycle control was analyzed by FACS in asynchronous cell populations 24h after 0, 3 or 12 Gy of γ-irradiation and 1h of BrdU labeling. Results are from three independent experiments. (D) p53<sup>YC/YC</sup>thymocytes show no apoptotic response to irradiation. Age-matched miceof the indicated genotypes wereleft untreated or submitted to 10 Gy whole-body γ-irradiation and sacrificed 4h after. Thymocytes were extracted, labelled with Annexin V-FITC, analyzed by FACS and percentages of apoptotic cells were plotted. Results are from two independent experiments.

## Figure 3: p53<sup>YC/YC</sup>mice exhibit gender specific embryonic lethality.

(A) Proportions of mice from the different genotypes and both sexes –with the ratio females over males– are calculated at weaning (right column), showing a deficit in female p53<sup>YC/YC</sup>mice in comparison to the mendelian expected proportions (left column). (B) Photos of a female (top) and a male (bottom) p53<sup>YC/YC</sup>embryos at 13.5 days of embryonic development. Female p53<sup>YC/YC</sup>embryo shows an exencephaly (indicated by the letter E).

## Figure 4: p53<sup>YC/YC</sup> mice are prone to a large specter of tumors*in-vivo*.

(A) Survival curves of homozygous mice from indicated genotypes and the sizes of the corresponding cohorts (in brackets). The cohorts were monitored until the age of 280 days. (B) p53<sup>YC/YC</sup> mice are prone to develop many tumor types and their thymic lymphomas are highly invasive. The graph is a contingency plot of the percentage of mice with each tumor type showing the tumor spectrum and invasive potential of p53<sup>YC</sup> protein. (C) Hematoxylin & Eosin staining of sections from the indicated organs and genotypes, showing the metastatic phenotype of p53<sup>YC/YC</sup> suffering from thymic lymphoma. On the upper panel, "A" stands for pulmonary alveoli showing the normal structure of the lungs from p53<sup>KO</sup> (on the left) and p53<sup>YC/YC</sup> (on the right) mice. The dotted square shows the lymphoma area in the lungs of p53<sup>YC/YC</sup> mouse. On the lower panel, "WP" and "RP" stand for white and red pulp respectively, showing the normal structure of a p53<sup>KO</sup> spleen (on the left), which is absent on a p53<sup>YC/YC</sup> spleen (on the right) due to the invasive lymphoma. (D) p53<sup>YC</sup> protein accumulates in tumors in comparison to non tumoral tissues. On the left an example of a western blot on proteins extracted from different organs of one p53<sup>YC/YC</sup> mouse. Proteins from WT MEFs treated with Nutlin and from WT thymus are immunoblotted as controls. On the right a

quantification of p53 band intensity normalized to the actin from 3 to 4 western blots of protein extracts from different mice. The value for the WT normal thymus was set at 1. On the western blot and the quantification graph, T stands for tumoral cells and N for non-tumoral cells.

## Figure S1: p53<sup>YC/YC</sup> show no transcriptional activity in response to genotoxic stress

 $p53^{YC/YC}$ MEFs are unable to induce p53 target genes transcription. The expression levels of two p53 target genes are plotted. mRNAs from indicated MEFs –treated or not with  $0.5\mu$ g/ml of Doxorubicin for 24h– were quantified by real-time qPCR normalized to control mRNAs, then the amount in WT untreated cells was assigned the value of 1

## Figure S2: p53<sup>YC/YC</sup> mice develop many tumor types in multiple organs.

The table is a listing of the types of tumors developed by mice from the corresponding genotypes according to the histopathological analysis with the number of mice for each type. The total number of mice analyzed is indicated in brackets next to the corresponding genotype.

## Figure S3: p53<sup>+/YC</sup>mice are prone to a larger tumor spectrum than p53<sup>+/-</sup> mice.

(A) Survival curves of heterozygous mice from indicated genotypes and the sizes of the corresponding cohorts (in brackets). The curves show the extension of the survival if cohorts were monitored until the age of 760 days. (B)  $p53^{+/YC}$ mice are prone to develop many tumor types including thymic lymphomas The graph is a contingency plot of the percentage of mice with each tumor type.

## Figure S4: Specific molecules may restore p53<sup>YC</sup> transcriptional activity.

 $p53^{YC/YC}$ MEFs were treated or not for 24h with the indicated concentrations of a third generation molecule designed by Fersht's lab. The molecule was combined or not to a 24h of 10µM Nutlin treatment. mRNAs from the different conditions were quantified by real-time qPCR normalized to control mRNAs, then the amount in WT untreated cells was assigned the value of 1. This result is a preliminary test from one experiment.

## FIGURES

## Figure 1

#### А





# Figure 3

## Α

## p53+/YC intercross

Ratio F/M = 0.07	Expected	Observed
p53+/+	88.5	81 (35F + 46M)
p53+/YC	177	230 (112F+ 118M)
p53YC/YC	88.5	43 (3F + 40M)
Total		354
pvalue (χ2)	2,17*10	)-9 ***

## p53+/- intercross

Ratio F/M = 0.42	Expected	Observed
p53+/+	37.75	30 (15F + 15M)
p53+/-	75,5	92 (45F + 47 M)
p53-/-	37.75	29 (8F + 21 M)
Total		151
pvalue (χ2)	0.03	*

В





## Figure 4





KO

YC/YC





## **Supplemental Figures**



÷.

Sarcoma (spine, bone)

- 1

-5 23 -

Fig.S3



## MATERIALS AND METHODS

#### p53LSL-Y217C construct

The targeting vector was obtained as previously described<sup>31</sup>. Briefly, mouse genomic *Trp53* DNA was obtained from combining a 17 kb EcoRI fragment (from L. Donehower) and a 6 kb BamHI fragment (from T. Jacks). A portion of intron 1 containing a LoxP-Stop-LoxP (LSL) cassette (from T. Jacks) was also used. The Puromycin-resistance gene from the original LSL cassette was replaced by a Neomycin gene (details available upon request). The point mutation (A to G) encoding for the substitution of Tyr by Cys (TAT to TGT) at the codon 217 –in addition to a silent mutation nearby creating a BanII restriction site– was introduced by PCR directed mutagenesis using the following primers  $(5^{\circ} \rightarrow 3^{\circ})$ :

mut\_p53\_Y217C-F: GC GTA GTG GTA CCT TGT GAG CCC CCC GAG GTC T and mut\_p53\_Y217-R: AC CTC GGG GGG CTC ACA AGG TAC CAC TAC GCT G The resulting p53LSL-Y217C targeting vector was fully sequenced using the following primers:

Primer	Sequence 5'-3'	Primer	Sequence 5'-3'
Puro-0F	CAACAAGAGAGCAGGGTGACTCCAT	I4F	GAGTTGTCTTTCGTGTGACC
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	i6e6R	GCACAAACCAAAACAAAATTACAG
p53 int1-4 R	TGGAAAGGTGCAAGGCTT	I4E5F	CCATCTCTGTGAGTTCGAGG
D31-NeoR	CGTGATATTGCTGAAGAGCTTG	I7E7R	GCTTCTGCCTGTTTCTGTTC
puro LSL R	ATGACCGAGTACAAGCCC	e7-F	CTGAAACTTATTAGAGGCTA
p53 int1-2R	TATCAGCCAGAGACAAAA	19E9R	CGTGACATTAGCTTGAGAGC
CMVt LSL R	TGCAGAAATTGATGATCT	e8-9F	TCTTACTGCCTTGTGCTGGT
av puro 5R	GGTGATAGGTGGCAAGTGGT	E710Seq4F	ACAGTGGTTCTCAGTGTAACT
av puro 3R	TCATCAAGGAAACCCTGGAC	int10_11ex10R	AGTCAGTTCTCGTAGGGTGC
avant-stops_F1	GTAGCCGCCGTTGTTGTTAT	e10-F	CTTCCATCTCACTTCATCTC
entre-stops_F1	GGAACTGATGAATGGGAGCA	3U11R	GGATGAATTTGGGAGGTACCC
stop_F1	CCCCCTGAACCTGAAACATA	e11-F	GCTCCCATCACTTCATCCCT
after_lox1 LSL F	GAATTCCGCAAGCTAGCC	3'homologie_F1	CTGAGGTCCAGAGGCACTTT
p53 int1-5 F	TGGCCATCTTTAATAAAG	3'homologie_F2	GGAGGAGGGGCTAAAACAAT
stop_R1	TCCCTCGACCAGACATGATA	DTA R1	GTCCCGTGGTACGAAGAAAA
283+L3F	AGGCTTGAGCAGCCTGAATA	DTA-R2	AGGGAAGGCTGAGCACTACA
I2E2F	ACTACATAGCAAGTTGGAGGCCAG	DTA_R3	TTCGCCTGTTCCCAGTTATT

### Generation of Knock-In mice

129X1/SvJ-PRX-129X1 #1 embryonic stem (ES) WT cells from the Jackson Laboratory were electroporated with the targeting construct purified and linearized with NotI. Of about a 100 G418-resistant clones, 16 recombinants were identified by long-range PCR, and 6 candidates

were confirmed by internal PCR and Southern Blot. Two clones were injected intoC57BL/6J (B6) blastocysts that were introduced into pseudo-pregnant females. Germline transmission was verified by genotyping embryos from breeding of chimeras –with high percentage of agouti coat color–with WT B6 mice and positive agouti p53<sup>+/LSLY217C</sup> were obtained. In vivo excision of the LSL cassette was performed by breeding p53<sup>+/LSLY217C</sup> male mice withfemales carrying the PGK-Cre transgene <sup>32</sup> and the descendants were verified by genotyping. The p53<sup>Y217C</sup> mutation was genotyped by PCR using the following primers followed by a BanII digestion.

p53-I4_F2	gtgtgttggccatctctgtg
p53-I6_R2	aaccggactcagcgtctcta

All experiments were performed according to IACUC regulations as supervised by the Curie Institute's "*Comité d'éthique en experimentation animale*"

#### Cells and cell culture reagents

Primary MEFs were isolated from 13.5 day embryos from  $p53^{+/-}$  or  $p53^{+/YC}$  mice intercrosses. They were cultured in a 5% CO2 and 3% O2 incubator, in DMEM Glutamax (Gibco), completed with 15% Fetal Bovine Serum (FBS; Biowest), 100µM β-mercaptoethanol (Millipore), 10µMNon Essential Amino-Acids and Penicillin/Streptavidine (NEAA/PS, Gibco) for at most 6 passages. For stress response protocols, cells were irradiated at RT with 2.9 Gy/min in a Cs  $\gamma$ -irradiator and collected 24 hours later, or treated with 10µM Nutlin3a (Sigma-Aldrich)or Doxorubcin (Sigma-Aldrich) at 0.5µg/ml for 24h. For the drug testing experiments, cells were treated ornot with 10µM Nutlin3a for 24h then treated with the tested molecule at different concentrations and different time courses (shown treatments at 250 or 300µM for 24h).

#### Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted using Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel) and reverse Transcribed using SuperScript III (Invitrogen). Real-time quantitative PCRs were performed on an ABI PRISM 7500 sequence detection system using PowerSYBR Green mastermix (Applied Biosystems). Primer sequences for quantification are available upon request. The mRNA expression levels were normalized to both Arp and PPIA.

## Western blots

Cells or organs were harvested in RIPA extraction buffer (Tris 50mM, pH8, 150Mm NaCl, 1% NP40, 0,5% Deoxycholic acid, 0,1% SDS, 2mM EDTA) supplemented with Protease Inhibitor Coktail (Roche). Protein detection by immunoblotting was performed using antibodies raised against p53 (CM-5 rabbit polyclonal antibody, Novocastra, 1/1000), p21 (F5 mouse monoclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology, 1/250), MDM2 (4B2 mouse monoclonal antibody, Abcam, 1/1000) and actin (rabbit polyclonal antibody, Sigma-Aldrich, 1/500). Chemiluminescence revelation of western blots was achieved with the Super Signal West Dura (Perbio, France). Bands quantification was performed using ImageJ, and normalized to actin as loading control.

#### Flow cytometry

For cell cycle studies, log phase cells were irradiated at RT with a Cs  $\gamma$ -irradiator at doses of 0, 3 or 12 Gy and incubated for 24h. Cells were then pulse-labeled for 1 h with BrdU (10  $\mu$ M), fixed in 70% ethanol, double-stained with FITC anti-BrdU and Propidium Iodide, then sorted by using a LSRII FACS machine. Data were analyzed using Flowjo software.

For apoptosis assays, age-matched mice were irradiated at 6 weeks with a Cs  $\gamma$ -irradiator at doses of 0 or 10 Gy. Thymi were extracted 4h later, filtered through a 70  $\mu$ m smash and stained with Annexin V-FITC (Abcam) and Propidium Iodide, then analyzed with a LSRII FACS machine. Data were analyzed using Flowjo software.

#### Histological analyses

Organs were fixed in formol 4% for 48h, then in ethanol 70%, and embedded in paraffin wax. Serial sections were stained with hematoxylin and eosin by the pathology platform using standard procedures <sup>33</sup>.

#### Statistical analyses

The Student's t test was used in all figures to analyze differences between two groups of values. For the proportions of mice at weaning, the observed mice count was compared to the expected count according to Mendel's distribution and a Chi-square ( $\chi$ 2) test. For the survival curves analyses we used log-rank Mantel-Cox test to compare the curves of two genotypes. Analyses were performed by using GraphPad Prism, and values of  $p \le 0.05$  were considered significant (asterix).

## REFERENCES

- 1. Petitjean, A. *et al*.Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat***28**, 622-9 (2007).
- 2. Joerger, A.C. & Fersht, A.R. Structural biology of the tumor suppressor p53 and cancer-associated mutants. *Adv Cancer Res***97**, 1-23 (2007).
- 3. Bullock, A.N., Henckel, J. & Fersht, A.R. Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy. *Oncogene***19**, 1245-56 (2000).
- 4. Wilcken, R., Wang, G., Boeckler, F.M. & Fersht, A.R. Kinetic mechanism of p53 oncogenic mutant aggregation and its inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A***109**, 13584-9 (2012).
- 5. Joerger, A.C., Ang, H.C. & Fersht, A.R. Structural basis for understanding oncogenic p53 mutations and designing rescue drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A***103**, 15056-61 (2006).
- 6. Joerger, A.C. & Fersht, A.R. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem***77**, 557-82 (2008).
- 7. Oren, M. & Rotter, V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol***2**, a001107 (2010).
- 8. Freed-Pastor, W.A. & Prives, C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev***26**, 1268-86 (2012).
- 9. Olive, K.P. *et al.* Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell***119**, 847-60 (2004).
- 10. Lang, G.A. *et al*.Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell***119**, 861-72 (2004).
- 11. Lee, M.K. & Sabapathy, K. The R246S hot-spot p53 mutant exerts dominant-negative effects in embryonic stem cells in vitro and in vivo. *J Cell Sci***121**, 1899-906 (2008).
- 12. Boeckler, F.M. *et al.* Targeted rescue of a destabilized mutant of p53 by an in silico screened drug. *Proc Natl Acad Sci U S A***105**, 10360-5 (2008).
- 13. Basse, N. *et al.* Toward the rational design of p53-stabilizing drugs: probing the surface of the oncogenic Y220C mutant. *Chem Biol***17**, 46-56 (2010).
- 14. Hanel, W. *et al.* Two hot spot mutant p53 mouse models display differential gain of function in tumorigenesis. *Cell Death Differ***20**, 898-909 (2013).
- 15. Sah, V.P. *et al.* A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nat Genet***10**, 175-80 (1995).
- 16. Donehower, L.A. *et al.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature***356**, 215-21 (1992).
- 17. Jacks, T. *et al.* Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol***4**, 1-7 (1994).
- 18. Kenzelmann Broz, D. & Attardi, L.D. In vivo analysis of p53 tumor suppressor function using genetically engineered mouse models. *Carcinogenesis***31**, 1311-8 (2010).
- 19. Song, H., Hollstein, M. & Xu, Y. p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. *Nat Cell Biol***9**, 573-80 (2007).
- 20. Liu, D.P., Song, H. & Xu, Y. A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. *Oncogene***29**, 949-56 (2010).

- 21. Kim, M.P., Zhang, Y. & Lozano, G. Mutant p53: Multiple Mechanisms Define Biologic Activity in Cancer. *Front Oncol***5**, 249 (2015).
- 22. Candi, E., Agostini, M., Melino, G. & Bernassola, F. How the TP53 family proteins TP63 and TP73 contribute to tumorigenesis: regulators and effectors. *Hum Mutat***35**, 702-14 (2014).
- 23. Liu, J., Zhang, C. & Feng, Z. Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)***46**, 170-9 (2014).
- 24. Muller, P.A. & Vousden, K.H. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol*15, 2-8 (2013).
- 25. Izawa, N. *et al.* A Japanese patient with Li-Fraumeni syndrome who had nine primary malignancies associated with a germline mutation of the p53 tumor-suppressor gene. *Int J Clin Oncol***13**, 78-82 (2008).
- 26. Ognjanovic, S., Olivier, M., Bergemann, T.L. & Hainaut, P. Sarcomas in TP53 germline mutation carriers: a review of the IARC TP53 database. *Cancer***118**, 1387-96 (2012).
- 27. Liu, Y. *et al.* Deletions linked to TP53 loss drive cancer through p53-independent mechanisms. *Nature***531**, 471-5 (2016).
- 28. Liu, X. *et al.* Small molecule induced reactivation of mutant p53 in cancer cells. *Nucleic Acids Res***41**, 6034-44 (2013).
- 29. Joerger, A.C. *et al*.Exploiting Transient Protein States for the Design of Small-Molecule Stabilizers of Mutant p53. *Structure***23**, 2246-55 (2015).
- 30. Bauer, M.R. *et al*. Harnessing fluorine-sulfur contacts and multipolar interactions for the design of p53 mutant Y220C rescue drugs. *ACS Chem Biol* (2016).
- 31. Simeonova, I. *et al.* Mutant mice lacking the p53 C-terminal domain model telomere syndromes. *Cell Rep***3**, 2046-58 (2013).
- 32. Lallemand, Y., Luria, V., Haffner-Krausz, R. & Lonai, P. Maternally expressed PGK-Cre transgene as a tool for early and uniform activation of the Cre site-specific recombinase. *Transgenic Res***7**, 105-12 (1998).
- 33. Prophet, C.M. Patient discharge referral: interdisciplinary collaboration. *Proc Annu Symp Comput Appl Med Care*, 332-6 (1992).

## II. P53 ET INSUFFISANCE MEDULLAIRE

## Article n°3

## <u>Mutant Mice Lacking the p53 C-Terminal Domain</u> <u>Model Telomere Syndromes</u>

Iva Simeonova, <u>Sara Jaber</u>\*, Irena Draskovic\*, Boris Bardot, Ming Fang, Rachida Bouarich-Bourimi, Vincent Lejour, Laure Charbonnier, Claire Soudais, Jean-Christophe Bourdon, Michel Huerre, Arturo Londono-Vallejo and Franck Toledo

## Cell Reports (2013) 3: 2046-2058.

#### **Résumé :**

Mon second projet est plus avancé et tout aussi prometteur en matière d'étude du suppresseur de tumeur p53 mais également d'applications médicales. Le domaine C-terminal de p53 (CTD) comporte les résidus 364–393 et qui a été amplement étudié. Il semble être un domaine régulateur de la fonction de p53 qui a aussila fonction particulière de reconnaître et lier l'ADN, mais son rôle restait controversé. Plusieurs études ont indiqué que l'altération ou la délétion du CTD augmente l'efficacité de liaison à des séquences nucléotidiques courtes. Des résultats contradictoires ont remis en cause le modèle de régulation négative de p53 par son CTD et proposent un modèle de « glissement » de p53 sur l'ADN pour favoriser la reconnaissance des séquences cibles.

Afin de mieux comprendre le rôle du domaine C-terminal de p53 *in vivo*, notre équipe a créé une souris qui exprime une p53 tronquée de son CTD (derniers 31 acides-aminés :  $p53^{\Delta 31}$ ). L'analyse des souris  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$ nous a permis de montrer clairement que la délétion du CTD entraîne une augmentation de l'activité de p53. Ceci indique que le CTD exerce essentiellement un rôle régulateur négatif. A la suite de notre étude d'autres équipes ont entrepris la même démarche de délétion du CTD *in vivo* avec les modèles  $p53^{\Delta 24241}$  et  $p53^{\Delta 30242}$  dont les résultats sont abordés dans le paragraphe II.A de la partie « Discussion ».

Nous avons montré que les souris  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  présentent une aplasie médullaire et une fibrose pulmonaire, et que leurs cellules ont des télomères anormalement courts. Ces souris

présentent ainsi la plupart des signes cliniques d'une dyskératose congénitale (DC), l'archétype des syndromes télomériques. Nous avons ensuite montré que l'activation de p53 conduit à une diminution de l'expression de quatre gènes impliqués dans le maintien des télomères :*Dyskerin (Dkc1), Rtel1, Tinf2* et *Terf1*. Ces observations semblent particulièrement pertinentes puisque chez l'Homme des mutations de *Dkc1, Rtel1* ou *Tinf2* peuvent causer une dyskératose congénitale. En utilisant des souris p53<sup> $\Delta$ 31/ $\Delta$ 31</sup> de fonds génétiques différents, nous avons également observé qu'un niveau plus élevé de *Rtel1* permet d'atténuer la sévérité des symptômes des souris atteintes. Le phénotype télomérique causé par la délétion du CTD dépend donc des niveaux d'expression d'au moins l'un des gènes télomériques régulés par p53.

Cette étude démontre que p53 joue un rôle majeur, auparavant insoupçonné, dans la régulation du métabolisme des télomères. Un des enjeux à venir de ce projet est de rechercher des mutations dans des gènes de la voie p53 qui pourraient être causales chez des patients atteints de DCsans anomalie moléculaire identifiée(30% des patients DC).

Please cite this article in press as: Simeonova et al., Mutant Mice Lacking the p53 C-Terminal Domain Model Telomere Syndromes, Cell Reports (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.028

# Cell Reports Article



# Mutant Mice Lacking the p53 C-Terminal Domain Model Telomere Syndromes

Iva Simeonova,<sup>1,5,6</sup> Sara Jaber,<sup>1,5,6,9</sup> Irena Draskovic,<sup>2,5,6,9</sup> Boris Bardot,<sup>1,5,6</sup> Ming Fang,<sup>1,5,6</sup> Rachida Bouarich-Bourimi,<sup>1,5,6</sup> Vincent Lejour,<sup>1,5,6</sup> Laure Charbonnier,<sup>1,5,6</sup> Claire Soudais,<sup>3,7</sup> Jean-Christophe Bourdon,<sup>8</sup> Michel Huerre,<sup>4</sup> Arturo Londono-Vallejo,<sup>2,5,6</sup> and Franck Toledo<sup>1,5,6,\*</sup> <sup>1</sup>Genetics of Tumor Suppression

<sup>2</sup>Telomeres and Cancer "Équipe Labellisée Ligue"

<sup>3</sup>CD4+T-Lymphocytes and Anti-Tumour Response

<sup>4</sup>Pathology Service

Institut Curie, Centre de Recherche, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France

<sup>5</sup>UPMC Paris 06, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France

<sup>6</sup>CNRS UMR 3244, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France

7INSERM U932, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France

<sup>8</sup>Ninewells Hospital, University of Dundee, Dundee DD19SY, Scotland

<sup>9</sup>These authors contributed equally to this work

\*Correspondence: franck.toledo@curie.fr

http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.028

#### SUMMARY

Mutations in p53, although frequent in human cancers, have not been implicated in telomere-related syndromes. Here, we show that homozygous mutant mice expressing  $p53^{\Delta 31}$ , a p53 lacking the C-terminal domain, exhibit increased p53 activity and suffer from aplastic anemia and pulmonary fibrosis, hallmarks of syndromes caused by short telomeres. Indeed, p53<sup>A31/A31</sup> mice had short telomeres and other phenotypic traits associated with the telomere disease dyskeratosis congenita and its severe variant the Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. Heterozygous p53<sup>+/Δ31</sup> mice were only mildly affected, but decreased levels of Mdm4, a negative regulator of p53, led to a dramatic aggravation of their symptoms. Importantly, several genes involved in telomere metabolism were downregulated in  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  cells. including Dyskerin, Rtel1, and Tinf2, which are mutated in dyskeratosis congenita, and Terf1, which is implicated in aplastic anemia. Together, these data reveal that a truncating mutation can activate p53 and that p53 plays a major role in the regulation of telomere metabolism.

#### INTRODUCTION

Mutations in *TP53*, the gene encoding transcription factor p53, are frequently observed in sporadic cancers (Nigro et al., 1989), and germline *TP53* mutations cause the Li-Fraumeni syndrome of cancer predisposition (Malkin et al., 1990; Srivastava et al., 1990). These and other findings established p53 as a major tumor suppressor (Lane and Levine, 2010). In recent years, however, p53 emerged as a protein with a wide variety of functions: it is now thought to regulate longevity, fertility, and the production

of stem cells and is involved in diseases including diabetes and several neurological disorders (Brady and Attardi, 2010).

Most p53 mutations in cancers affect the core DNA-binding domain of the protein, altering its capacity to regulate transcriptional target genes (Toledo and Wahl, 2006). Importantly, however, p53 contains a second DNA-binding domain in its carboxyl terminus (Foord et al., 1991), whose role remains elusive (Hupp et al., 1992; McKinney et al., 2004). Early studies suggested that the p53 C-terminal domain (CTD), whose interaction with DNA is not sequence dependent, acts as a negative regulator of the core DNA-binding domain (Hupp et al., 1992). However, later reports concluded that p53 requires its CTD for efficient recognition of target gene sequences (McKinney et al., 2004; Tafvizi et al., 2011; Hamard et al., 2012; Kim et al., 2012). The phosphorylation of C-terminal serines 378 and 392 was proposed to increase p53 DNA binding (Hupp et al., 1992; Takenaka et al., 1995), but only the latter was mutated and analyzed in vivo (Bruins et al., 2004). Furthermore, posttranslational modifications of C-terminal lysines were proposed to be essential for the regulation of p53 stability and activity, but mice with C-terminal lysines mutated into arginines appeared similar to wild-type (WT) mice (Feng et al., 2005; Krummel et al., 2005), except for a hypersensitivity to  $\gamma$ -irradiation (Wang et al., 2011a). Importantly, in vitro data suggested that a deletion of the p53 CTD, or mutations of C-terminal lysines, might cause distinct phenotypes because the CTD is required for an optimal interaction of p53 with Mdm2, a ubiquitin ligase that regulates p53 stability (Poyurovsky et al., 2010).

Here, we targeted a nonsense mutation at the mouse *Trp53* locus to evaluate the consequences of a deletion of the p53 CTD in vivo. The results we obtained clearly demonstrate that a deletion of the CTD leads to increased p53 activity. Most mice expressing a p53 lacking the CTD died rapidly after birth and exhibited features typical of telomere syndromes, including aplastic anemia, lung fibrosis, and short telomeres. Consistent with these observations, we found that p53 activation leads to the downregulation of several genes involved in telomere

Cell Reports 3, 1-13, June 27, 2013 ©2013 The Authors 1



metabolism including *Dyskerin*, a gene frequently mutated in dyskeratosis congenita (DC), the archetypal telomere syndrome (Armanios and Blackburn, 2012). These data provide evidence that p53 plays an important role in the regulation of telomere metabolism.

#### RESULTS

#### Rationale for the Targeting of a Nonsense Mutation Affecting the p53 CTD

In most in vitro studies, p53 mutants lacking the last 30–33 residues were analyzed. These mutants lacked a region enriched in basic residues (lysines, arginines, and histidines within residues 363–382 in human p53) and most if not all the C-terminal residues subject to posttranslational modifications (lysines, serines, and threonines within residues 362–392 in human p53). However, they retained an intact tetramerization domain (within residues 326–355 in human p53) (Figure S1A). Here, we aimed to analyze the consequences of a similar deletion of the p53 CTD in vivo and, thus, to target a nonsense mutation leading to a mouse p53 mutant that lacks the last 30–33 residues.

However, targeting a nonsense mutation at the murine Trp53 locus presented two possible obstacles. First, a mutation removing the last 30-33 residues, within the penultimate exon (exon 10), might cause nonsense-mediated mRNA decay. Second, Trp53 encodes, from mutually exclusive final exons. isoforms with two distinct CTDs: exon 11, used predominantly, encodes the "classical" p53 protein, whereas exon AS (for alternative splicing) encodes mouse-specific isoforms with a shorter C terminus (Arai et al., 1986). Therefore, although a mutation in exon 11 encoding a protein with a deletion of at most 26 residues would prevent mRNA degradation, we were concerned that it might perturb mRNA splicing and lead to compensatory p53AS overexpression (Figure S1B). These possibilities prompted us to perform preliminary experiments in which constructs encoding proteins with deletions of the last 26 (p53<sup> $\Delta$ 26</sup>) or 31 (p53<sup> $\Delta$ 31</sup>) residues were targeted in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) by recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) (Figures S1C and S1D). Neither mutation led to measurable decreases in p53 activity or p53 mRNA levels, but the mutation encoding p53<sup>426</sup> was associated with a 9-fold increase in p53AS mRNAs (Figures S1E-S1J). From these data, we decided to create a mouse with a nonsense mutation deleting the last 31 residues.

#### p53<sup>A31/A31</sup> MEFs Exhibit Increased p53 Activity

To generate a mouse expressing p53<sup>A31</sup> conditionally, we used a targeting vector containing the mutation in exon 10 and transcriptional Stops flanked by LoxP sites (LSL) upstream of coding sequences (Figures 1A–1D). F1 intercrosses then produced p53<sup>LSL-A31/LSL-A31</sup> MEFs (Figure 1E). To analyze the effect of the targeted mutation, we first excised the LSL cassette ex vivo by adding Cre recombinase to p53<sup>LSL-A31/LSL-A31</sup> MEFs or to p53<sup>LSL-A31/LSL-A31</sup> MEFs (Ventura et al., 2007) as controls (Figures 2A and 2B). Similar p53 mRNA levels were found in the resulting p53<sup>WT/WT</sup> and p53<sup>A31/A31</sup> MEFs, but mutant cells contained higher mRNA levels of the p53 targets *p21(Cdkn1a)* and *Mdm2*, indicating an increased p53 activity (Figures 2C and 2D).

2 Cell Reports 3, 1-13, June 27, 2013 ©2013 The Authors

 $p53^{\text{+/LSL-}\Delta31}$  mice were also mated with PGK-Cre mice to obtain MEFs expressing  $p53^{\Delta 31}$  constitutively, analyzed below. Immunofluorescence revealed that the  $p53^{\Delta 31}$  protein is mostly nuclear, more abundant than p53<sup>WT</sup>, and that it accumulates in response to stress (Figure 2E). Western blots confirmed the increased p53 levels in mutant cells (Figure 2F), p53<sup>431</sup> protein levels were regulated by the ubiquitin ligase Mdm2, as indicated by treatment with Nutlin, a specific Mdm2 inhibitor (Figure 2G). The p21 and Mdm2 protein levels were increased in p53<sup>Δ31/Δ31</sup> MEFs (Figure 2F), and both genes were transactivated more efficiently in mutant cells (Figure 2H), although p53<sup> $\Delta$ 31</sup> did not appear to bind specific sequences at the p21 and Mdm2 promoters more efficiently than p53WT (Figure 2I). Additional experiments confirmed that p53 target genes are more efficiently regulated in p53<sup>431/431</sup> cells (Figure S2A). Mutant MEFs presented increased G1/S ratios before or after irradiation (Figures 2J and S2B) and ceased to proliferate prematurely (Figures 2K and 2L). Together, these data demonstrated that p53<sup>A31/A31</sup> cells exhibit increased p53 activity.

#### p53<sup>A31/A31</sup> Mice Model Telomere Syndromes

p53<sup>A31/A31</sup> mice were born in Mendelian proportions from p53<sup>+/Δ31</sup> intercrosses, but most died 14-43 days after birth (Figure 3A). Because a mutation removing the last 31 residues of the CTD prevents the expression of isoforms with an AS C terminus (Figure S1B), we also generated mice with a specific deletion of exon AS. None of these mutants died within 3 months after birth (Figure S3), indicating that the premature death of  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$ mice does not result from a loss of p53AS isoforms. The p53<sup>A31/A31</sup> mice that died within a month were significantly smaller than their littermates (Figure 3B), as reported for mice with an increased p53 activity (Mendrysa et al., 2003; Liu et al., 2007, 2010). Other evidence of increased p53 activity (Liu et al., 2007; Terzian et al., 2007; McGowan et al., 2008) in p53<sup>431/431</sup> mice included darker footpads and tails (Figures 3C and S4A), increased thymocyte apoptosis (Figures 3D and S4B), cerebellar hypoplasia, and hypogonadism in males (Figures S4C and S4D). p53<sup>A31/A31</sup> mice suffered from severe pancytopenia and had hypertrophic hearts typical of anemic animals (Figures 3E and 3F). A dramatic decrease in marrow cellularity was observed in p53<sup>431/431</sup> mice (Figure 3G), and mutant bone marrow cells (BMCs) lacked hematopoietic progenitors (Figures 3H, 3I, S4E, and S4F). Thus, the premature death of most  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  animals likely results from aplastic anemia and consecutive heart failure, consistent with previous reports of hematopoietic defects correlating with spontaneous perinatal death (Liu et al., 2007, 2010), accelerated aging (Dumble et al., 2007), or increased radiosensitivity (Mendrysa et al., 2003; Herrera-Merchan et al., 2010; Wang et al., 2011a) in mouse models with increased p53 activity.

Strikingly, p53<sup> $\Delta$ 31/ $\Delta$ 31</sup> mice also developed pulmonary fibrosis (Figures 4A and 4B). In humans, the association of aplastic anemia and pulmonary fibrosis characterizes syndromes caused by abnormally short telomeres (Parry et al., 2011b). We compared the length of telomeres in WT and p53<sup> $\Delta$ 31/ $\Delta$ 31</sup> cells and found shorter telomeres in mutant cells (Figures 4C and 4D). Furthermore, telomere dysfunction-induced foci were more frequent in p53<sup> $\Delta$ 31/ $\Delta$ 31</sup> cells (Figure S5). This led us to conclude that
Please cite this article in press as: Simeonova et al., Mutant Mice Lacking the p53 C-Terminal Domain Model Telomere Syndromes, Cell Reports (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.028





#### Figure 1. Targeting a Deletion of the CTD at the Mouse Trp53 Locus

(A) Targeting strategy. The *Trp53* gene is within a 17-kb-long EcoRI (RI) fragment (black boxes indicate coding sequences; white boxes show UTRs). The targeting construct (above) contains (1) a 1.5-kb-long 5' homology region; (2) a LSL cassette with a *neomycin* selection gene (Neo), four transcriptional Stops (STOP), and a EcoRI site, flanked by LoxP sites (arrowheads); (3) p53 exons, including the nonsense mutation in exon 10 (asterisk) and an additional BcI I site; (4) a 2.8-kb-long 3' homology region; and (5) the *diphtheria a*-toxin (DTA) gene for targeting enrichment. Recombinants from the depicted crossing-overs were identified by a 2.4-kb-long band after PCR with primers i and j, and bands of 2.1, 1.1, and 0.5 kb after PCR with primers g and h and BcI I digestion. Recombinant clones were also analyzed by Southern blot with the indicated probe as containing a 10.5 kb EcoRI band. The mutation was routinely genotyped by PCR with primers e and f and BcI I digestion. (B–D) Screening of recombinant clones as described in (A). ES clones were screened (asterisk [\*] indicates a positive clone) by PCR with primers i and j (B), with primers g and h, then PCR products were digested or not (b or u) with BcII (C) and by Southern blot (D).

(E) MEF genotyping by PCR. MEFs, prepared from embryos from an intercross of p53<sup>+/I,SL-Δ31</sup> mice, were genotyped by PCR with primers e and f followed by BcI I digestion.

See also Figure S1.

 $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  mice model DC, an archetypal telomere syndrome caused by mutations in genes encoding components of the telomerase or shelterin complexes, or telomerase regulators (Armanios and Blackburn, 2012). In support of this conclusion,  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  mice presented full-blown clinical features of DC: cutaneous hyperpigmentation, nail dystrophy, and oral leukoplakia (Figures 4E and 4F). Furthermore, the small size, hypogonadism, and cerebellar hypoplasia observed in some mice (Figures 3B, S4C, and S4D) characterize patients with the Hoyeraal-Hreidarsson syndrome (HHS), a severe variant of DC (Armanios and Blackburn, 2012).

DC-related features were also detected in  $p53^{+/\Delta 31}$  mice: three  $p53^{+/\Delta 31}$  mice died within a year with a hypertrophic heart (Figure 5A). Moreover, heterozygous mutants with lower levels of

p53-negative regulators (i.e., most p53<sup>+/ $\Delta$ 31</sup> Mdm4<sup>+/-</sup> and a few p53<sup>+/ $\Delta$ 31</sup> Mdm2<sup>+/-</sup> mice) died within 3 months (Figure 5B). This suggested that the levels of p53 inhibitors—particularly Mdm4—impacted the severity of DC-related symptoms. Accordingly, bone marrow cellularity and telomere length were decreased in p53<sup>+/ $\Delta$ 31</sup> Mdm4<sup>+/-</sup> mice compared to p53<sup>+/ $\Delta$ 31</sup> mice (Figures 5C, 5D, and S6).

#### p53 Activation Alters the Expression of Genes Mutated in Telomere Syndromes

Animal models recently suggested that dysfunctional telomeres (Wang et al., 2011b) or altered ribosomal RNA processing (Pereboom et al., 2011) could lead to p53 activation and bone marrow failure. Our data suggested that a p53-truncating mutation might

Please cite this article in press as: Simeonova et al., Mutant Mice Lacking the p53 C-Terminal Domain Model Telomere Syndromes, Cell Reports (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.028





#### Figure 2. p53<sup>A31/A31</sup> MEFs Exhibit Increased p53 Activity

(A) Strategy to analyze the effects of an excision of the LSL cassette ex vivo. A His-tagged NLS-Cre recombinase (HTN-Cre) was added to p53<sup>LSL-A31/LSL-A31</sup> MEFs, allowing excision of the Stop cassette within 24 hr. p53<sup>A31/A31</sup> MEFs were then recovered and analyzed (right). As controls, p53<sup>LSL-WT/LSL-WT</sup> MEFs were treated likewise (left). p53<sup>LSL-A31/LSL-A31</sup> MEFs were also treated with a buffer solution devoid of Cre as negative controls (center).

(B) Efficiency of the Cre-mediated excision of the LSL cassette. LSL excision was determined using multiplex PCR with primers k, I, and m. Prior excision, a 278bp-long product results from amplification with primers k and I, whereas primers m and I are too far apart to generate a PCR product. After excision, primers m and I generate a 330-bp-long product. The PCR analysis of the experiment described in (A) is shown: PCRs show ~100% efficiency in LSL excision (Exc.) in lanes a, d, and e; and 0% in lanes b and c.

(C and D) p53<sup>LSL-31/LSL-31</sup> MEFs exhibit increased p53 activity after LSL excision. mRNAs were prepared from p53<sup>LSL-WT/LSL-WT</sup> MEFs treated with HTN-Cre (a) or p53<sup>LSL-331/LSL-331</sup> MEFs treated with buffer (b and c) or HTN-Cre (d and e). p53 mRNAs (C) or p21 and Mdm2 mRNAs (D) were quantified using real-time PCR, normalized to control mRNAs, then the amount in (a) was assigned a value of 1. (E–L) Comparative analysis of WT and p53<sup>Δ31/Δ31</sup> MEFs. (E) WT and p53<sup>Δ31/Δ31</sup> (Δ31/Δ31) MEFs untreated (Unt) or treated with 0.5 µg/ml Adriamycin (Adr) for 24 hr were stained with a p53 antibody, and their DNA was

counterstained with DAPI.

(legend continued on next page)

# Open ACCESS

be sufficient to cause bone marrow failure but also typical DC features including short telomeres and oral leukoplakia (Table 1). Laboratory mice have long telomeres, and mice that lack telomerase exhibit short telomeres only after several generations of intracrosses (Blasco et al., 1997). However, mice with a telomerase haploinsufficiency and a deficient shelterin complex exhibit telomere dysfunction in a single generation (G1) (Hockemeyer et al., 2008; He et al., 2009). The short telomeres in G1 p53<sup> $\Delta$ 31/ $\Delta$ 31</sup> mice thus suggested a pleiotropic effect of p53 on telomere metabolism.

Although p53 may regulate TRF2 via the ubiquitin ligase Siah1 (Fujita et al., 2010), a link between p53 and genes mutated in DC appeared most likely for *TCAB1/WRAP53* because this gene partially overlaps *TP53* (Zhong et al., 2011). However, we found no evidence of decreased Tcab1 expression in p53<sup> $\Delta$ 31/ $\Delta$ 31</sup> cells (Figure 6A). We next quantified the mRNAs for nine other genes known to cause DC or implicated in aplastic anemia in p53<sup> $\Delta$ 31/ $\Delta$ 31</sup> cells significant decreases in the expression of *Dyskerin (Dkc1)*, *Rtel1*, *Tinf2*, and *Terf1* in p53<sup> $\Delta$ 31/ $\Delta$ 31</sup> cells (Figures 6B and 6C). Consistent with this, p53 activation led to the downregulation of the four genes, with a stronger effect on *Dkc1* (Figure 6D).

Interestingly, mice in this study were of mixed genetic background (75% C57BI/6J; 25% 129S2/SvPas). The coat color of inbred C57BI/6J (B6) mice is black, whereas that of 129S2/ SvPas (129) is agouti because these strains carry nonagouti (a) or agouti (A<sup>w</sup>) alleles, respectively. We noticed that most  $p53^{\Delta31/\Delta31}$  mice alive after 3 months (Figure 3A) had an agouti coat color and, conversely, that the few  $p53^{+/\Delta31}$  mice that died in less than a year (Figure 5A) had a black coat color. These observations suggested that a gene physically linked to the  $A^w/a$ locus had an impact on the survival of p53<sup>431</sup> mutants and that the 129 allele for this gene correlated with a better survival. Rtel1 appeared as a candidate gene because it is a dominantpositive regulator of telomere length (Ding et al., 2004) that maps 26 cM away from the A<sup>w</sup>/a locus. We used a SNP within the Rtel1 intron 15 (rs33116597) that differs between the B6 and 129 strains to genotype Rtel1 alleles in a cohort of 52  $p53^{\Delta31/\Delta31}$  mice and found a significant increase in survival for p53<sup>A31/A31</sup> mice carrying 129 Rtel1 allele(s) (Figures 6E and 6F). Importantly, when we quantified Rtel1 mRNA levels in BMCs of the C57BI/6J and 129S2/SvPas pure inbred strains, we found increased levels in 129 cells (Figure 6G). Together, these results suggest that basal levels of Rtel1 mRNAs may affect the severity of phenotypes caused by the  $p53^{\Delta 31}$  mutation.

We next aimed to determine how p53 downregulates the *Dkc1*, *Rtel1*, *Tinf2*, and *Terf1* genes. Because p21 levels are known to contribute to the p53-mediated downregulation of many genes (Löhr et al., 2003), we tested if p53 could downregulate these genes in p21<sup>-/-</sup> MEFs. We found that p21 is required for the p53-mediated downregulation of *Rtel1*, *Tinf2*, and *Terf1*, but not *Dkc1* (Figure 6H). This suggested a more direct mechanism for the downregulated after treating WT cells with Nutlin for only 6 hr, whereas for the other genes, we observed a partial downregulation after 6–9 hr of Nutlin and a more efficient downregulation after 24 hr of Nutlin (Figure 6I). Furthermore, chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments provided direct evidence that p53 binds the *Dkc1* promoter (Figures 6J–6K).

In summary, we found that a nonsense mutation in the exon 10 of *Trp53*, encoding the truncated protein  $p53^{\Delta 31}$ , causes an increase in p53 activity and phenotypes related to human telomere syndromes. To perform a more comprehensive analysis of nonsense mutations affecting Trp53 exon 10, we also targeted in MEFs mutations encoding  $p53^{\Delta36}$ ,  $p53^{\Delta45}$ , or  $p53^{\Delta52}$  and found that only the latter two mutations led to measurable decreases in p53 mRNAs and activity (Figures S7A-S7G). Strikingly, the nonsense mutations affecting human TP53 exon 10 that were reported in cancers also cause the loss of at least 45 residues, suggesting that our finding in mice might be relevant to humans (Figure S7H). Given that decreased dyskerin levels may cause short telomeres (Parry et al., 2011a), that Rtel is a major determinant of telomere length (Ding et al., 2004), and that mutations in DKC1 or BTEL1 are found in a significant fraction of patients with DC or HHS (Armanios and Blackburn, 2012; Ballew et al., 2013; Walne et al., 2013), it was important to test whether or not p53 downregulates these genes in human cells. We compared human primary WT cells with p53-deficient cells and observed that the activation of human p53 also leads to the downregulation of DKC1 and RTEL1 (Figures 6L and 6M). Our finding that p53 downregulates these genes in both species strengthens the notion that p53 plays a significant role in the regulation of telomere metabolism.

#### DISCUSSION

## A Targeted Deletion of the p53 CTD Leads to Increased p53 Activity

In this report, we targeted a nonsense mutation at the murine Trp53 locus to analyze the consequences of a deletion of the

Mean + SEM from three or more experiments are shown in all figures. \*\*\* $p \le 0.001$ ; \*\* $p \le 0.01$ ; \* $p \le 0.05$ ; n.s., not significant by Student's t test. See also Figure S2.

<sup>(</sup>F) Protein extracts, prepared from indicated MEFs untreated or treated as in (E), were immunoblotted with antibodies against Mdm2, p53, p21, and actin. Band quantification revealed that unstressed  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  MEFs contained three to three and a half times more p21 or Mdm2 proteins than unstressed WT cells. (G)  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  MEFs were untreated or treated with 10  $\mu$ M Nutlin for 24 hr before protein extraction.

<sup>(</sup>H) mRNAs from indicated MEFs were quantified as in (C), and amounts in unstressed WT cells were assigned a value of 1. Nutl, Nutlin.

<sup>(</sup>I) ChIP assay was performed for p53-binding sites and nonbinding sites at the *p21* and *Mdm2* loci in Adriamycin-treated MEFs with an antibody against p53 phosphorylated serine 18 or rabbit IgG as a negative control. Immunoprecipitates were quantified using real-time PCR. Fold enrichments were normalized to data over an irrelevant region.

<sup>(</sup>J) Cell-cycle control was analyzed in asynchronous cell populations 24 hr after 0, 3, or 12 Gy  $\gamma$ -irradiation.

<sup>(</sup>K) p53<sup>Δ31</sup> leads to a decreased proliferation capacity in a 3T3 protocol. The proliferation of p53<sup>-/-</sup> (KO), WT, and p53<sup>Δ31/Δ31</sup> (Δ31/Δ31) MEFs was compared. Each point is a mean value from two independent MEFs, the value for each MEF resulting from triplicate plates.

<sup>(</sup>L) Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase staining of p53<sup>-/-</sup>, WT, and p53<sup> $\Delta$ 31/ $\Delta$ 31</sup> MEFs at passage 8.

Please cite this article in press as: Simeonova et al., Mutant Mice Lacking the p53 C-Terminal Domain Model Telomere Syndromes, Cell Reports (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.028



D











#### Figure 3. Increased p53 Activity and Aplastic Anemia in p53<sup>A31/A31</sup> Mice

(A) Survival of WT, p53<sup>+/Δ31</sup> (+/Δ31), and p53<sup>Δ31/Δ31</sup> (Δ31/Δ31) mice over 90 days. Cohort sizes are in parentheses.

(B) Examples of 28-day-old (P28) WT,  $p53^{+/\Delta31}$ , and  $p53^{\Delta31/\Delta31}$  littermates.

(C) Photographs of legs and tails of the same mice. Compared to the WT, the heterozygote has a slightly darker pigmentation of the palm and tail. The homozygote mutant has a much darker pigmentation, which includes footpads.

(D) Comparative analysis of hematoxylin and eosin staining (H&E) of the thymus of WT and mutant P23 littermates, showing an increased spontaneous apoptosis in the mutant.

(E) Hemograms from p53<sup>a31/a31</sup> and WT mice. WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; PLT, platelets. All mice were 3–4 weeks old when their hemogram was determined, except for mouse  $\Delta 31/\Delta 31$  #5, moribund at 19 days, which was analyzed and euthanized on the same day.

(F) Mutant mice present enlarged hearts upon dissection. Top view shows example of hearts from WT and p53<sup>331/Δ31</sup> P18 littermates. Bottom view illustrates heart/total body weight ratios determined for nine WT and ten p53<sup>A31/A31</sup> age-matched animals.

(G) H&E of sternum sections from WT and p53<sup>A31/A31</sup> P23 littermates.

(H) BMCs, stained with antibodies against hematopoietic lineage (Lin) markers and cell surface marks Sca1 and c-Kit, were analyzed by flow cytometry. The population of Lin- Sca1+ c-Kit+ (LSK) cells, enriched in hematopoietic stem cells, were calculated as percentage (%) of total mononucleated cells (MNCs). Results are from three mice per genotype.

(I) BMCs (1 or 2 × 10<sup>6</sup>) from WT or p53<sup>a31/a31</sup> donor mice expressing the leukocyte marker CD45.2 were transplanted into lethally irradiated recipient mice (initially expressing marker CD45.1). Transplanted WT cells, but not p53<sup>A31/A31</sup> cells, rescued the irradiated animals by repopulating the bone marrow. Results are from five mice per genotype. BMT, bone marrow transplant.

Mean + SEM are shown in (F) and (H). \*\*\*  $p\,\leq\,0.001,$  Student's t test. See also Figures S3 and S4.

Please cite this article in press as: Simeonova et al., Mutant Mice Lacking the p53 C-Terminal Domain Model Telomere Syndromes, Cell Reports (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.028





Figure 4. p53<sup>A31/A31</sup> Mice Exhibit Features Specific to DC (A and B) Pulmonary fibrosis in p53<sup>A31/A31</sup> mice. Masson's trichrome staining of lungs from WT and p53<sup>A31/A31</sup> mice, shown at different magnifications. Interstitial fibrosis, characterized by deposits of collagen (stained in green), is increased in the mutant. (C and D) p53<sup>431/A31</sup> cells have short telomeres. In (C), telomere length was analyzed in BMCs using flow-FISH with a telomere-specific PNA probe. On top, typical

results with P18 littermate mice are shown (>2,100 cells per sample, from a WT and a p53<sup>431/431</sup> mouse). For each animal, histograms on the right show green fluorescence (Fluo.), with black histograms for cells without the probe (measuring cellular autofluorescence), and green histograms for cells with the probe. The shift in fluorescence intensity is smaller in mutant cells (b < a), indicating reduced telomere length. Histograms on the left show propidium iodide fluorescence (superposed for cells with or without the probe). Bottom row presents results from four animals per genotype. Mean + SEM are shown. \*\*\* p  $\leq$  0.001, Student's (legend continued on next page)





Figure 5. p53<sup>+/ $\Delta$ 31</sup> Mice Are Extremely Sensitive to Mdm4 Levels (A) Survival of WT (+/+) and p53<sup>+/ $\Delta$ 31</sup> (+/ $\Delta$ 31) mice over 1 year, plotted as in Figure 3A.

(B) Survival of  $p53^{+/\Delta 31}$ ,  $Mdm2^{+/-}$  (M2+/-),  $Mdm4^{+/-}$  (M4+/-),  $p53^{+/\Delta 31}$ Mdm2^{+/-} (+/ $\Delta 31$  M2+/-), and  $p53^{+/\Delta 31}$  Mdm4<sup>+/-</sup> (+/ $\Delta 31$  M4+/-) mice over 3 months.

(C) H&E of sternum sections from p53<sup>+/ $\Delta$ 31</sup> and p53<sup>+/ $\Delta$ 31</sup> Mdm4<sup>+/-</sup> littermates. (D) Telomere length was measured by flow-FISH as described in Figure 4C, in BMCs from WT, p53<sup>+/ $\Delta$ 31</sup>, Mdm4<sup>+/-</sup>, and p53<sup>+/ $\Delta$ 31</sup> Mdm4<sup>+/-</sup> mice. Results are from three animals per genotype.

Mean + SEM are shown. \*\*\* $p \le 0.001$ , Student's t test. See also Figure S6.

p53 C-terminal domain ex vivo and in vivo. The mutation led to increased p53<sup> $\Delta$ 31</sup> levels, consistent with in vitro studies that concluded that the p53 CTD is required for an optimal interaction between p53 and its ubiquitin ligase Mdm2 (Poyurovsky et al., 2010). Cells expressing p53<sup> $\Delta$ 31</sup> also exhibited increased p53 activity, despite the fact that the binding of the mutant protein to target gene promoters was not significantly increased. Thus, as earlier observations suggested (Kaeser and Iggo, 2002; Espinosa, 2008), the induction of a p53 target gene is not simply determined by the amount of p53 bound to its promoter. Presumably, the deletion of the p53 CTD might activate transcription by affecting p53-Mdm2 interactions (Poyurovsky et al., 2010) and/or by preventing the formation of p53 CTD-Mediator inactive complexes (Meyer et al., 2010).

Our observation that a p53 mutant lacking the CTD exhibits increased activity may seem surprising when compared to recent studies relying on ectopically expressed human p53 CTD mutants, which concluded that the CTD mainly acts as a positive regulator of p53 functions (Hamard et al., 2012; Kim et al., 2012). Importantly, however, these studies analyzed WT and mutant p53 expressed at equal levels, whereas we showed here that a targeted CTD deletion leads to mutant protein accumulation. In that respect, it is worth considering that despite its increased nuclear abundance,  $p53^{\Delta 31}$  did not exhibit an increased binding at p53 target gene promoters. This may suggest that, on a per molecule basis,  $p53^{\Delta 31}$  is less efficient than WT p53 for sequence-specific DNA binding, consistent with other studies (McKinney et al., 2004; Tafvizi et al., 2011). Therefore, it appears likely that if  $p53^{\Delta 31}$  had been expressed at similar levels than WT p53 in the mutant cells, the overall increase in p53 activity would not have been observed. Our observations thus suggest that differences in expression levels might underlie much of the contradictions in the p53 CTD literature.

#### p53 Mutations Affecting the CTD Model Telomere Syndromes

Germline missense TP53 mutations affecting the core DNAbinding domain are well known to cause the cancer-prone Li-Fraumeni syndrome in humans (Malkin et al., 1990; Srivastava et al., 1990), and mice with equivalent p53 mutations may, like patients with Li-Fraumeni, develop osteosarcomas (Lang et al., 2004; Olive et al., 2004). In striking contrast, we found here that mice homozygous for a germline nonsense mutation affecting the p53 CTD, or compound heterozygotes with a Mdm4 haploinsufficiency, are remarkable models of human telomere syndromes. In murine cells, p53 activation led to the downregulation of four genes including Dyskerin (Dkc1), a gene often mutated in patients with DC (Armanios and Blackburn, 2012). Importantly, in addition to its role as a telomerase component, dyskerin acts as a pseudouridine synthase in snoRNP complexes. This might explain why patients with DC carrying DKC1 mutations exhibit more clinical features than patients carrying TERC mutations (Vulliamy et al., 2011). Similarly, some of the DC features observed in  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  mice might result from p53 activation or Dkc1 downregulation, rather than telomere dysfunction per se. However, decreased telomere length likely played a role in the premature death of  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  mice because we found strain-specific differences in Rtel1 mRNA levels to correlate with differences in the survival of mutant mice.

(E and F) p53<sup>Δ31/Δ31</sup> mice exhibit the triad of physical traits classically used to diagnose DC.

See also Figure S5.

t test. In (D), telomere length was analyzed in WT or p53<sup>Δ31/Δ31</sup> MEFs at passage 5 by quantitative FISH with a telomere-specific Cy3 PNA probe (in red). On top, typical metaphases are shown. In the mutant cells, several chromosomes exhibit faint or no visible telomeric signals. Below, quantification results from an analysis of 28 metaphases per genotype are shown.

<sup>(</sup>E) Cutaneous hyperpigmentation and nail dystrophy on a p53<sup>431/431</sup> hindleg. Arrow points to the dystrophic nail.

<sup>(</sup>F) H&E comparison of the dorsal surface of a WT and a p53<sup>Δ31/Δ31</sup> tongue. The mutant tongue exhibits acanthosis and hyperparakeratosis, typical of oral leukoplakia.



Table 1. Features of DC in p	53 <sup>431/431</sup> Mice and in Other Reported	d Mice with Altered p53 Regula	ation or Dysfunctional Telomeres
Clinical Features in Patients Diagnosed with DC	Observed in p53 <sup>Δ31/Δ31</sup> Mice % Animals with Feature (No. Analyzed)	Observed in Other Mice with Altered p53 Regulation <sup>a</sup>	Observed in Mouse Models of DC <sup>b</sup>
Physical Traits (Diagnostic Triac	l) <sup>c</sup>		
Skin hyperpigmentation	√ 100% (25)	1	1
Nail dystrophy	√ 8% (25)	Not reported	1
Oral leukoplakia	√ 100% (8)	Not reported	Not reported
Pathological Traits <sup>d</sup>			
Bone marrow failure	√ 100% (8)	1	1
Pulmonary fibrosis	√ 87% (8)	Not reported	Not reported
Molecular Feature <sup>®</sup>			
Poor telomere maintenance	✓ 100% (4)	Not reported	1
Associated Features			
Hypertrophic heart	✓ 100% (25)	1	Not reported
Short stature	✔ 63% (25)	1	1
Testicular atrophy	<b>√</b> 91% (11)	1	1
Cerebellar hypoplasia	✓ 30% (10)	1	Not reported

The features used to diagnose DC are indicated in bold. p53<sup>+/Δ31</sup> Mdm4<sup>+/-</sup> mice, not included in this table, exhibited the same features as p53<sup>Δ31/Δ31</sup> mice. Likewise, p53<sup>Δ31/Δ31</sup> MEFs exhibited short/dysfunctional telomeres but were not included in this table.

<sup>a</sup>Mice with altered p53 regulation include mutants with severe decreases in Mdm2 levels (Mendrysa et al., 2003; Liu et al., 2007), combined Mdm2 and Mdm4 haploinsufficiencies (Terzian et al., 2007), complex p53 mutations (McGowan et al., 2008; Liu et al., 2010; Wang et al., 2011a), or constitutive cellular stress (McGowan et al., 2008).

<sup>b</sup>Previously reported mouse models of DC combined a Pot1b deficiency with a telomerase RNA haploinsufficiency (Hockemeyer et al., 2008; He et al., 2009).

<sup>c</sup>DC is classically diagnosed when at least two of these physical features are observed.

<sup>d</sup>Inherited bone marrow failure is found in other syndromes (e.g., Blackfan-Diamond anemia, Fanconi anemia), but the combination of bone marrow failure and pulmonary fibrosis characterizes DC (Parry et al., 2011b).

<sup>e</sup>Telomeres are often analyzed to diagnose DC.

<sup>1</sup>These features can be found in patients with DC but are not specific enough for diagnosis.

Importantly, p53<sup>+/Δ31</sup> mice were mildly affected: they presented only slight alterations (if any) in HSC pools and telomere length, and most were alive for more than 12 months. Because p53<sup>Δ31/Δ31</sup> and p53<sup>+/Δ31</sup> Mdm4<sup>+/-</sup> mice developed full-blown DC features, we conclude that a  $\leq$ 2-fold difference in p53 activity was sufficient to prevent the observation of DC features in heterozygous mice. This observation might explain why mouse models with modest increases in p53 activity were only found to present slight alterations in HSC pools (e.g., Herrera-Merchan et al., 2010).

An important remaining guestion is whether germline p53 mutations affecting the CTD may lead to telomere syndromes in humans. The high degree of conservation between the human and murine p53 CTDs, the comparison of phenotypes caused by nonsense mutations in the exon 10 of the human and mouse p53 genes, and the fact that p53 activation also leads to the downregulation of DKC1 and RTEL1 in human cells together support this possibility. Importantly, genes presently known to cause DC account for about only half of the clinical cases, and patients with DC are now thought to represent a small fraction of persons suffering from a telomere syndrome (Armanios and Blackburn, 2012). Although one should be careful about extrapolating mouse data to human diseases, our results lead us to propose that TP53 (and possibly MDM4) should be sequenced in patients with telomere syndromes of currently unknown molecular origin.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

#### **Cells and Cell Culture Reagents**

MEFs isolated from 13.5-day embryos were cultured in a 5% CO<sub>2</sub> and 3% O<sub>2</sub> incubator, in DMEM GlutaMAX (Gibco), with 15% FBS (Biowest), 100  $\mu$ M 2-mercapteethanol (Millipore), 0.01 mM Non-Essential Amino-Acids, and penicillin/streptavidin (Gibco) for six or less passages, except for 3T3 experiments, performed in a 5% CO<sub>2</sub> incubator for eight passages. Human lung fibroblast MRC5 and its SV40-transformed derivatives were cultured in a 5% CO<sub>2</sub> and 3% O<sub>2</sub>-regulated incubator in MEM (Gibco), completed with 10% FBS, 2 mM L-glutamine (Gibco), 1 mM pyruvate, 10  $\mu$ M Non-Essential Amino-Acids, and penicillin/streptomycin. Cells were irradiated with a Cs  $\gamma$ -irradiator or treated with Adriamycin (Sigma-Aldrich) at 0.5  $\mu$ g/ml or 10  $\mu$ M Nutlin 3a (Sigma-Aldrich).

#### **Quantitative RT-PCR**

Total RNA, extracted using NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel), was reverse transcribed using SuperScript III (Invitrogen). Real-time quantitative PCRs (primers available upon request) were performed on an ABI PRISM 7500 using Power SYBR Green (Applied Biosystems). For strain-specific Rtel1 expression analysis, total mRNAs were extracted from the BMCs of inbred C57BI/6J and 129S2/SVPas mice (Charles River Laboratories), and Rtel1 mRNAs were quantified as above.

#### LSL-A31 Construct

We used mouse genomic p53 DNA from previous constructs (Toledo et al., 2006a, 2006b) and a portion of intron 1 containing a LoxP-Stop-LoxP (LSL) cassette (Ventura et al., 2007) in which the *puromycin*-resistance gene was replaced by a *neomycin* gene (details available upon request). A BsrG I site (in intron 9) and a Fse I site (inserted downstream *Trp53*) were used to swap

Please cite this article in press as: Simeonova et al., Mutant Mice Lacking the p53 C-Terminal Domain Model Telomere Syndromes, Cell Reports (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.028





<sup>(</sup>legend on next page)

Please cite this article in press as: Simeonova et al., Mutant Mice Lacking the p53 C-Terminal Domain Model Telomere Syndromes, Cell Reports (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.028



the nonsense mutation from the p53<sup>A31</sup> RMCE-ASAP construct (Extended Experimental Procedures) in the LSL-targeting construct. The resulting LSL-p53<sup>A31</sup>-targeting vector was fully sequenced before use.

#### Targeting in ES Cells and Genotyping

CK-35 ES cells were electroporated with the targeting construct linearized with Not I. Two independent recombinant clones, identified by long-range PCR and confirmed by Southern blot and PCR, were injected into blastocysts to generate chimeras, and germline transmission was verified by genotyping MEFs from their offspring. RT-PCR of RNAs from p53<sup>LSL-Δ31/LSL-Δ31</sup> MEFs treated with HTN-Cre showed that the mutant cDNA differed from a p53<sup>WT</sup> sequence only by the engineered nonsense mutation. Primers for *Trp53* and *Rtel1* genotyping are available upon request. All experiments were performed according to IACUC regulations.

#### LSL Cassette Excision

Triplicates of 1.8 × 10<sup>5</sup> p53<sup>LSL-WT/LSL-WT</sup> (Ventura et al., 2007) and p53<sup>LSL-Δ37/LSL-Δ31</sup> MEFs were seeded in wells of a 6-well plate and treated with 10  $\mu$ M HTN-Cre for ex vivo excision of the LSL cassette or 10<sup>5</sup> cells with buffer only. After 24 hr, wells were washed, and cells were frozen when reaching 90% confluence. Cells were then thawed for DNA and RNA extractions to determine excision efficiency and for mRNA quantifications. In vivo LSL excision was performed by breeding with PGK-Cre mice.

#### Immunofluorescence

MEFs were cultured on collagen-coated coverslips, exposed to Adriamycin, and analyzed 24 hr later. Coverslips were stained with the p53 antibody CM-5 (Novocastra) and secondary Alexa Fluor 488 anti-mouse antibody (Molecular Probes). Images were captured on an epifluorescence microscope using equal exposure times for all images for each fluor.

#### Western Blots

Protein detection by immunoblotting was performed using antibodies against p53 (CM-5, Novocastra; or FL-393, Santa Cruz Biotechnology), actin (A2066; Sigma-Aldrich), p21 (F5; Santa Cruz Biotechnology), and Mdm2 (4B2), Rtel1 (MP1), and Dyskerin (H-300; Santa Cruz Biotechnology). Chemiluminescence revelation was achieved with SuperSignal West Dura (Perbio). Bands of interest were quantified by using ImageJ and normalized with actin.

#### **ChIP Assay**

ChIP analysis was performed as described (Simeonova et al., 2012), p53-DNA complexes were immunoprecipitated from total extracts by using 5  $\mu$ g of an antibody against mouse Phospho-p53 Ser18 (Cell Signaling Technology) and 15–30  $\mu$ g of sonicated chromatin, or 50  $\mu$ g of a polyclonal antibody against p53 (FL-393) and 300  $\mu$ g of sonicated chromatin. Rabbit IgG (Abcam) was used for control precipitation. Quantitative PCR was performed on ABI PRISM 7500.

#### **Cell-Cycle Assays**

Log phase cells were irradiated at RT with a Cs  $\gamma$ -irradiator at doses of 3 or 12 Gy, incubated for 24 hr, then pulse labeled for 1 hr with BrdU (10  $\mu$ M), fixed in 70% ethanol, double stained with FITC anti-BrdU and propidium iodide, and sorted by using a BD Biosciences FACSort. Data were analyzed using FlowJo.

#### Anatomopathology

Organs were fixed in formol 4% for 24 hr, then ethanol 70%, and embedded in paraffin wax. Serial sections were stained with hematoxylin and eosin or Masson's trichrome using standard procedures (Prophet et al., 1992).

#### Figure 6. p53 Activation Leads to the Downregulation of Genes Involved in Telomere Metabolism

(A) Tcab1 mRNA levels are not altered in p53<sup>Δ31/Δ31</sup> cells. RNAs, prepared from p53<sup>-/-</sup> (KO), WT, and p53<sup>Δ31/Δ31</sup> (Δ31) MEFs, untreated or treated with 10 μM Nutlin for 24 hr, were used to quantify Tcab1/Wrap53 mRNAs. Results are from four independent experiments.
 (B) Evidence of decreased mRNA levels for Dkc1, Rtel1, Tinf2, and Terf1 in unstressed p53<sup>Δ31/Δ31</sup> cells. RNAs, prepared from unstressed p53<sup>-/-</sup>, WT, and

(B) Evidence of decreased mRNA levels for Dkc1, Rtel1, Tinf2, and Terf1 in unstressed p53<sup>Δ31/Δ31</sup> cells. RNAs, prepared from unstressed p53<sup>-/-</sup>, WT, and p53<sup>Δ31/Δ31</sup> MEFs, were used to compare the expression of eight genes known to cause DC (*Ctc1*, *Dkc1*, *Nhp2*, *Nop10*, *Rtel1*, *Terc*, *Tert*, and *Tinf2*) and one gene (*Terf1*) that has been implicated in aplastic anemia, a milder form of telomere syndrome (Armanios and Blackburn, 2012). Results from four independent experiments were analyzed by one-way ANOVA.

(C) p53<sup>431/431</sup> cells contain decreased levels of the dyskerin and Rtel proteins. Protein extracts, prepared from WT and p53<sup>431/431</sup> MEFs, were immunoblotted with antibodies against Rtel, dyskerin (dysk), and actin.

(D) *Dkc1*, *Rtel1*, *Tinf2*, and *Terf1* are downregulated by murine p53. mRNAs for Dkc1, Rtel1, Tinf2, and Terf1 were quantified in p53<sup>-/-</sup>, WT, and p53<sup>Δ31/Δ31</sup> MEFs, untreated or treated with 10 µM Nutlin for 24 hr. Results are from four independent experiments. °p = 0.0545.

(E-G) Improved survival of p53<sup>Δ31/Δ31</sup> mice carrying 129S2/SvPas Rtel1 allele(s).

(E) DNA was extracted from 52 p53<sup>A31/A31</sup> mice of mixed genetic background, then PCR was performed with primers flanking the SNP rs33116597, and products were digested with EcoNI to genotype 129S2/SvPas (129) and C57BI/6J (B6) *Rte/1* alleles because only the B6 PCR products contained an EcoNI site. A typical analysis of four mice is shown, with *Rte/1* genotypes above the gel.

(F) Survival of p53<sup>A31/A31</sup> mice taking Rtel1 genotyping into account. Cohort sizes are in parentheses. The p value is from a log rank test.

(G) Comparison of Rtel1 mRNA levels in the BMCs of 129S2/SvPas (129) and C57BI/6J (B6) mice. Results are from four mice per strain.

(H) p21 is required for the downregulation of *Rtel1*, *Tinf2*, and *Terf1*. RNAs, prepared from WT and p21<sup>-/-</sup> (p21–) MEFs, untreated or treated with 10 µM Nutlin for 24 hr, were used to quantify Dkc1, Rtel1, Tinf2, and Terf1 mRNAs. Results are from three independent experiments.

(I) p53 activation rapidly leads to the efficient downregulation of *Dkc1*. mRNAs for Dkc1, Rtel1, Tinf2, and Terf1 were quantified in WT MEFs, untreated or treated with 10  $\mu$ M Nutlin for 6, 9, 12, or 24 hr. Results are from two independent experiments.

(J and K) p53 regulates the Dkc1 promoter.

(J) ChIP assay was performed at ten different sites surrounding the Dkc1 mRNA transcription start site (TSS) in Adriamycin-treated WT and p53<sup>-/-</sup> (KO) MEFs by using a polyclonal antibody against p53 (FL-393) or rabbit IgG as a negative control. Immunoprecipitates were quantified using real-time PCR. Fold enrichments were normalized to data over an irrelevant region. Indicated values are means from two independent ChIP experiments, each quantified in triplicates. Results suggest p53 binding near the end of exon 1 (E1) of *Dkc1*.

(K) Data from three independent ChIP experiments focusing on the end of Dkc1 exon 1 confirm significant p53 binding.

(L and M) Dyskerin and Rtel are also downregulated by p53 in human cells.

(L) Protein extracts, prepared from WT MRC5 human cells (MRC) and p53-deficient SV40-MRC5 cells (SVM), were immunoblotted with antibodies against Rtel, dyskerin, and actin.

(M) mRNAs were prepared from SV40-MRC5 and MRC5 human cells, untreated or treated with Nutlin, then DKC1 and RTEL1 mRNAs were quantified using realtime PCR, normalized to control mRNAs, and mRNA ratios from Nutlin-treated versus untreated cells were determined. Results from three independent experiments.

Mean + SEM are shown. \*\*\*p  $\leq$  0.001; \*\*p  $\leq$  0.01; \*p  $\leq$  0.05; n.s., not significant by Student's t test. See also Figure S7.



#### Hemograms

For each animal,  $100 \ \mu l$  of blood was recovered retro-orbitally in a  $10 \ \mu l$  citrateconcentrated solution (S5770; Sigma-Aldrich) and analyzed using a MS9 machine (Melet Schloesing Laboratory).

#### Hematopoietic Marker Analysis

BMCs were flushed from femurs and tibias of age-matched WT and p53<sup>Δ31/Δ31</sup> mice, then incubated with FITC-labeled antibodies against markers Gr1, B220, Ter119, TCR, CD19, Dx5, CD11b, CD4, and CD8, PE-conjugated anti-Sca1 and APC-conjugated anti-CD117, then analyzed using FlowJo.

#### Long-Term Reconstitution Assay

Donor BMCs were isolated from WT or p53<sup>A31/A31</sup> littermate mice (Ly5.2) and retro-orbitally injected into lethally irradiated Ly5.1 recipients, 4 hr post 12 Gy irradiation. Six weeks posttransplant, reconstitution of donor leukocytes was analyzed by staining blood cells with antibodies against leukocyte cell surface markers CD45.1 (BD PharMingen) and CD45.2 (BioLegend) and flow cytometry.

#### **Telomeric Flow-FISH**

Flow-FISH was performed as described by Baerlocher et al. (2006). For each animal, the bone marrow from two tibias and two femurs was collected, red blood cells were lysed, then 2 × 10<sup>6</sup> cells were fixed in 500 µl PNA hybridization buffer (70% deionized formamide, 20 mM Tris [pH 7.4], 0.1% Blocking reagent; Roche) and stored at –20°C. Either nothing (control) or 5 µl probe stock solution was added to cells (probe stock solution: 10 µM TelC-FAM PNA probe [PANAGENE], 70% formamide, 20 mM Tris [pH 7.4]), and samples were denatured for 10 min at 80°C before hybridization for 2 hr at RT. After three washes, cells were resuspended in PBS 1x, 0.1% BSA, RNase A 1,000 U/ml, propidium iodide 12.5 µg/ml, and analyzed with a FACSCalibur.

#### **Telomeric Quantitative FISH**

Cells were treated with 0.5  $\mu$ g/ml colcemide for 1.5 hr, submitted to hypotonic shock, fixed in a (3:1) ethanol/acetic acid solution, and dropped onto glass slides. Q-FISH was then carried out as described (Ourliac-Garnier and Londoño-Vallejo, 2011) with a TeIC-Cy3 PNA probe (PANAGENE). Images were acquired using a Zeiss Axioplan 2, and telomeric signals were quantified with Vision (Chromaphor).

#### **Statistical Analyses**

The Student's t test was used in all figures to analyze differences between two groups of values. In Figure 6B, differences among three groups were analyzed by one-way ANOVA. In Figure 6F, a log rank test was used to analyze survival curves. Analyses were performed by using GraphPad Prism, and values of  $p\leq 0.05$  were considered significant.

#### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Extended Experimental Procedures and seven figures and can be found with this article online at http://dx.doi.org/ 10.1016/i.celrep.2013.05.028.

#### LICENSING INFORMATION

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank I. Grandjean, C. Daviaud, and M. Garcia from the Animal Facility, C. Alberti, E. Belloir, and N. Mebirouk from the Transgenesis Platform, M. Richardson and A. Nicolas from the Pathology Service, and Z. Maciorowski from the Cell-Sorting Facility of the Institut Curie. We also thank M. Schertzer for technical advice and G.M. Wahl and M. Debatisse for their support. The

12 Cell Reports 3, 1-13, June 27, 2013 ©2013 The Authors

"Genetics of Tumor Suppression" laboratory received funding from the Fondation de France (Comité Tumeurs), the Ligue Nationale contre le Cancer (Comité IIe de France), the Association pour la Recherche sur le Cancer, and the Institut National du Cancer. The "Telomeres and Cancer" laboratory is an "équipe labellisée" by the Ligue Nationale contre le Cancer. PhD students were supported by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (to I.S. and S.J.), the Cancéropôle IIe de France (to M.F.), and the Ligue Nationale Contre le Cancer (to I.S. and M.F.).

Received: December 20, 2012 Revised: April 1, 2013 Accepted: May 17, 2013 Published: June 13, 2013

#### REFERENCES

Arai, N., Nomura, D., Yokota, K., Wolf, D., Brill, E., Shohat, O., and Rotter, V. (1986). Immunologically distinct p53 molecules generated by alternative splicing. Mol. Cell. Biol. 6, 3232–3239.

Armanios, M., and Blackburn, E.H. (2012). The telomere syndromes. Nat. Rev. Genet. 13, 693–704.

Baerlocher, G.M., Vulto, I., de Jong, G., and Lansdorp, P.M. (2006). Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). Nat. Protoc. 1, 2365–2376.

Ballew, B.J., Yeager, M., Jacobs, K., Giri, N., Boland, J., Burdett, L., Alter, B.P., and Savage, S.A. (2013). Germline mutations of regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, in Dyskeratosis congenita. Hum. Genet. *132*, 473–480.

Blasco, M.A., Lee, H.W., Hande, M.P., Samper, E., Lansdorp, P.M., DePinho, R.A., and Greider, C.W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. Cell *91*, 25–34.

Brady, C.A., and Attardi, L.D. (2010). p53 at a glance. J. Cell Sci. 123, 2527–2532.

Bruins, W., Zwart, E., Attardi, L.D., Iwakuma, T., Hoogervorst, E.M., Beems, R.B., Miranda, B., van Oostrom, C.T., van den Berg, J., van den Aardweg, G.J., et al. (2004). Increased sensitivity to UV radiation in mice with a p53 point mutation at Ser389. Mol. Cell. Biol. 24, 8884–8894.

Ding, H., Schertzer, M., Wu, X., Gertsenstein, M., Selig, S., Kammori, M., Pourvali, R., Poon, S., Vulto, I., Chavez, E., et al. (2004). Regulation of murine telomere length by Rtel: an essential gene encoding a helicase-like protein. Cell 117, 873–886.

Dumble, M., Moore, L., Chambers, S.M., Geiger, H., Van Zant, G., Goodell, M.A., and Donehower, L.A. (2007). The impact of altered p53 dosage on hematopoietic stem cell dynamics during aging. Blood *109*, 1736–1742.

Espinosa, J.M. (2008). Mechanisms of regulatory diversity within the p53 transcriptional network. Oncogene 27, 4013–4023.

Feng, L., Lin, T., Uranishi, H., Gu, W., and Xu, Y. (2005). Functional analysis of the roles of posttranslational modifications at the p53 C terminus in regulating p53 stability and activity. Mol. Cell. Biol. 25, 5389–5395.

Foord, O.S., Bhattacharya, P., Reich, Z., and Rotter, V. (1991). A DNA binding domain is contained in the C-terminus of wild type p53 protein. Nucleic Acids Res. *19*, 5191–5198.

Fujita, K., Horikawa, I., Mondal, A.M., Jenkins, L.M., Appella, E., Vojtesek, B., Bourdon, J.C., Lane, D.P., and Harris, C.C. (2010). Positive feedback between p53 and TRF2 during telomere-damage signalling and cellular senescence. Nat. Cell Biol. *12*, 1205–1212.

Hamard, P.J., Lukin, D.J., and Manfredi, J.J. (2012). p53 basic C terminus regulates p53 functions through DNA binding modulation of subset of target genes. J. Biol. Chem. 287, 22397–22407.

He, H., Wang, Y., Guo, X., Ramchandani, S., Ma, J., Shen, M.F., Garcia, D.A., Deng, Y., Multani, A.S., You, M.J., and Chang, S. (2009). Po11b deletion and telomerase haploinsufficiency in mice initiate an ATR-dependent DNA damage response and elicit phenotypes resembling dyskeratosis congenita. Mol. Cell. Biol. 29, 229–240.



Herrera-Merchan, A., Cerrato, C., Luengo, G., Dominguez, O., Piris, M.A., Serrano, M., and Gonzalez, S. (2010). miR-33-mediated downregulation of p53 controls hematopoietic stem cell self-renewal. Cell Cycle 9, 3277–3285.

Hockemeyer, D., Palm, W., Wang, R.C., Couto, S.S., and de Lange, T. (2008). Engineered telomere degradation models dyskeratosis congenita. Genes Dev. 22, 1773–1785.

Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A., and Lane, D.P. (1992). Regulation of the specific DNA binding function of p53. Cell 71, 875–886.

Kaeser, M.D., and Iggo, R.D. (2002). Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 95–100.

Kim, H., Kim, K., Choi, J., Heo, K., Baek, H.J., Roeder, R.G., and An, W. (2012). p53 requires an intact C-terminal domain for DNA binding and transactivation. J. Mol. Biol. 415, 843–854.

Krummel, K.A., Lee, C.J., Toledo, F., and Wahl, G.M. (2005). The C-terminal lysines fine-tune P53 stress responses in a mouse model but are not required for stability control or transactivation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 10188– 10193.

Lane, D., and Levine, A. (2010). p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2, a000893.

Lang, G.A., Iwakuma, T., Suh, Y.A., Liu, G., Rao, V.A., Parant, J.M., Valentin-Vega, Y.A., Terzian, T., Caldwell, L.C., Strong, L.C., et al. (2004). Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. Cell *119*, 861–872.

Liu, G., Terzian, T., Xiong, S., Van Pelt, C.S., Audiffred, A., Box, N.F., and Lozano, G. (2007). The p53-Mdm2 network in progenitor cell expansion during mouse postnatal development. J. Pathol. *213*, 360–368.

Liu, D., Ou, L., Clemenson, G.D., Jr., Chao, C., Lutske, M.E., Zambetti, G.P., Gage, F.H., and Xu, Y. (2010). Puma is required for p53-induced depletion of adult stem cells. Nat. Cell Biol. 12, 993–998.

Löhr, K., Möritz, C., Contente, A., and Dobbelstein, M. (2003). p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53. J. Biol. Chem. 278, 32507–32516.

Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F., Jr., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z., Tainsky, M.A., et al. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. Science 250, 1233–1238.

McGowan, K.A., Li, J.Z., Park, C.Y., Beaudry, V., Tabor, H.K., Sabnis, A.J., Zhang, W., Fuchs, H., de Angelis, M.H., Myers, R.M., et al. (2008). Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects. Nat. Genet. 40, 963–970.

McKinney, K., Mattia, M., Gottifredi, V., and Prives, C. (2004). p53 linear diffusion along DNA requires its C terminus. Mol. Cell *16*, 413–424.

Mendrysa, S.M., McElwee, M.K., Michalowski, J., O'Leary, K.A., Young, K.M., and Perry, M.E. (2003). mdm2 Is critical for inhibition of p53 during lymphopoiesis and the response to ionizing irradiation. Mol. Cell. Biol. 23, 462–472.

Meyer, K.D., Lin, S.C., Bernecky, C., Gao, Y., and Taatjes, D.J. (2010). p53 activates transcription by directing structural shifts in Mediator. Nat. Struct. Mol. Biol. 17, 753–760.

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., et al. (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. Nature *342*, 705–708.

Olive, K.P., Tuveson, D.A., Ruhe, Z.C., Yin, B., Willis, N.A., Bronson, R.T., Crowley, D., and Jacks, T. (2004). Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. Cell *119*, 847–860.

Ourliac-Garnier, I., and Londoño-Vallejo, A. (2011). Telomere strand-specific length analysis by fluorescent in situ hybridization (Q-CO-FISH). Methods Mol. Biol. 735, 33-46. Parry, E.M., Alder, J.K., Lee, S.S., Phillips, J.A., 3rd, Loyd, J.E., Duggal, P., and Armanios, M. (2011a). Decreased dyskerin levels as a mechanism of telomere shortening in X-linked dyskeratosis congenita. J. Med. Genet. 48, 327–333.

Parry, E.M., Alder, J.K., Qi, X., Chen, J.J., and Armanios, M. (2011b). Syndrome complex of bone marrow failure and pulmonary fibrosis predicts germline defects in telomerase. Blood *117*, 5607–5611.

Pereboom, T.C., van Weele, L.J., Bondt, A., and MacInnes, A.W. (2011). A zebrafish model of dyskeratosis congenita reveals hematopoietic stem cell formation failure resulting from ribosomal protein-mediated p53 stabilization. Blood *118*, 5458–5465.

Poyurovsky, M.V., Katz, C., Laptenko, O., Beckerman, R., Lokshin, M., Ahn, J., Byeon, I.J., Gabizon, R., Mattia, M., Zupnick, A., et al. (2010). The C terminus of p53 binds the N-terminal domain of MDM2. Nat. Struct. Mol. Biol. 17, 982–989.

Prophet, E., Mills, B., Arrington, J., and Sobin, L. (1992). Laboratory Methods in Histotechnology (Washington, DC: AFIP).

Simeonova, I., Lejour, V., Bardot, B., Bouarich-Bourimi, R., Morin, A., Fang, M., Charbonnier, L., and Toledo, F. (2012). Fuzzy tandem repeats containing p53 response elements may define species-specific p53 target genes. PLoS Genet. 8, e1002731.

Srivastava, S., Zou, Z.Q., Pirollo, K., Blattner, W., and Chang, E.H. (1990). Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. Nature *348*, 747–749.

Tafvizi, A., Huang, F., Fersht, A.R., Mirny, L.A., and van Oijen, A.M. (2011). A single-molecule characterization of p53 search on DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 563–568.

Takenaka, I., Morin, F., Seizinger, B.R., and Kley, N. (1995). Regulation of the sequence-specific DNA binding function of p53 by protein kinase C and protein phosphatases. J. Biol. Chem. 270, 5405–5411.

Terzian, T., Wang, Y., Van Pelt, C.S., Box, N.F., Travis, E.L., and Lozano, G. (2007). Haploinsufficiency of Mdm2 and Mdm4 in tumorigenesis and development. Mol. Cell. Biol. *27*, 5479–5485.

Toledo, F., and Wahl, G.M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. Nat. Rev. Cancer 6, 909–923.

Toledo, F., Krummel, K.A., Lee, C.J., Liu, C.W., Rodewald, L.W., Tang, M., and Wahl, G.M. (2006a). A mouse p53 mutant lacking the proline-rich domain rescues Mdm4 deficiency and provides insight into the Mdm2-Mdm4-p53 regulatory network. Cancer Cell 9, 273–285.

Toledo, F., Liu, C.W., Lee, C.J., and Wahl, G.M. (2006b). RMCE-ASAP: a gene targeting method for ES and somatic cells to accelerate phenotype analyses. Nucleic Acids Res. *34*, e92.

Ventura, A., Kirsch, D.G., McLaughlin, M.E., Tuveson, D.A., Grimm, J., Lintault, L., Newman, J., Reczek, E.E., Weissleder, R., and Jacks, T. (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. Nature 445, 661–665.

Vulliamy, T.J., Kirwan, M.J., Beswick, R., Hossain, U., Baqai, C., Ratcliffe, A., Marsh, J., Walne, A., and Dokal, I. (2011). Differences in disease severity but similar telomere lengths in genetic subgroups of patients with telomerase and shelterin mutations. PLoS One 6, e24383.

Walne, A.J., Vulliamy, T., Kirwan, M., Plagnol, V., and Dokal, I. (2013). Constitutional mutations in RTEL1 cause severe dyskeratosis congenita. Am. J. Hum. Genet. 92, 448–453.

Wang, Y.V., Leblanc, M., Fox, N., Mao, J.H., Tinkum, K.L., Krummel, K., Engle, D., Piwnica-Worms, D., Piwnica-Worms, H., Balmain, A., et al. (2011a). Finetuning p53 activity through C-terminal modification significantly contributes to HSC homeostasis and mouse radiosensitivity. Genes Dev. 25, 1426–1438.

Wang, Y., Shen, M.F., and Chang, S. (2011b). Essential roles for Pot1b in HSC self-renewal and survival. Blood 118, 6068–6077.

Zhong, F., Savage, S.A., Shkreli, M., Giri, N., Jessop, L., Myers, T., Chen, R., Alter, B.P., and Artandi, S.E. (2011). Disruption of telomerase trafficking by TCAB1 mutation causes dyskeratosis congenita. Genes Dev. 25, 11–16.

2058 Cell Reports 3, 2046–2058, June 27, 2013 ©2013 The Authors

## **Supplemental Information**



#### EXTENDED EXPERIMENTAL PROCEDURES

#### **Cells and Cell Culture Reagents**

MEFs were isolated from 13.5 day embryos and cultured in a 5% CO<sub>2</sub> and 3% O<sub>2</sub> incubator, in DMEM Glutamax (GIBCO), with 15% FBS (Biowest), 100  $\mu$ M 2-mercaptoethanol (Millipore), 0.01mM Non Essential Amino-Acids and Penicillin/Streptavidine (GIBCO) for  $\leq$  6 passages, except for 3T3 experiments, performed in a 5% CO<sub>2</sub> incubator for 8 passages. Human lung fibroblasts MRC5, and their SV40-transformed derivatives, were cultured in a 5% CO<sub>2</sub> and 3% O<sub>2</sub> regulated incubator in MEM (GIBCO), completed with 10% FBS, 2 mM L-Glutamine (GIBCO), 1mM Pyruvate, 10  $\mu$ M Non Essential Amino-Acids and Penicillin/Streptomycin. Cells were irradiated with a CS  $\gamma$ -irradiator, or treated with adriamycin (Sigma) at 0.5  $\mu$ g/ml, or 10  $\mu$ M Nutlin 3a (Vassilev et al., 2004) (Sigma) for 6-24 hr.

#### **RMCE Cells and Constructs**

*p53*<sup>RMCE/-</sup> MEFs (Toledo et al., 2006b) were cultured in a 5% CO<sub>2</sub> and 3% O<sub>2</sub> incubator, in DMEM Glutamax (GIBCO), with 15% FBS (Biowest), 100mM 2-mercaptoethanol (Millipore), 0.01mM Non Essential Amino-Acids and Penicillin/Streptavidine (GIBCO). PCR mutageneses were performed (primers upon request) on a Scall-Fsel fragment of the *Trp53* gene (encompassing sequences from exon 10 to sequences downstream *Trp53*) subcloned in pBluescript. A Scall-Fsel digestion was used to swap each mutated fragment in a RMCE-ASAP vector with WT *Trp53* sequences (Toledo et al., 2006b). We also used PCR mutagenesis to generate the R270H mutation that prevents DNA binding (Cho et al., 1994), and swapped a BstZI71/BsRGI fragment containing R270H in RMCE-ASAP constructs to combine this mutation with C-terminal mutations. Sequences of exons and LoxP sites were verified for all constructs, then RMCE-ASAP was performed as described (Toledo et al., 2006b).

#### **Quantitative RT-PCR**

Total RNA, extracted using Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel), was reverse transcribed using Superscript III (Invitrogen). Real-time quantitative PCRs (primers available upon request) were performed on an ABI PRISM 7500 using Power SYBR Green (Applied Biosystems). For strain-specific Rtel1 expression analysis, age-matched males of C57BI/6 and 129S2/SvPas pure inbred strains were purchased from Charles River Laboratories, total mRNAs were extracted from their bone marrow cells, and Rtel1 mRNAs were quantified as above.

#### LSL-A31 Construct

We used mouse genomic p53 DNA from previous constructs (Toledo et al., 2006a; 2006b), together with a portion of intron 1 containing a LoxP-Stop-LoxP (LSL) cassette (Ventura et al., 2007), in which the Puromycin-resistance gene was replaced by a Neomycin gene (details available upon request). We used a BsrG I site (in intron 9) and an inserted Fse I site (downstream *Trp53*) to swap the nonsense mutation from the p53<sup>A31</sup> RMCE-ASAP construct (see Supplementary Procedures) in the LSL targeting construct. The resulting LSL-p53<sup>A31</sup> targeting vector was fully sequenced before use.

#### Targeting in ES Cells and Genotyping

CK-35 ES cells (Kress et al., 1998) were electroporated with the targeting construct linearized with Not I. Recombinant clones were identified by long-range PCR, and confirmed by Southern and PCR. Two independent clones were injected into C57BI/6 blastocysts to generate chimeras, and germline transmission was verified by genotyping MEFs from their offspring. RT-PCR of RNAs from  $p53^{LSL-\Delta31/LSL-\Delta31}$  MEFs treated with HTN-Cre showed that the mutant cDNA differed from a  $p53^{WT}$  sequence only by the engineered nonsense mutation. Primers for *Trp53* and *Rtel1* genotyping are available upon request. All experiments were performed according to IACUC regulations.

#### LSL Cassette Excision

Triplicates of 1.8.10<sup>5</sup> p53<sup>LSL-WT/LSL-WT</sup> (Ventura et al., 2007) and p53<sup>LSL-Δ31/LSL-Δ31</sup> MEFs were seeded in wells of a 6-well plate and treated with HTN-Cre (Peitz et al., 2002) (10 μM) for ex vivo excision of the LSL cassette, or 10<sup>5</sup> cells with buffer only. After 24 hr, wells were washed. To minimize the potential stress induced by Cre, cells were frozen when reaching 90% confluence. Cells were then thawed for DNA and RNA extractions, to determine excision efficiency, and p53, Mdm2 and p21 mRNA levels. In vivo LSL excision was performed by breeding p53<sup>+/LSL-Δ31</sup> male mice with PGK-Cre (Lallemand et al., 1998) females.

#### Immunofluorescence

MEFs were cultured on collagen-coated coverslips, exposed to adriamycin and analyzed 24 hr later. Coverslips were stained with the p53 antibody CM-5 (Novocastra) and a secondary Alexa Fluor 488 anti-mouse antibody (Molecular Probes). Images were captured on an epifluorescence microscope using equal exposure times for all images for each fluor.

Cell Reports 3, 2046-2058, June 27, 2013 ©2013 The Authors S1



#### Western Blots

Protein detection by immunoblotting was performed using antibodies raised against p53 (CM-5, Novocastra or FL-393, Santa Cruz), actin (A2066, Sigma), p21 (F5, Santa Cruz), Mdm2 (4B2), Rtel1 (MP1) and Dyskerin (H-300, Santa Cruz). Chemiluminescence revelation was achieved with SuperSignal west dura (Perbio, France). Bands of interest were quantified by using ImageJ, and normalized with actin.

#### **ChIP** Assay

Chromatin Immuno-Precipitation (ChIP) analysis was performed as described (Simeonova et al., 2012). Briefly, MEFs were treated with adriamycin for 24 hr, then proteins from  $10^7$  cells were crosslinked to chromatin with 1% formaldehyde for 10 min at 25°C. p53-DNA complexes were immunoprecipitated from total extracts by using 5  $\mu$ g of an antibody against human Phospho-p53 Ser15 / mouse Phospho-p53 Ser 18 (Cell Signaling Technology) and 15-30  $\mu$ g of sonicated chromatin, or 50  $\mu$ g of a polyclonal antibody against p53 (FL-393) and 300  $\mu$ g of sonicated chromatin. Rabbit IgG (Abcam) was used for control precipitation. Quantitative PCR was performed on ABI PRISM 7500.

#### **Cell-Cycle Assays**

Log phase cells were irradiated at RT with a Cs  $\gamma$ -irradiator at doses of 3 or 12 Gy, incubated for 24 hr, then pulse-labeled for 1 hr with BrdU (10  $\mu$ M), fixed in 70% ethanol, double-stained with FITC anti-BrdU and propidium iodide, and sorted by using a BD FACSort. Data were analyzed using FlowJo.

#### LSL-AAS Targeting

The LSL- $\Delta$ AS construct, with a structure similar to LSL- $\Delta$ 31, contained a LSL cassette confering resistance to puromycin (Ventura et al., 2007). Deletion of the AS exon ( $\Delta$ AS) was performed by insertion of two Spe I restriction sites, digestion and ligation (details on request). A BsrG I site (in intron 9) and an inserted Fse I site (downstream *Trp53*) were used to swap  $\Delta$ AS into the targeting vector. The resulting construct was fully sequenced, linearized with Not I and electroporated into W4/129S6 ES cells (Taconic). LSL excision was performed by breeding p53<sup>+/LSL-AAS</sup> mice with PGK-Cre mice. DNA sequencing confirmed  $\Delta$ AS as the only mutation affecting the *Trp53* locus in p53<sup>+AS/AAS</sup> cells.

#### Anatomopathology

Organs were fixed in formol 4% for 24h, then ethanol 70%, and embedded in paraffin wax. Serial sections were stained with Hematoxylin Eosin or Masson's Trichrome using standard procedures (Prophet et al., 1992).

#### Hemograms

For each tested animal, 100 µl of blood was recovered retro-orbitally in a 10 µl Citrate concentrated solution (S5770 Sigma), and analyzed using a MS9 machine (Melet Schloesing Laboratory).

#### **Hematopoietic Marker Analysis**

Bone marrow cells (BMCs) were flushed from femurs and tibias of age-matched WT and p53<sup>A31/A31</sup> mice, then incubated with FITClabeled antibodies against markers Gr1, B220, Ter119, TCR, CD19, Dx5, CD11b, CD4, and CD8, PE-conjugated anti-Sca1 and APCconjugated anti-CD117, then analyzed using FlowJo.

#### Long-Term Reconstitution Assay

Donor bone marrow mononucleated cells were isolated from WT or p53<sup>A31/A31</sup> littermate mice (Ly5.2) and retro-orbitally injected into lethally irradiated Ly5.1 recipients, 4 hr post 12 Gy irradiation. Six weeks post transplant, reconstitution of donor leukocytes was analyzed by staining blood cells with antibodies against leukocyte cell surface markers CD45.1 (BD PharMingen) and CD45.2 (Bio-legend) and flow cytometry.

#### **Apoptosis Assays**

3-4 weeks old mice were irradiated with a Cs γ-irradiator with 2.9 Gy/min at a dose of 2.5 or 5 Gy. Mice were sacrificed 4h later and thymocytes were recovered, stained with AnnexinV-FITC Apoptosis detection kit (Abcam) and analyzed using FlowJo.

#### **Colony-Forming Unit Assay**

2x10<sup>4</sup> to 4x10<sup>5</sup> BMCs were plated (in duplicates) for colony-forming assay using MethoCult and MegaCult (StemCell Technologies, Inc.) following the manufacturer's instructions. Cells were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> and 20% O<sub>2</sub> for 9 (Megacult) or 12 (Methocult) days, before colonies were identified as CFU-GM (Colony Forming Unit - Granulocyte, Macrophage), CFU-GEMM (Granulocyte, Erythroid, Macrophage, Megakaryocyte), BFU-E (Burst FU– Erythroid) and CFU-Mk (Megakaryocyte).

S2 Cell Reports 3, 2046–2058, June 27, 2013 ©2013 The Authors



#### **Telomeric Flow-FISH**

Flow-FISH was performed as described (Baerlocher et al., 2006). For each animal, the bone marrow from 2 tibias and 2 femurs was collected and passed through a 40  $\mu$ M nylon cell strainer (BD) in PBS. Red blood cells were lysed in 10 ml 0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 17 mM Tris pH7.65, then 25 ml PBS-0.1% BSA were added. 2x10<sup>6</sup> cells were fixed in 500  $\mu$ l PNA hybridization buffer (70% deionized formamide, 20 mM Tris pH7.4, 0.1% Blocking reagent, Roche) and stored at  $-20^{\circ}$ C. Either nothing (control) or 5  $\mu$ l probe stock solution (0.1  $\mu$ M final concentration) were added to cells (probe stock solution: 10  $\mu$ M TelC-FAM PNA probe (Panagene), 70% formamide, 20 mM Tris pH7.4, 0.1% BSA, 0.1% Tween-20 and one in PBS, 0.1% BSA, 0.1% Tween-20, cells were resuspended in PBS 1X, 0.1% BSA, RNase A 1000 U/ml, propidium iodide 12.5  $\mu$ g/ml, and analyzed with a FACSCalibur.

#### **Telomeric Quantitative FISH**

Cells were treated with 0.5 µg/ml colcemide for 1.5 hr, submitted to hypotonic shock, fixed in a (3:1) ethanol/acetic acid solution, and dropped onto glass slides. Q-FISH was then carried out as described (Ourliac-Garnier and Londoño-Vallejo, 2011), with a TelC-Cy3 PNA probe (Panagene). Images were acquired using a Zeiss Axioplan 2, and telomeric signals were quantified with iVision (Chromaphor), using the segmentation tool with a manual correction to include individual telomeres at all metaphasic chromosome ends, and pixel intensity correction for local background intensities.

#### Detection of Telomere-Induced Foci

Cells were incubated 5 min in Solution T (0.5% Triton X-100, 50 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 300 mM sucrose), fixed 15 min in 3% formaldehyde/PBS, permeabilized 10 min with Solution T, then slides were dehydrated and air-dried. Nuclei were hybridized 2 hr at RT in PNA hybridization buffer and 10 nM TelC-Cy3, after a 3 min co-denaturation at 80°C. Slides were washed twice in Solution W1, 3 times in 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, dehydrated and mounted in Vectashield with DAPI (Vector). Images of labeled nuclei were acquired using Nikon eclipse 3D imaging system, subjected to deconvolution, then average projections of 31 Z stacks, 0.2 µm each, were analyzed using Ivision.

#### **Statistical Analyses**

The Student's t test was used in all Figures to analyze differences between two groups of values. In Figure 6B differences between 3 groups were analyzed by one-way ANOVA. In Figure 6F a Log-rank (Mantel-Cox) test was used to analyze Kaplan-Meier survival curves. In Figure S5 a Fischer's exact test for a 2x2 table was used. Analyses were performed by using Graphpad Prism, and values of  $p \leq 0.05$  were considered significant.

#### SUPPLEMENTAL REFERENCES

Bhuvanagiri, M., Schlitter, A.M., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2010). NMD: RNA biology meets human genetic medicine. Biochem. J. 430, 365–377.

Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. Science 265, 346–355.

Kress, C., Vandormael-Pournin, S., Baldacci, P., Cohen-Tannoudji, M., and Babinet, C. (1998). Nonpermissiveness for mouse embryonic stem (ES) cell derivation circumvented by a single backcross to 129/Sv strain: establishment of ES cell lines bearing the Omd conditional lethal mutation. Mamm. Genome 9, 998–1001. Lallemand, Y., Luria, V., Haffner-Krausz, R., and Lonai, P. (1998). Maternally expressed PGK-Cre transgene as a tool for early and uniform activation of the Cre site-specific recombinase. Transgenic Res. 7, 105–112.

Peitz, M., Pfannkuche, K., Rajewsky, K., and Edenhofer, F. (2002). Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 4489–4494.

Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S.V., Hainaut, P., and Olivier, M. (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. Hum. Mutat. 28, 622–629.

Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., et al. (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. Science 303, 844–848.

Cell Reports 3, 2046–2058, June 27, 2013 ©2013 The Authors S3





#### Figure S1. Rationale for the Targeting of a p53 CTD Deletion, Related to Figure 1

(A) Summary of transfection and in vitro studies of human and mouse p53 C-terminal mutants. On top human p53 is shown, with its transactivation (TAD), prolinerich (PRD), specific DNA binding (DBD), tetramerization (40) and C-terminal basic regulatory (CTD) domains. Residues 337-393 are detailed below, with lollipops for post-translational modifications. Truncated mutants analyzed are grouped according to the extent of C-terminal deletion (with number of reported studies in parentheses). Below, C-terminal residues of mouse p53, and studies of murine p53 truncated mutants, are represented similarly.

(B) Genomic structure of the 3' part of Trp53 and C-terminal protein sequences encoded by the targeted constructs. E: exon, i: intron, AS: alternatively spliced exon.

(C) Detailed sequences of the targeted constructs. On top, a portion of the WT Trp53 gene is shown, encompassing exon 10 and part of exon 11. Exonic nucleotides are in black capital letters, splice sites in gray lower cases. The protein sequence is shown above the nucleotide sequence. The two nonsense mutations

(legend continued on next page)

S4 Cell Reports 3, 2046–2058, June 27, 2013 ©2013 The Authors



Cell Reports 3, 2046-2058, June 27, 2013 @2013 The Authors \$5

are below, with highlights on the stop codons and restriction sites introduced. Mutated or inserted nucleotides (compared to the WT sequence) are in red, and deletions are red minus signs.

<sup>(</sup>D) RMCE-ASAP targeting strategy. p53<sup>(RMCE/-)</sup> MEFs (Toledo et al., 2006b) contain a *Trp53* KO allele in which a Neo gene has replaced most of exon 5, and a *Trp53* RMCE allele with a PuroATK (puTK) gene downstream of *Trp53* and inverted heterologous LoxP sites (arrowheads L' and L) flanking p53 coding sequences and puTK. Each RMCE construct, sequenced before use, contained p53 coding sequences (with a stop codon (asterisk) in exon 10 or 11) flanked by inverted heterologous LoxP sites. It was electroporated with a Cre expression plasmid. Importantly, because p53<sup>(RMCE/-)</sup> MEFs are primary cells, proper recombinant clones are recovered only if the targeted mutation encodes a hypomorphic p53 mutant. If a mutation encodes a mutant with as much or more activity than p53<sup>WTC,</sup> it will induce cellular sensecence: ganciclovir-resistant clones recovered in that case arise from cells that have rearranged and lost the p53<sup>MMCE</sup> locus. Ganciclovir-resistant clones were first screened by PCR with primers a and b. We planned to verify potential proper recombinants by PCR with primers c and d and Mae I digestion for Δ26, or primers e and f and digestion with BcI I for Δ31.

<sup>(</sup>c) Results of a first RMC experiment, in which 4 alleles were targeted, encoding the mutants of interest  $p53^{\Delta26}$  and  $p53^{\Delta31}$ , or the controls  $p53^{WT}$  and  $p53^{P270H}$ ,  $p53^{P270H}$  (equivalent to human  $p53^{P273H}$ ), unable to bind DNA (Cho et al., 1994), was used in all RMCE experiments as a positive control for targeting. Left: results summary. Center: typical PCRs with primers a and b. Recombinants (') are revealed by a 429 bp long band. Right: Sequence of the R270H mutation within *Trp53* exon 8. As for the  $p53^{WT}$  construct, no  $p53^{\Delta26}$  or  $p53^{\Delta31}$  proper recombinant clone was recovered, indicating that these mutations do not encode significantly hypomorphic proteins.

<sup>(</sup>F-J) Results of a second RMCE experiment. To be able to measure mRNA levels associated with the nonsense mutations, we generated RMCE constucts that combined each nonsense mutation with the R270H mutation. A screening of picked clones with primers a and b (F) indicated that all were proper recombinants. Top: results summary; bottom: typical PCRs with primers a and b. (G) Recombinant clone confirmation by specific PCR and restriction digest. An example is shown for each mutant (as described in D, DNA was amplified with primers c and d and digested with Mae I, or primers e and f and digested with BcI I). Band sizes (in b) are: 242 or 243 (I). 200 (2), 155 (3), 42 and 45 (4), 134 (5), 109 (6); note the incomplete digestion with Mae I. (H) Recombinant clones were further verified by sequencing. A representative DNA sequence of a p53<sup>R270H,A31</sup> clone is shown. Differences with the WT sequence are highlighted. (I) The targeted nonsense mutations do not lead to p53 mRNA degradation. p53 mRNAs were quantified using real-time PCR and normalized to control mRNA levels, then the mean amount in R270H cells was assigned a value of 1. For each mutant, results are from 3 independent clones. Means + SD are shown. n.s.: not significant by Student's t test. (J) The targeted mutation encoding p53<sup>A26</sup> correlates with increased p53AS mRNA levels. p53AS mRNAs were quantified using AS specific primers in p53<sup>R270H,A37</sup> mutant clones, and plotted as in 1. ""p  $\leq 0.001$  by Student's t test.





#### Figure S2. Evidence of Increased p53 Activity in p53<sup>A31/A31</sup> MEFs, Related to Figure 2

(A) p53<sup>431</sup> is a very efficient transcriptional regulator. RNAs from p53<sup>-/-</sup> (KO), wild-type (WT), and p53<sup>431/A31</sup> (Δ31/Δ31) MEFs untreated, or treated with 10 μM Nutlin for 24 hr, were quantified using real-time PCR. For each gene results were first normalized to control mRNAs levels, then the mean amount of mRNAs in unstressed wild-type cells was assigned a value of 1. Ten p53 target genes were tested: 7 transactivated and 3 repressed by p53. For the 7 transactivated genes, the mean mRNA amounts were higher in mutant cells compared to WT cells, with significant differences in both untreated and Nutlin conditions for 4 genes (Noxa, Fas, p130, Klhl26), or in one condition for the other genes (Puma, Ptprv, Dr5). For the 3 repressed genes (Ccnb1, Cdk1, Cdc25), mRNA amounts were significantly lower in mutant cells compared to WT cells, in both untreated and Nutlin conditions. Results from 3 independent experiments; Mean + SEM are shown; \*\*\*P< 0.001, \*\*P≤0.01, \*

0.001, "P  $\leq$  0.01, "P  $\leq$  0.05, n.s. : not significant by Student's t test. (B) An increased cell cycle arrest response in p53<sup>a31/A31</sup> cells. Cell cycle control was analyzed in p53<sup>-/-</sup> (KO), wild-type (WT), and p53<sup>a31/A31</sup> ( $\Delta$ 31/ $\Delta$ 31) MEFs, in asynchronous cell populations left untreated (Unt) or 24 hr after 3 or 12 Gy  $\gamma$ -irradiation. A typical experiment is shown here, and results from 3 independent experiments are represented in Figure 2J.

S6 Cell Reports 3, 2046-2058, June 27, 2013 ©2013 The Authors





Figure S3. Unlike p53<sup>431/241</sup> Animals, Mice Carrying a Specific Deletion of the *Trp53* AS Exon Are Alive 90 Days after Birth, Related to Figure 3 (A) Comparative maps of the WT and ΔAS *Trp53* alleles. Left, the 3' end of WT *Trp53* gene is shown - black line: intron 10; boxes are for exons, with greytones for translated regions from exon 10 (light gray), exon 11 (dark gray), and exon AS (black). Right, schematic representation of the targeted mutation. The AS exon was deleted and replaced by a Spe I restriction site. The mutant locus only enables the synthesis of proteins with the 'classical' C-terminal domain.

(B) Targeting strategy: The *Trp53* gene is contained in a 17 kb-long EcoRI (RI) fragment (black boxes: coding sequences, white boxes: UTR). The targeting construct (above), the sequence which was verified before use, contains (i) a 1.5 kb-long 5' homology region; (ii) 2.4 kb upstream of coding sequences, a LSL cassette; (iii) all p53 coding exons, except the AS exon replaced by a Spe I restriction site; (iv) a 2 kb-long homology region from intron 10 to sequences downstream of the gene; and (v) the diphteria *x*-toxin (DTA) gene. Targeted recombinants resulting from the depicted crossing-overs were identified by a 2.4 kb-long bands of 2.1 and 0.5 kb after PCR with primers p and q and Spe I digestion. Targeted clones were also analyzed by Southern blot with the indicated probe as containing a 10.5 kb EcoRI band. The targeted mutation was routinely genotyped by PCR with primers r and s. (C-E) Screening of recombinant ES cell clones. ES clones were screened by 5' long-range PCR with primers n and o (C), by 3' long-range PCR with primers p and q.DCPC area clones were also analyzed by the southern blot with the indicated *p* to the dipeted *p* (b) and the PC (b) is defined a quite q and Spe I dipeted *p*.

(F) Mice genotyping by PCR with primers r and s. (G) Survival of p53<sup>ΔAS/ΔAS</sup> mice over 90 days. Number in parentheses indicates the size of the cohort. p53<sup>ΔAS/ΔAS</sup> mice did not exhibit the phenotypic traits observed in p53<sup>ΔAS/ΔAS</sup> mice, including premature death.

Cell Reports 3, 2046-2058, June 27, 2013 ©2013 The Authors S7





(legend on next page)

S8 Cell Reports 3, 2046–2058, June 27, 2013 ©2013 The Authors



Figure S4. Increased p53 Activity and Aplastic Anemia in p53<sup>A31/A31</sup> Mice, Related to Figure 3

(A) Hematoxylin and eosin (H&E) staining of the skin of hindlimbs from WT and mutant littermates. An increased number of melanocytes is visible within the basal layer in the mutant mouse (arrow).

(B) Increased apoptosis in mutant thymocytes. Age-matched mice of the indicated genotypes were left untreated or submitted to 2.5 or 5 Gy whole-body  $\gamma$ -(b) increased apoptosis in mutant trymocytes. Age-matched mice of the indicated genotypes were leit untreated or submitted to 2.5 or 5 Gy Whole-body Y-irradiation. After 4 hr, thymocytes were recovered and stained with annexin V-FITC, then analyzed by FACS. Typical results are shown, with % apoptotic cells indicated above each histogram. Increased apoptosis was detected in all p53<sup>A31/A31</sup> mutants, and significant apoptosis was observed in unirradiated thymocytes from the smaller p53<sup>A31/A31</sup> mice (e.g., on the far right, with 72.6% apoptosis).
(C) Whole brains from WT and mutant mice. In the mutant, the mesencephalum (2) is more prominent, due to an hypoplasia of the cortex (1) and cerebellum (3).

(D) Hypogonadism and arrested gametogenesis in most mutant males. On top, testes from two P23 littermates; below, the H&E staining of the testes reveals

(b) Hypogonalism and arrested gametogenesis in most mutant males. On top, testes from two P23 intermates; below, the RAE staining or the testes reveals arrested gametogenesis in the mutant. (E and F) Bone marrows from p53<sup>341/A31</sup> mice lack hematopoietic stem/progenitor cells. (E) Bone marrow (BM) cells from p53<sup>341/A31</sup> mice lack hematopoietic stem/progenitor cells. (E) Bone marrow (BM) cells from p53<sup>341/A31</sup> mice lack hematopoietic stem/progenitor cells. (E) Bone marrows (BM) cells from p53<sup>44</sup> and p53<sup>431/A31</sup> P27-28 mice were plated and grown in Methocult or Megacult media, then colonies of hematopoietic progenitors CFU-GM, CFU-GEMM, BFU-E or CFU-Mk were counted (see Extended Experimental Procedures). On top, a typical result after 12 days of growth in Methocult medium is shown: the CFU-GM, CFU-GEMM, and BFU-E colonies were observed in plates starting from 2x10<sup>4</sup> or 2x10<sup>5</sup> WT BM cells, whereas no colony was visible from 2x10<sup>5</sup> p53<sup>b31/b31</sup> BM cells. Below, data from 3 experiments are plotted. Mean + SEM are shown. (F) Bone marrow cells, stained with antibodies against hematopoietic lineage (Lin) markers and cell surface marks Sca1 and c-Kit, were analyzed by flow cytometry. The population of Lin- Sca1+ c-Kit+ (LSK) cells, enriched in hematopoietic stem cells, were calculated in % of total mononucleated cells (MNCs). A FACS example for each genotype is shown here, with results from 3 mice per genotype summarized in Figure 3H.

Cell Reports 3, 2046-2058, June 27, 2013 @2013 The Authors \$9





Figure S5.  $p53^{331/\Delta31}$  MEFs Have Dysfunctional Telomeres, Related to Figure 4 MEFs, prepared from one WT and two (A and B)  $p53^{331/\Delta31}$  littermate embryos, were stained at passage 5 with anti- $\gamma$ H2AX antibody (green) and a telomere C-rich PNA probe (red). On top, representative average projections of deconvolved 3D stacks are shown, with enlarged images of defined regions (yellow squares) shown on the right. Below, the quantification of at least 100 nuclei for the presence of telomere dysfunction-induced foci (TIFs) defined by the colocalization of  $\gamma$ H2AX with telomeres is represented. Fisher's exact test for a 2x2 table (\*\*p < 0.001).

S10 Cell Reports 3, 2046–2058, June 27, 2013 ©2013 The Authors





Figure S6. Bone Marrow Cells from p53<sup>+/ $\Delta$ 31</sup> Mdm4<sup>+/-</sup> Mice Lack Hematopoietic Progenitors, Related to Figure 5 Bone marrow cells from WT, p53<sup>+/ $\Delta$ 31</sup> (+/ $\Delta$ 31) and p53<sup>+/ $\Delta$ 31</sup> Mdm4<sup>+/-</sup> (+/ $\Delta$ 31 M4+/-) P29 mice were grown in the Methocult and Megacult media, as in Figure S4E. Data from 3 experiments. Mean + SEM are shown. Asterisks indicate significant differences between p53<sup>+/ $\Delta$ 31</sup> and WT bone marrow cells, <sup>++</sup>P  $\leq$  0.001, <sup>+</sup>P  $\leq$  0.05 by Student's t test.

Cell Reports 3, 2046–2058, June 27, 2013 ©2013 The Authors S11





Figure S7. Impact of Nonsense Mutations in the Exon 10 of the Mouse and Human p53 Genes, Related to Figure 6 (A–G) Targeting mutations encoding  $p53^{A36}$ ,  $p53^{A45}$  or  $p53^{A52}$  in  $p53^{RMCE/3}$  MEFs. (A) On top, a portion of the WT Tp53 gene is shown, represented as in Figure S1C. The 3 nonsense mutations are represented similarly below, with highlights on stop codons and introduced restriction sites. Nucleotides which are mutated or inserted are in red, and deletions are red minus signs. (B) The strategy for targeting in MEFs and screening the mutations is the same as the one used to target the mutation encoding  $p53^{A31}$  (for more details, see Figure S1D). The KO and exchanged alleles are shown. Ganciclovir-resistant clones were first screened

(legend continued on next page)

S12 Cell Reports 3, 2046–2058, June 27, 2013 @2013 The Authors



Cell Reports 3, 2046–2058, June 27, 2013 ©2013 The Authors S13

by PCR with primers a and b, then verified by PCR with primers e and f and digestion with BgIII for  $\Delta 36$ , BamHI for  $\Delta 45$ , or Xba I for  $\Delta 52$ . (C) Results of a first RMCE experiment, in which the alleles encoding p53<sup>358</sup>, p53<sup>348</sup> and p53<sup>452</sup> were targeted - together with control alleles encoding p53<sup>WT</sup> and p53<sup>857</sup> (not shown). Proper recombinants were identified with primers a and b for mutations encoding p53<sup>456</sup> and p53<sup>458</sup>, suggesting that these proteins are hypomorphic. On top, results are summarized in a table; below, typical PCRs with primers a and b are shown. Recombinants (°) are revealed by a 429 bp long band. (D) Deficient cell cycle control in MEFs expressing p53<sup>345</sup> or p53<sup>3457</sup>. Cell cycle control was analyzed in parental p53<sup>8MCE/-</sup> MEFs, and RMCE-derived p53<sup>3457-</sup> and p53<sup>3527-</sup> MEFs, in asynchronous cell populations left untreated or 24 hr after 12 Gy  $\gamma$ -irradiation. A typical experiment is shown. Compared to parental cells, p53<sup>3457-</sup> and p53<sup>3527-</sup> MEFs exhibit respectively very little, or no capacity to arrest cells in G1 after irradiation. (E) Results of a second RMCE experiment. To recover targeted recombinants (°), 144 (3), 96 (4), 175 (5) and 66 (6). The clones were also confirmed by sequencing (not shown). (G) Mutations encoding p53<sup>345</sup> or p53<sup>3457</sup> lead to decreased p53 mRNA levels. p53 mRNAs were quantified using real-time PCR and normalized to control mRNAs, then the amount in R270H cells was assigned a value of 1. For each mutatin results are from 3 independent clones, each quantified in triplicate. Mean + SD are shown; "P ≤ 0.01, "P ≤ 0.05, n.s. : not significant by Student's test.

<sup>(</sup>H) Properties of murine p53 C-ter mutants and distribution of *TP53* C-ter nonsense mutations in human cancers. On top, a summary of the information gained from targeted nonsense mutations affecting the murine *Trp53* exon 10 (all these mutations remove the entire p53 C-terminal domain). Arrows designate the positions of targeted mutations. Mutations associated with observable decreases in p53 activity are in red, the others in blue. Dotted line indicates the theoretical limit of premature termination codon (PTC) detection by the Nonsense-Mediated mRNA Decay system, 50 nt upstream of the last exon-exon junction (Bhuvanagiri et al., 2010). Results suggest that mutations in the murine *Trp53* gene follow the PTC detection rule. 4D: tetramerization domain. Below, nonsense mutations in the human *TP53* exon 10 and their observation (or lack thereof) in cancers, according to the 16th release (November 2012) of the IARC *TP53* mutation database (Petitjean et al., 2007). Arrows indicate residues whose codons can be mutated into Stops by a single point mutation. Nonsense mutations observed in human cancers are in red, the others in Iblue. It is unlikely that the observed distribution of human p53 mutations is due to random chance (P8/8, 0/3) = 0.006). Rather, the observed distribution single thave similar consequences in humans and mice.

## Article n°4

## p53 downregulates the Fanconi anemia DNA repair pathway

Sara Jaber\*, Eléonore Toufektchan\*, Vincent Lejour, Boris Bardot and Franck Toledo.

#### Nature Communications (2016) 7 : 11091.

#### Résumé :

Suite à notre découverte que p53 régule le métabolisme des télomères, nous avons voulu élargir cette étude à d'autres gènes impliqués dans le métabolisme télomérique. Nous avons donc testé 42 gènes candidats en comparant des cellules p53<sup>-/-</sup>, p53<sup>+/+</sup> et p53<sup>Δ31/Δ31</sup>et démontré que p53 régule négativement 7 gènes supplémentaires impliqués dans le métabolisme télomérique, confirmant ainsi le rôle majeur de p53 dans la régulation des télomères. Un de ces gènes est muté dans l'anémie de Fanconi, qui fait aussi partie de la famille des syndromes d'insuffisance médullaire. En se focalisant plus spécifiquementsur la voie Fanconi de réparation de l'ADN, nous avons pu montrer que p53 régule négativement un grand nombre des gènes de cette voie, et que l'hyperactivation de p53 entraîne des phénotypes similaires à ceux des cellules de patients souffrant de l'anémie de Fanconi (défaut de réparation de l'ADN, accumulation des aberrations chromosomiques, hypersensibilité à des agents alkylants).

Ce second projet nous a permis de découvrir de nouvelles facettes de ce « gardien du génome ». En effet il est bien établi que p53 joue un rôle primordial dans le maintien de l'intégrité génomique de la cellule, en réponse à divers stress dont l'érosion des télomères et les dommages à l'ADN. De façon surprenante, nos résultats montrent qu'une activation constante de p53 pourrait finalement entraîner des défauts de réparation de l'ADN et un raccourcissement télomérique, formant ainsi une boucle positivede rétro-contrôle.Une autre portée de nos découvertes est que p53 pourrait expliquer certaines des similitudes cliniques (aplasie médullaire, petite taille, pigmentation anormale et hypoplasie testiculaire) qui existent entre ces deux syndromes d'insuffisance médullaire et comment ces deux maladies (dyskératose Congénitale et anémie de Fanconi) peuvent être confondues au diagnostic. Nous avons également confirmé ces observations dans les cellules humaines et les avons corrélées

au statut de p53 dans les cellules tumorales humaines. Ce projet s'inscrit donc également dans le cadre de la recherche fondamentale sur le cancer, d'autant plus que ces deux maladies d'insuffisance médullaire (dyskératose congénitale et anémie de Fanconi) sont des syndromes prédisposant au cancer. De plus, nous avons pu montrer que la combinaison d'agents qui créent des ponts inter-brinsavec des molécules activatrices de p53, pourrait constituer une stratégie anti-tumorale pour tuer plus efficacement les cellules cancéreuses exprimant une p53 sauvage, suggérant ainsi une application thérapeutique potentielle de nos recherches.



#### ARTICLE

Received 9 Oct 2015 | Accepted 19 Feb 2016 | Published 1 Apr 2016

DOI: 10.1038/ncomms11091

091 OPEN

# p53 downregulates the Fanconi anaemia DNA repair pathway

Sara Jaber<sup>1,2,3,4,\*</sup>, Eléonore Toufektchan<sup>1,2,3,4,\*</sup>, Vincent Lejour<sup>1,2,3,4</sup>, Boris Bardot<sup>1,2,3,4</sup> & Franck Toledo<sup>1,2,3,4</sup>

Germline mutations affecting telomere maintenance or DNA repair may, respectively, cause dyskeratosis congenita or Fanconi anaemia, two clinically related bone marrow failure syndromes. Mice expressing  $p53^{A31}$ , a mutant p53 lacking the C terminus, model dyskeratosis congenita. Accordingly, the increased p53 activity in  $p53^{A31/A31}$  fibroblasts correlated with a decreased expression of 4 genes implicated in telomere syndromes. Here we show that these cells exhibit decreased mRNA levels for additional genes contributing to telomere metabolism, but also, surprisingly, for 12 genes mutated in Fanconi anaemia. Furthermore,  $p53^{A31/A31}$  fibroblasts exhibit a reduced capacity to repair DNA interstrand crosslinks, a typical feature of Fanconi anaemia cells. Importantly, the p53-dependent downregulation of *Fanc* genes is largely conserved in human cells. Defective DNA repair is known to activate p53, but our results indicate that, conversely, an increased p53 activity may attenuate the Fanconi anaemia DNA repair pathway, defining a positive regulatory feedback loop.

<sup>1</sup>Genetics of Tumour Suppression, Equipe Labellisée Ligue, Institut Curie, Centre de recherche, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France. <sup>2</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Paris, France. <sup>3</sup> CNRS UMR 3244, Paris, France. <sup>4</sup> PSL Research University, Paris, France. \* These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.T. (email: franck.toledo@curie.fr).

NATURE COMMUNICATIONS | 7:11091 | DOI: 10.1038/ncomms11091 | www.nature.com/naturecommunications

nherited bone marrow failure syndromes are a set of clinically related yet heterogeneous disorders in which at least one haematopoietic cell lineage is significantly reduced. Among them, Fanconi anaemia (FA) and dyskeratosis congenita (DC) are caused by germline mutations in key cellular processes, that is, DNA repair and telomere maintenance, respectively<sup>1</sup>.

We recently found that  $p53^{d31/d31}$  mice, expressing a mutant p53 lacking its C-terminal domain, die rapidly after birth with a complete set of features of the telomere syndrome DC, including aplastic anaemia, pulmonary fibrosis, oral leukoplakia, skin hyperpigmentation, nail dystrophy and short telomeres<sup>2</sup>. Loss of the p53 C terminus increases p53 activity in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and in most tested tissues<sup>2,3</sup>, and  $p53^{d31/d31}$  MEFs exhibited decreased messenger RNA (mRNA) levels for 4 out of 10 genes implicated in telomere syndromes (*Dkc1*, *Rtel1*, *Tinf2* and *Terf1*). Nutlin, a drug that prevents the Mdm2 ubiquitin ligase from interacting with p53, allowed to confirm that p53 activation leads to the downregulation of these four genes. These data revealed that p53 plays a major role in telomere metabolism.

We previously focused on the potential p53-mediated regulation of genes mutated in DC (Dkc1, Rtel1 and Tinf2) or implicated in aplastic anaemia, a milder form of telomere syndrome (Terf1)<sup>4</sup>. As a striking evidence for the clinical relevance of our mouse model, patients with severe DC who carry mutations affecting PARN, a negative regulator of p53, were recently shown to exhibit decreased DKC1, RTEL1 and TERF1 mRNA levels<sup>5</sup>. Importantly, however, tens of proteins are thought to be involved in the regulation of telomeres (reviewed in ref. 6). Thus, it remained possible that the impact of p53 on telomere-related genes was underestimated in our previous study. Here we tested whether p53 affects the expression of 42 additional genes implicated in telomere metabolism, and found 7 genes that are downregulated in  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  cells. Importantly, some of these p53-regulated genes are involved in the FA DNA repair pathway. This was particularly intriguing because Rtel1, one of the four telomere-related genes we previously found regulated by p53, encodes a Fancj-like helicase<sup>7</sup>. These observations led us to evaluate whether p53 regulates more genes belonging to the FA pathway, and whether  $p53^{A31/A31}$  cells exhibit characteristic features of FA cells. We found that murine p53 downregulates 12 Fanc genes, that human p53 downregulates 9 FANC genes and that the capacity to repair DNA interstrand crosslinks is attenuated upon p53 activation. These data reveal an unexpected role for p53 in downregulating the FA DNA repair pathway, which may help to understand the pathological processes implicated in FA, and suggest therapeutic strategies against tumour cells that retain a functional p53 pathway.

#### Results

**Expression of telomere-related genes in**  $p53^{A31/A31}$  cells. Our initial aim was to test whether, besides the four genes previously identified<sup>2</sup>, p53 could regulate other genes that might contribute to the telomere phenotype of  $p53^{A31/A31}$  mice. We therefore compared, in unstressed  $p53^{-/-}$ , wild-type (WT) and  $p53^{A31/A31}$  fibroblasts, mRNA levels for 42 candidate genes reported to be relevant to telomere metabolism. Candidates included genes implicated in telomere syndromes (*Acd/Tpp1, Apollo/Snm1b, C16orf57/Mpn1/Usb1, Naf1, Obfc1/Stn1, Parn* and *Sbds*)<sup>5,6,8–10</sup>; genes mutated in diseases not primarily associated with telomere biology but for which telomere dysfunction or DC-like features were reported (*Dnmt3b, Fancd2* and *Recql4*)<sup>6</sup>; genes encoding proteins of complexes involved in telomere biology, that is, the telomeras (*Gar1/Nola1, Ruvbl1* and *Ruvbl2*), shelterin (*Pot1a* and *Pot1b, Rap1/Terf2ip*, and *Terf2*), CST (*Ten1*)

and CIA (*Ciao1*, *Iop1/Narfl*, *Mip18* and *Mms19*) complexes, as well as Cajal bodies (*Coilin* and *Hot1*)<sup>6,11</sup>, or proteins otherwise proposed to participate in telomere replication or maintenance (*Artemis/Snm1c*, *Blm*, *Csb/Ercc6*, *Dek*, *Dna2*, *Ercc3/Xpb*, *Ercc4/Fancq/Xpf*, *Fancc*, *Fen1*, *Lmna/Progerin*, *Nbs1*, *Pim1*, *Slx4/Fancp*, *Timeless*, *Tnks1*, *Tnks1bp1*, *Upf1* and *Wrn*)<sup>6,12–26</sup>.

For a gene to be a good candidate, we considered that the mean (from three to four independent experiments) of its mRNA levels in unstressed WT cells should fall between the means measured in  $p53^{-1/-}$  and  $p53^{A31/A31}$  cells; and that the means for the three genotypes should be statistically different according to an analysis of variance. Out of the 42 genes, 7 fulfilled these criteria: *Blm, Dek, Fancd2, Fen1, Gar1, Recql4* and *Timeless* (Fig. 1a; Supplementary Fig. 1). Because *RECQL4* was shown to be downregulated by p53 in human cells<sup>27</sup>, the lower Recql4 mRNAs in  $p53^{A31/A31}$  cells were not surprising. The decreased mRNA levels for the six other genes were not anticipated however. To specifically assay for a p53-dependent regulation, we next compared the effects of Nutlin, a drug that activates p53 by preventing its interaction with the ubiquitin ligase Mdm2. Results clearly indicated that p53 activation leads to the downregulation of these genes (Fig. 1b).

Importantly, the finding that p53 downregulates Gar1, which encodes a component of the telomerase complex, strengthened our previous conclusion that p53 plays a significant role in telomere biology. However, Fancd2 appeared as the gene whose expression was most markedly affected by p53 activation (Fig. 1b). This was surprising because, even if primary cells from patients with a FANCD2 mutation may exhibit telomere dysfunction<sup>28</sup>, these patients are diagnosed with FA, a syndrome primarily characterized by defects in DNA repair. This led us to further analyse the p53-dependent regulation of Fancd2. We first verified that the relative decrease in Fancd2 mRNA levels were observed in vivo, in bone marrow cells (BMCs) from p53<sup>431/431</sup> mice (Fig. 1c). We next tested whether the p53-dependent regulation of Fancd2 detected by quantitative PCR had an impact on Fancd2 protein levels. Lower Fancd2 protein levels were observed in unstressed  $p53^{431/431}$  cells compared with unstressed  $p53^{-/-}$  or WT cells, and Nutlin treatment led to a decrease in Fancd2 proteins only in WT and p53<sup>431/431</sup> MEFs, in complete agreement with quantitative PCR data (Fig. 1d; Supplementary Fig. 2).

p53 activation leads to increased E2F4 binding at Fancd2. The p53-mediated downregulation of many genes requires the cdk inhibitor p21, and occurs through the recruitment, upon p53 activation, of E2F4 repressive complexes at their promoters<sup>29,30</sup>. Notably, this mechanism would account for the p53-dependent regulation of cell cycle genes whose promoters contain CDE/CHR regulatory motifs<sup>31–33</sup>. Consistent with this mechanism, p53 activation had no effect on Fancd2 mRNA levels in  $p21^{-/-}$ cells (Fig. 2a), and chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments with an antibody against E2F4 indicated increased E2F4 binding at the Fancd2 promoter in Nutlin-treated WT cells, compared with unstressed WT or Nutlin-treated p53-/- cells (Fig. 2b; Supplementary Fig. 3). Of note, ChIP assays for E2F4 binding at the *Fancd2* promoter could not be performed in  $p53^{A31/A31}$  MEFs because their accelerated senescence<sup>2</sup> prevented the recovery of sufficient amounts of chromatin, but it is likely that the p53/p21/E2F4 pathway operates similarly in  $p53^{431/431}$ cells. We next identified a candidate CDE/CHR motif in the Fancd2 promoter, and mutation of the CDE element (typically bound by E2F4) abolished the Nutlin-dependent repression of this promoter in NIH-3T3 cells (Fig. 2c), independently of cell cycle dynamics (Supplementary Fig. 4). Thus, although the



**Figure 1 | p53 activation leads to the downregulation of seven telomere-related genes. (a)** A comparison of  $p53^{-/-}$ , wild-type and  $p53^{43l/43l}$  cells suggests the p53-dependent regulation of *Blm, Dek, Fancd2, Fen1, Gar1, Recql4* and *Timeless.* RNAs, prepared from unstressed  $p53^{-/-}$  (KO), wild-type (WT) and  $p53^{43l/43l}$  ( $\Delta$ 31) MEFs, were used to compare the expression of 42 genes with a proposed impact on telomere metabolism. mRNAs were quantified using real-time PCR, normalized to control mRNAs, then the amount in WT cells was assigned a value of 1. Shown here are the seven genes for which the mean mRNA levels were intermediate in WT cells compared with  $p53^{-/-}$  and  $p53^{43l/43l}$  cells, with significant differences between the means according to one-way analysis of variance (ANOVA). For the 35 genes that did not match these criteria, see Supplementary Fig. 1. Results from  $\geq$ 3 independent experiments. (b) The seven genes are downregulated upon p53 activation. mRNAs were quantified in  $p53^{-/-}$ , WT and  $p53^{43l/43l}$  MEFs, untreated or treated with 10µM Nutlin for 24 h. Results from  $\geq$ 3 independent experiments.  $^{\circ}P = 0.059$ . (c) Fancd2 mRNAs are decreased in the one marrow cells (BMCs) of  $p53^{43l/43l}$  mice. Fancd2 mRNAs were quantified from the BMCs of nine WT and six  $p53^{43l/43l}$  mice. (d) p53 activation leads to decreased Fancd2 protein levels. Protein extracts, prepared from untreated or Nutlin-treated MEFs, were immunoblotted with antibodies against Fancd2 and actin. On the left, a typical western blot is shown; on the right, bands from two western blots were quantified and the amount of Fancd2 in unstressed WT cells was assigned a value of 1. In all figures, means + s.e.m. are shown; \*\*\*P  $\leq 0.001$ , \*\*P  $\leq 0.05$ , NS, not significant by analysis of variance or Student's t-tests.

expression of *Fancd2* is known to vary during the cell cycle<sup>34</sup>, the differences in Fancd2 mRNA levels observed between WT and  $p53^{A31/A31}$  MEFs would not simply result from differences in G1/S ratios<sup>2</sup>. Rather, our results indicate that p53 activation promotes the recruitment of E2F4 at the *Fancd2* gene, and that E2F4 plays a major role in the repression of *Fancd2*.

In the experiments above, p53 activation resulted from a treatment with Nutlin, a molecule that acts as a specific Mdm2 inhibitor. We next tested whether similar results could be obtained in response to DNA damage, by evaluating the effects of doxorubicin, a clastogenic anticancer agent. Doxorubicin treatment led to decreased Fancd2 mRNA and protein levels in WT and  $p53^{431/431}$  cells, but not  $p53^{-/-}$  MEFs (Supplementary Fig. 5a,b). Furthermore, we observed increased E2F4 binding at the *Fancd2* promoter in doxorubicin-treated WT cells, compared with unstressed WT or doxorubicin-treated  $p53^{-/-}$  cells (Supplementary Fig. 5c). Thus, both Nutlin and doxorubicin lead to p53 activation and consecutive *Fancd2* downregulation.

Interestingly, the *Blm* and *Fen1* genes, also downregulated by p53 (Fig. 1b), respectively, encode an helicase that associates with Fanc proteins in a multienzyme complex<sup>35</sup>, and an endonuclease stimulated by a Fanc protein<sup>36</sup>. Furthermore, *Rtel1*, one of the four telomere-related genes we previously found regulated by p53 (ref. 2), encodes a Fancj-like helicase<sup>7</sup>. This led us to further evaluate the impact of p53 activation on the FA DNA repair pathway.

**p53 downregulates many** *Fanc* genes. Because the expression levels of four FA genes had been tested in our previous experiments—*Fancc, Fancd2, Fancp/Slx4* and *Fancq/Ercc4* (Fig. 1; Supplementary Fig. 1), we next compared, in unstressed  $p53^{-/-}$ , WT and  $p53^{d31/d31}$  cells, mRNA levels for the 15 remaining FA genes. Strikingly, 11 were less expressed in  $p53^{d31/d31}$  cells (Fig. 3a). Again, Nutlin was used to confirm the p53-mediated downregulation of these genes (Fig. 3b). As for

NATURE COMMUNICATIONS | 7:11091 | DOI: 10.1038/ncomms11091 | www.nature.com/naturecommunications



Figure 2 | p53 activation promotes the binding of transcriptional repressor E2F4 at the Fancd2 gene. (a) p21 is required for the downregulation of Fancd2. mRNAs from untreated or Nutlin-treated p21-/- MEFs were quantified. Results from three independent experiments. (b) Increased E2F4 binding at the Fancd2 promoter upon p53 activation. A map surrounding the Fancd2 transcription start site (TSS) is shown on the left (white box: UTR (Ex1: exon 1); lollipops: putative E2F4binding sites according to ref. 70 (Supplementary Fig. 3); arrows: ChIP PCR primers), and ChIP data on the right. ChIP assay for E2F4 binding was performed in Nutlin-treated p53<sup>-/-</sup> MEFs, and untreated or Nutlin-treated WT MEFs, with an antibody against E2F4 or rabbit IgG as a negative control. Immunoprecipitates were quantified using real-time PCR, fold enrichment was normalized to data over an irrelevant region, then E2F4 binding at Fancd2 in untreated WT cells was given a value of 1. Data from two independent ChIP experiments, each quantified in triplicates. (c) The p53-dependent regulation of Fancd2 occurs via a CDE/CHR motif CDE/CHR motifs are required for gene repression by an E2F4-containing DREAM complex<sup>32</sup>. These motifs consist of a 6-bp long GC-rich CDE site (bound by E2F4) located 4-bp upstream of a 6-bp long AT-rich CHR site. On top, CDE/CHR motifs regulating the expression of five mouse genes are presented, as well as a putative CDE/CHR motif 23-38-bp downstream of the mouse Fancd2 TSS, and its mutated counterpart (with mutations in the CDE). Below, a 2-kb fragment centred around the Fancd2 TSS, containing a WT or mutant CDE/CHR, was cloned upstream a Luciferase gene and transfected into NIH-3T3 cells, treated or not with Nutlin, then Luciferase activity was measured after 24 h. Although the cell cycle kinetics of cells transfected with either plasmid were identical (Supplementary Fig. 4), Nutlin led to decreased luciferase activity only with the construct containing a WT CDE/CHR motif. Mutation of the putative CDE site increased Luciferase basal expression, and abrogated the effect of Nutlin. Results from three independent experiments. In all figures, means + s.e.m. are shown; \*\*\* $P \le 0.001$ , \* $P \le 0.05$ , NS, not significant by Student's t-test.

Fancd2, this p53-mediated downregulation required p21 (Supplementary Fig. 6), and p53 activation correlated with an increased binding of E2F4 near the transcription start site of each of these Fanc genes (Fig. 3c). We next used the sequence of six functional CDE/CHRs to define a positional frequency matrix, which was then used to search in silico for candidate CDE/CHRs near the E2F4-binding sites identified in ChIP assays. Using this approach, candidate CDE/CHR motifs were identified for 9 out of the 11 tested Fanc genes, with the best candidate motifs for Fanci and Fancr (Fig. 4a; Supplementary Fig. 7). These data led us to further analyse the p53-mediated regulation of Fanci and Fancr. We first verified that the relative decreases in Fanci and Fancr mRNA levels were observed in vivo, in BMCs from  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  mice (Supplementary Fig. 8). We then found that p53 activation leads to decreased Fanci and Fancr protein levels ex vivo (Fig. 4b; Supplementary Fig. 9). Luciferase assays next showed that mutating the CDE site in each candidate CDE/CHR abolished the Nutlin-dependent repression of the Fanci and Fancr promoters (Fig. 4a,c).

We also observed that a 24-h long treatment with doxorubicin led to decreased Fanci and Fancr mRNA, and protein levels in WT and  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  cells, but not  $p53^{-/-}$  MEFs (Supplementary Fig. 10a). Furthermore, the nine other Fanc genes downregulated by p53 on Nutlin treatment were also downregulated in a p53-dependent manner on treatment with doxorubicin (Supplementary Fig. 10b). We then searched for confirmation of our results by analysing the data recently reported by Younger et al., who performed a genomic analysis that integrated transcriptome-wide expression levels, genome-wide p53-binding profiles and chromatin state maps to characterize the regulatory role of p53 in response to DNA damage37. Although this approach was designed to identify direct p53 targets, we reasoned that genes regulated by p53 indirectly, via p21/E2F4, might also be detected in their transcriptome-wide expression data. These experiments were performed on  $p53^{-/-}$  and WT MEFs, treated or not with doxorubicin for 6 h (ref. 37), and our previous time-course experiments with Nutlin suggested that 6 h might be sufficient to observe a partial p53-mediated trancriptional downregulation<sup>2</sup>. Thus, we extracted the data of Younger et al. (Gene Expression Omnibus # GSE55727) to analyse the expression of the 12 Fanc genes that we had found downregulated by p53. In agreement with our results, this analysis showed that doxorubicin led to an overall decrease in the expression of Fanc genes in WT, but not p53-1-MEFs (Supplementary Fig. 11).

Transcriptome data mining was also used to find whether the downregulation of *Fanc* genes could correlate with p53 activation in haematopoietic cells. The Homeobox (Hox) transcription factors are important regulators of normal and malignant haematopoiesis, because they control proliferation, differentiation and self-renewal of haematopoietic cells. We analysed the data of Muntean *et al.* (Gene Expression Omnibus # GSE21299), who immortalized murine BMCs by transduction with Hoxa9-ER cells in the presence of tamoxifen (4-OHT), and observed that they undergo myeloid differentiation 5 days after 4-OHT withdrawal<sup>38</sup>. We found this differentiation to correlate with an induction of genes known to be transactivated by p53 (*Cdkn1A/p21, Mdm2* and *Fas*), and with the downregulation of *Fanc* genes (Supplementary Fig. 12).

In sum, we found that 12 genes of the FA DNA repair pathway are downregulated by p53 via a p21/E2F4 pathway, and identified CDE/CHR motifs that are crucial for this regulation for three of these genes. Importantly, the genes are downregulated by p53 in response to Mdm2 inhibition or DNA damage, or on haematopoietic cell differentiation, and encode proteins involved in all parts of the FA DNA repair pathway, that is, proteins that

4



**Figure 3** | **Several genes of the FA DNA repair pathway are downregulated upon p53 activation.** (a) A comparison of  $p53^{-7/-}$ , wild-type and  $p53^{431/431}$  cells suggests a potential p53-dependent regulation for 11 additional genes of the Fanconi anaemia (FA) DNA repair pathway. mRNAs for the indicated *Fanc* genes were quantified as described in Fig. 1a, in four independent experiments. For 11 of the tested genes, mean mRNA levels were intermediate in WT cells compared with  $p53^{-7/-}$  and  $p53^{431/431}$  cells, with statistical significance by one-way analysis of variance (ANOVA). (b) The 11 genes are downregulated on murine p53 activation. mRNAs for the indicated *Fanc* genes were quantified in untreated or Nutlin-treated MEFs. Results from three independent experiments. (c) Increased E2F4 binding at several *Fanc* promoters upon p53 activation. ChIP assay for E2F4 binding was performed in untreated or Nutlin-treated WT MEFs, with an antibody against E2F4 or rabbit IgG as a negative control. Immunoprecipitates were quantified using real-time PCR, fold enrichment was normalized to data over an irrelevant region, and then E2F4 binding in untreated WT cells was given a value of 1. Data are from two to three independent ChIP experiments, each quantified in triplicates. Below the ChIP data are represented, as in Fig. 2b, sequences around the TSS for each gene, putative E2F4-binding sites (lollipops), and primers used for ChIP assays (arrows). In all figures, means + s.e.m. are shown; \*\*\* $P \le 0.001$ , \*\* $P \le 0.05$ , NS, not significant by ANOVA or Student's t-tests.

NATURE COMMUNICATIONS 7:11091 | DOI: 10.1038/ncomms11091 | www.nature.com/naturecommunications

5



Figure 4 | CDE/CHR motifs are important for the p53-dependent repression of *Fanci* and *Fancr*. (a) Identification of candidate CDE/CHR motifs in *Fanci* and *Fancr* with a positional frequency matrix. The CDE/CHR motifs in six mouse genes were used to define the positional frequency matrix shown on top, which was then used to identify candidate CDE/CHR motifs in *Fanci* and *Fancr* (for details, see Supplementary Fig. 7). The candidate CDE/CHR smap 38 (*Fanci*)- and 15 (*Fancr*)-bp downstream of the transcription start site (TSS) of each gene. Also shown here are the mutated CDE/CHRs that were tested in luciferase assays in **c**. (**b**) p53 activation leads to decreased Fanci and Fancr protein levels. Protein extracts, prepared from untreated or Nutlin-treated MEFs, were immunoblotted with antibodies against Fanci, Fancr and actin, then bands were quantified and the amounts of Fanci proteins in unstressed WT cells were assigned a value of 1. (**c**) The p53-dependent regulation of *Fanci* and *Fancr* occurs via a CDE/CHR motif. For each gene, a l-kb fragment centred method the TSS, containing a WT or mutant CDE/CHR, was cloned upstream of a luciferase gene and transfected into NIH-3T3 cells, treated or not with Nutlin, then luciferase activity was measured after 24 h. Mutation of the putative CDE site increased luciferase basal expression and abrogated the effect of Nutlin. Results from two independent experiments; means + s.e.m. are shown; \*\*\*P  $\leq$  0.001, \*\*P  $\leq$  0.01, NS, not significant by Student's t-test.

belong to the FA core complex (*Fanca, Fancb* and *Fancm*) and its accessory protein (*Fanct/Ube2t*), the pivotal ID2 complex (*Fancd2* and *Fanci*), or downstream effector proteins (*Fancd1/Brca2, Fancj/Bach1/Brip1, Fancn/Palb2, Fanco/Rad51c, Fancr/Rad51* and *Fancs/Brca1*)<sup>39-42</sup>. Together, these data suggested an important role for p53 in regulating the FA pathway.

p53 activation attenuates the repair of specific DNA lesions. A typical feature of FA cells is their inability to repair DNA interstrand crosslinks, as evidenced by an increased frequency of chromosomal aberrations, and more specifically tri- and quadri-radial chromosomes, after exposure to mitomycin C  $(MC)^{39}$ . We compared the effects, on WT and  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  cells, of a 48-h treatment with 50 nM MC. Such a treatment procedure was previously reported to differentially affect WT MEFs and MEFs with an impaired FA pathway<sup>43</sup>. Interestingly, we found that this procedure led to a rather subtle induction of p53 (suggested by a limited increase in p21 transactivation), which correlated with a twofold decrease in Fancd2 mRNA expression in  $p53^{431/431}$  MEFs, but no significant alteration of Fancd2 mRNA levels in WT cells (Supplementary Fig. 13). We next determined the frequencies of all types of chromosomal aberrations, or of radial chromosomes, in WT and  $p53^{A31/A31}$ cells before or after treatment with MC. In untreated cells, no significant difference was found between the two genotypes. Strikingly, however, chromosomal aberrations, and particularly radial chromosomes, were more frequent in  $p53^{431/\Delta 31}$  cells after

treatment with MC, consistent with a decreased capacity to repair interstrand crosslinks in the mutant cells (Fig. 5a). Accordingly, chromosomes with sister chromatid exchanges were also more frequent in MC-treated  $p53^{A31/A31}$  cells than in WT cells (Fig. 5b). These results suggested that the FA DNA repair pathway is attenuated in  $p53^{A31/A31}$  cells, presumably because these cells exhibit an increased p53 activity. Consistent with this,  $p53^{\underline{A}31/\underline{A}31}$  cells exhibited a decreased capacity to form Rad51 foci and an increased sensitivity to MC, and the pretreatment of cells with Nutlin appeared to further impact on these cellular phenotypes (Fig. 5c,d). Further evidence that the decreased DNA repair in  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  cells resulted from increased p53 activity (rather than a loss of the p53 CTD per se) came from analysing  $Mdm2^{+/-}Mdm4^{+/\Delta E6}$  MEFs. These MEFs express a WT p53 protein, but exhibit an increased p53 activity due to lower levels of p53 inhibitors<sup>44,45</sup>. Like  $p53^{431/431}$  MEFs,  $Mdm2^{+/-} Mdm4^{+/AE6}$  cells were more sensitive than WT cells to MC (Supplementary Fig. 14). In sum, a defective FA DNA repair pathway is known to activate p53 (ref. 46), but these results indicate that an increased p53 activity might reduce the expression of several FA genes and attenuate the FA DNA repair pathway. Taken together, these data indicate the existence of a positive regulatory feedback loop (Fig. 6).

Human p53 also regulates FA genes. We next tested whether the FA genes that were found regulated by murine p53 were similarly regulated in human cells. We compared human primary WT cells

NATURE COMMUNICATIONS | 7:11091 | DOI: 10.1038/ncomms11091 | www.nature.com/naturecommunications



Figure 5 | A decreased capacity to repair mitomycin C-induced DNA lesions in cells with increased p53 activity. (a) p53<sup>d31/d31</sup> MEFs exhibit increased frequencies of mitomycin C-induced chromosomal aberrations. Frequencies of total chromosomal aberrations, or tri- and quadri-radial chromosomes, were determined in wild-type (WT) and p53<sup>d31/d31</sup> (Δ31) MEFs at passage 3, untreated or after treatment with mitomycin C (MC). On top, typical examples of MC-treated WT and Δ31 metaphases presenting chromosomal aberrations (arrowheads: chromosome breaks; arrow: radial chromosome; scale bars, 2 μm). Below, results were plotted from 107 (WT untreated), 99 (WT MC-treated), 112 (Δ31 untreated) and 98 (Δ31 MC-treated) metaphases. To prevent any potential bias, cell preparations were dropped onto code-labelled slides (to mask the genotypes of cells to be analysed) and the same metaphases were independently observed by two experimenters. (b) p53<sup>/31//31</sup> MEFs exhibit increased frequencies of MC-induced sister chromatid exchanges. As in a, an unbiased procedure was used to determine the percentage of chromosomes presenting one or several sister chromatid exchanges (SCEs). On top, representative examples of chromosomes from MC-treated WT (left) or p53<sup>//31///31</sup> (right) metaphases displaying SCEs (scale bars, 2 µm). Below, results plotted from an analysis of 3,013 (WT untreated), 1,287 (WT MC treated), 1,905 (Δ31 untreated) and 340 (Δ31 MC treated) chromosomes. <sup>o</sup>P = 0.059. (c) p53 activation correlates with a decreased capacity to form Rad51 foci in response to mitomycin C. Rad51 foci were counted in cells treated with MC or MC + Nutlin. On top, typical nuclei are shown (scale bars, 2 µm); below, results from > 300 nuclei per genotype. The reduced capacity to form Rad51 foci might result from p53-dependent decreases in the expression of Fancr/Rad51 as well as other Fanc genes. (d) Effects of p53 activation on the cellular sensitivity to MC. Cells were treated or not with Nutlin 2.5  $\mu$ M for 24 h, then with MC at 0, 0.01, 0.1 and 1 $\mu$ g ml <sup>-1</sup> for 48 h, then counted. For each genotype, the final number of untreated cells was given a value of 1 and used as reference. Results from three experiments. Means + s.e.m. are shown; \*\*\* $P \le 0.001$ , \*\* $P \le 0.01$ , \* $P \le 0.05$  by Student's t-test.

NATURE COMMUNICATIONS [7:11091] DOI: 10.1038/ncomms11091 | www.nature.com/naturecommunications

7

with p53-deficient cells, and observed that out of the 12 p53-regulated FA genes identified in mouse cells, 9 are also downregulated upon p53 activation in human MRC5 cells: FANCA, FANCB, FANCD1, FANCD2, FANCI, FANCJ, FANCM, FANCR and FANCT (Fig. 7a). Interestingly, one of these genes, FANCB, was recently identified as one of 210 genes most likely to be downregulated by p53 in a E2F4-dependent manner<sup>33</sup>. Furthermore, candidate CDE/CHR motifs could be found for each of these genes (Supplementary Fig. 15a), and the CDE/CHRs in Fancd2, Fanci and Fancr were highly conserved in the human FANC homologous genes (Supplementary Fig. 15b). Consistent with this, we next found that human p53 activation leads to increased E2F4 binding at the FANCD2, FANCI and FANCR promoters (Supplementary Fig. 16a), and that mutation of the CDE/CHRs in these promoters abolished their p53-dependent regulation (Supplementary Fig. 16b). The p53-dependent downregulation of FANC genes could also be observed in response to DNA damage in MRC5 cells (Supplementary Fig. 17), and we verified that the CDE/CHR motif in FANCD2 is important for its DNA damage-induced downregulation (Supplementary Fig. 18). In addition, the data mining of a transcriptome-wide analysis were again consistent with our results (Supplementary Fig. 19). BLM, DEK, FEN1, TIMELESS and RECQL4 were also downregulated in human cells upon p53 activation, further indicating an overall conservation of the regulatory pathways identified in murine cells (Supplementary Fig. 20).

Further evidence of this conservation was obtained using the Oncomine software (www.oncomine.org). Tumour samples from the Australian Ovarian Cancer Study revealed that the p53 pathway is functional in low-grade ovarian serous tumours, but frequently lost in high-grade ovarian carcinomas. Evidence for this first came from using a transcriptomic signature of p53 target genes<sup>47</sup>. Formal demonstration was later obtained by *TP53* 



Figure 6 | A simplified model of p53 regulation by a bipolar feedback system may account for the attenuated DNA repair capacity of

**p53**<sup>431</sup>/<sup>431</sup> **MEFs.** Defects in DNA repair activate p53 (1), and activated p53 downregulates several FA genes (2), which would attenuate the FA pathway and cause partial defects in DNA repair (3), hence defining a positive-feedback loop (in green). In unstressed WT MEFs, this positive-feedback loop would be efficiently counterbalanced by the negative-feedback loop (in red) between p53 and its major inhibitor, the ubiquitin ligase Mdm2 (4 and 5). In *p***53**<sup>431/,431</sup> MEFs however, the *p***53**<sup>431/,431</sup> more abundant, indicating that its interaction with Mdm2 is decreased<sup>2</sup>. Hence, the p53/Mdm2 negative-feedback loop is enfeebled in *p***53**<sup>431/,431</sup> MEFs (or in *Mdm2*<sup>+/-</sup> *Mdm4*<sup>+//4E6</sup> MEFs), which would lead to a stronger p53/FA positive-feedback loop and thus to a reduced capacity to repair mitomycin C-induced DNA lesions. In both WT and *p***53**<sup>431/,431</sup> cells, Nutlin specifically affects the p53/Mdm2 negative-feedback loop, which would further increase the cellular sensitivity to mitomycin C.

sequencing, which identified p53 mutations in 0% of low-grade serous tumours48 and 96.7% of high-grade carcinomas49 . We analysed the transcriptome data of Anglesio et al.47, who characterized 90 ovarian samples from the Australian Ovarian Cancer Study, including 60 high-grade adenocarcinomas. As expected, the expression of genes activated by p53 (CDKN1A/ p21, MDM2, DDB2 and SESN1) was decreased in high-grade tumours. On the opposite FANCD2, and other genes known to be repressed by E2F4 in a p53-dependent manner (BIRC5, CDC6 and CDC25C), were more expressed in high-grade tumours (Fig. 7b). Increased FANCD2 expression also correlated with increases in the expression of other FA genes (FANCA, FANCI, FANCJ, FANCR and FANCT), as well as additional genes regulated by p53 in our experiments (BLM, FEN1 and TIMELESS; Fig. 7b). Similar results were obtained when we analysed data from liver cancers (Supplementary Fig. 21) and adrenocortical tumours (Supplementary Fig. 22), providing evidence that human p53 downregulates several genes of the FA pathway in many tissues, and that loss of p53 function leads to an increased expression of FANC genes in advanced human cancers.

We next found that Nutlin sensitized human primary WT cells, but not their p53-deficient counterparts, to MC (Fig. 7c). Likewise, the sensitivity to MC of human cancer cells expressing a WT p53 was markedly increased by Nutlin (Fig. 7d), suggesting a potential therapeutic relevance of our findings.

#### Discussion

In this report, we further analysed the consequences of a deletion of the p53 carboxy-terminal domain. Our previous analysis indicated that most  $p53^{A31/A31}$  mice exhibit a full set of features characteristic of DC. At the molecular level, the increased p53 activity in  $p53^{A31/A31}$  MEFs correlated with the downregulation of four genes implicated in telomere syndromes: *Dkc1*, *Rtel1*, *Terf1* and *Tinf2* (ref. 2). Here we show that several other genes involved in telomere metabolism are downregulated in  $p53^{A31/A31}$ cells: *Blm*, *Dek*, *Fancd2*, *Fen1*, *Gar1*, *Recql4* and *Timeless*, strengthening the notion that p53 plays a major role in the regulation of telomere metabolism.

Importantly, some of these genes are involved in DNA repair, and we next found  $p53^{431/431}$  cells to exhibit decreased mRNA levels for 11 additional genes mutated in FA, and a reduced capacity to repair DNA interstrand crosslinks. Because DC and FA are both inherited bone marrow failure syndromes in humans, these new findings raised the possibility that an attenuated FA pathway might contribute to the bone marrow failure that affects  $p53^{A31/A31}$  mice. Importantly, however, mice carrying knocked out alleles of Fanc genes exhibit little or no haematological abnormalities in the absence of additional stress<sup>50</sup> (for example, aldehyde-mediated DNA damage<sup>51,52</sup>), whereas aplastic anaemia occurs spontaneously in mouse models of telomere dysfunction (for example,  $Pot1b^{-/-} mTR^{+/-}$  mice<sup>53</sup>) and in  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  mice<sup>2</sup>. Furthermore,  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  mouse cohorts of mixed genetic backgrounds previously indicated that a gene linked to the Agouti locus, on chromosome 2, had an impact on their survival<sup>2</sup>. None of the Fanc genes maps on chromosome 2, whereas mRNA levels for Rtel1, located 26 cM away from Agouti, affected the survival of mutant mice<sup>2</sup>. Rtel1 encodes a Fancj-like helicase that might participate in DNA repair<sup>54</sup>, but that mainly acts as a dominant regulator of telomere length<sup>55</sup>. Accordingly, *Rtel1* is mutated in telomere syndromes, including severe DC<sup>56-58</sup> and pulmonary fibrosis<sup>59</sup>. Together, these data indicate that telomere dysfunction most likely plays a predominant role in the aplastic anaemia that affects  $p53^{d31/d31}$  mice.

Interestingly, aplastic anaemia is not the only clinical trait shared by patients with FA and DC: abnormal skin pigmentation,



Figure 7 | Human p53 also regulates multiple genes of the Fanconi anaemia DNA repair pathway. (a) Human p53 activation leads to the downregulation of several *FANC* genes. mRNAs were prepared from human diploid lung fibroblasts (MRC5) and their SV40-transformed derivative cells (SVM), untreated or treated with Nutlin, and mRNAs were quantified using real-time PCR, normalized to control mRNAs, then the amount in untreated MRC5 cells was

of several *FANC* genes. mRNAs were prepared from human diploid lung fibroblasts (MRC5) and their SV40-transformed derivative cells (SVM), untreated or treated with Nutlin, and mRNAs were quantified using real-time PCR, normalized to control mRNAs, then the amount in untreated MRC5 cells was assigned a value of 1. For each gene, results are from three independent experiments; means + s.e.m. are show; \*\*\* $P \le 0.001$ , \* $P \le 0.05$ , NS, not significant by Student's t-test. (**b**) In human ovarian cancers, loss of p53 function correlates with an increase in the expression of FANC genes. Analysis of transcriptome data from ref. 47 with the Oncomine software indicates that ovarian serous cancer progression correlates with a decreased expression of p53-transactivated genes (for example, *CDKN1A* and *MDM2*), and an increased expression of several *FANC* genes (*FANCA*, *FANCD2*, *FANCI*, *FANCJ*, *FANCP* and *FANCT*). (**c**) p53 activation sensitizes cells to mitomycin C. MRC5 and SVM cells were treated and analysed as in Fig. 5d. Results from three independent experiments. (**d**) Human cancer cells expressing a WT p53 can be sensitized to mitomycin C by a treatment with Nutlin. Colon carcinoma cells HCT116 (HCT) and their p53<sup>-/-</sup> -derivative cells (HCT p53 KO) were treated and analysed as in Fig. 5d. Results from three independent experiments.

NATURE COMMUNICATIONS | 7:11091 | DOI: 10.1038/ncomms11091 | www.nature.com/naturecommunications

9

short stature and testicular hypoplasia may affect patients with either syndrome. Furthermore, telomere dysfunction was reported for at least some patients with  $FA^{28,60}$ , and cells from patients with DC appeared hypersensitive to MC in a few studies 56,61. In fact, although DC and FA are distinct clinical disorders caused by mutations in different genes, their clinical similarities initially led to some confusion<sup>62-65</sup>, and recent evidence of misdiagnosis can still be found occasionally<sup>66</sup>. As mentioned above, because a defective FA pathway may activate p53 (ref. 46), our results suggest the operation of a positivefeedback loop between p53 and an attenuated FA pathway. Likewise, short telomeres activate p53 (ref. 67), and our data may also suggest a positive-feedback loop between p53 and telomere metabolism. Together, our analyses of  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  mutant cells raise the intriguing possibility that a sustained p53 activation might contribute to the clinical overlap between DC and FA, notably by leading to a concomitant downregulation of genes important for telomere metabolism and genes of the FA DNA repair pathway (Supplementary Fig. 23). Because the p53 pathway is affected by single-nucleotide polymorphisms in many genes including TP53, MDM2, MDM4 and CDKN1A<sup>68</sup>, we further presume that the strength of the regulatory loops that affect p53, telomere-related and FA genes should vary among humans, and that this might contribute, in patients with identical disease-causing mutations, to the variability in clinical overlap between these syndromes. Independently, our data also provide a rationale for the combination of Nutlin with therapeutic agents inducing DNA interstrand crosslinks, to efficiently kill cancer cells that retain a functional p53 pathway.

#### Methods

**Cells and cell culture reagents.** MEFs, isolated from 13.5-day embryos, were cultured for ≤6 passages in a 5% CO<sub>2</sub> and 3% O<sub>2</sub> incubator, in DMEM Glutumax (Gibco), with 15% fetal bovine serum (FBS; Biowest), 100 µM 2-mercaptoethanol (Millipore), 10 µM non-essential amino acids and penicillin/streptomycin (NEAA/PS, Gibco). BMCs were flushed from femurs and tibias of 3-week-old WT and *p53*<sup>d31/d31</sup> mice. The isolation of MEFs and recovery of BMCs were performed according to Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) regulations, as supervised by the Curie Institute's Comité d'éthique en expérimentation animale. NIH-3T3 cells were grown in the same conditions as primary MEFs. Human lung fibroblasts MRC5 and their SV40-transformed derivatives (MRCS SV2, Sigma) were cultured in a 5% CO<sub>2</sub> and 3% O<sub>2</sub> incubator in minimum sestential medium (Gibco), completed with 10% FBS, 2 mM 1-glutamine (Gibco), 1 mM pyruvate and 10 µM NEAA/PS. Human colon carcinoma cells HCT116 and their derivatives (HCT116 p53 KO, which do not express p53α), kind gifts from Bert Vogelstein (Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA), were grown in a 5% CO<sub>2</sub> incubator in McCoy's 5A medium with 10% FBS, HEPES and penicilin-streptomycin. Cells were treated for 24 h with 10 µM Nutlin 3a or with 0.5 µg ml<sup>-1</sup> doxorubicin before PCR with reverse transcription (RT–PCR) or ChIP assays, or 50 nM MC for 48 h before RT–PCR or metaphase spread preparations.

Quantitative RT-PCR. Total RNA, extracted using Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel), was reverse transcribed using Superscript III (Invitrogen). Realtime quantitative PCRs (primer sequences in Supplementary Tables 1 and 2) were performed on ABI PRISM 7500 using Power SYBR Green (Applied Biosystems).

Western blots. Protein detection by immunoblotting was performed using antibodies raised against Fancd2 (Abcam, ab108928, 1/500 dilution), Fanci (Abcam, ab74332, 1/500), Fancr (Calbiochem, PC130, 1/2,500), E2F4 (Santa Cruz, C-20, 1/200), p53 (Novocastra, CMS, 1/1,000), p21 (Santa Cruz, F-5, 1/250) or actin (Santa Cruz, C-4, 1/5,000) and chemiluminescence revelation was achieved with SuperSignal west dura (Perbio, France). Band quantification was performed using ImageJ, with actin as loading control. Control bands for Fancd2, Fanci and Fancr proteins were obtained using 20 µl lipofectamine 2000 according to the supplier's procedure to transfect NIH-3T3 cells (a 10-cm dish at 60% confluency) with 3 µg of a pCAGGS expression vector (empty pCAGGS vector, pCAGGS-Fancd2, pCAGGS-Fanci or pCAGGS-Fancr—cloning details upon request), then extracting proteins after 24h. Uncropped scans of the western blots in Figs 1d and 4b, as well as relevant controls, are presented in the Supplementary Figs 2 and 9, respectively.

**ChIP assay.** ChIP analysis was performed as described<sup>69</sup>. Briefly, cells were left untreated or treated with Nutlin or doxorubicin for 24 h. Cellular proteins of  $10^7$ 

cells were crosslinked to chromatin with 1% formaldehyde for 10 min at 25 °C. E2F4–DNA complexes were immunoprecipitated from total extracts using an antibody against E2F4 (Santa Cruz, C-20, 30 µg) and 400–500 µg of sonicated chromatin. Rabbit IgG (Abcam) was used for control precipitation. Quantitative PCRs (primer sequences in Supplementary Table 3) were then performed on ABI PRISM 7500.

**Cell cycle assays**. Log phase cells, treated or not with Nutlin, were incubated for 24 h, then pulse-labeled for 1 h with bromo-deoxy uridine (BrdU) (10 µM), fixed in 70% ethanol, double stained with fluorescein isothiocyanate anti-BrdU and propidium iodide, and sorted using a LSRII cytometer. Data were analysed using FlowJo.

Luciferase expression assays. To construct the Luciferase reporter plasmids, we cloned a 2-kb fragment (for *Fancd2*) or 1-kb fragment (for *Fanci, FanCr, FANCD2*, *FANCI* or *FANCB*) centred around the transcription start site upstream of the firefly luciferase gene in a pGL3-basic vector (Promega), or a variant fragment generated by PCR mutagenesis of the putative CDE/CHR motif (details on request). Next,  $10^6$  NIH-3T3 cells were transfected using lipofectamine 2000 by 3 µg of a *Fanc*-luciferase reporter plasmid and 30 ng of renilla luciferase expression plasmid (pGL4.73, Promega) for normalization, and treated or not with  $10 \,\mu$ M Nutlin 3a or 0.5 µg ml<sup>-1</sup> doxorubicin. Transfected cells were incubated for 24 h, then trypsinized, resuspended in 75 µl culture medium with 7.5% FBS and transferred into a well of an optical 96-well plate (Nunc). The dual-glo luciferase assay system (Promega) was used according to the manufacturer's protocol to lyse the cells and firefly and renilla luciferase signals. Results were normalized, then the average luciferase activity in cells transfected with a WT Promoter and not treated with Nutlin were assigned a value of 1.

**Metaphase spread preparation and analyses.** Cells were plated in duplicate, then untreated or treated with 50 nM MC for 48 h, and treated with 0.1 mM nocodazole for 3 h to arrest cells in metaphase. Cells were submitted to hypotonic shock (75 mM KCl), fixed in a (3:1) ethanol/acetic acid solution, dropped onto glass slides and air-dried slides were stained with Giemsa to score for chromosome aberrations. To analyse sister chromatid exchanges, cells plated in duplicate and treated or not with MC were, 1 h after plating, treated with 10  $\mu$ M (BrdU 1/3 BrdC) for 48 h, then metaphase spreads were prepared as above. Air-dried slides were stained with 10  $\mu$ gml<sup>-1</sup> Hoescht 33258 for 20 min, submitted to ultraviolet at 365 nm while heated at 55 °C during 30 min, then stained with Giemsa. Images were acquired using a Zeiss Axiophot (X63) microscope.

**Immunofluorescence.** Cells were spread onto coverslips, treated or not with Nutlin 10  $\mu$ M, then MC 0.1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> for 1 h, and left to recover for 12 h. Twenty-four hours after Nutlin treatment, cells were fixed and permeabilized. Coverslips were incubated with a Rad51 antibody (Ab-1 Calbiochem) for 1 h at 37 °C in a humid chamber, then with secondary Alexa Fluo anti-rabbit antibody (Invitrogen). Slides were mounted in Vectashield with 0.2  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> 4.6-diamidino-2-phenylindole. Images were captured on a Zeiss Axioplan2 microscope using equal exposure times for all images.

**Cellular sensitivity to mitomycin C.** Cells were seeded into wells of a 96-well plate (500 cells per well, in triplicates). After adhesion, cells were treated or not with Nutlin 2.5  $\mu$ M for 24 h, then with MC for 48 h at 0, 0.01, 0.1 and 1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>. Cells were then counted using the CyQUANT kit (Life technologies) and a microplate reader according to the supplier's recommendations.

**Statistical analyses.** Differences between two groups were analysed by Student's *t*-test, difference between three groups were analysed by one-way analysis of variance, and values of  $P \le 0.05$  were considered significant.

#### References

- Khincha, P. P. & Savage, S. A. Genomic characterization of the inherited bone marrow failure syndromes. *Semin. Hematol.* 50, 333–347 (2013).
- Simeonova, I. et al. Mutant mice lacking the p53 C-terminal domain model telomere syndromes. Cell Rep. 3, 2046–2058 (2013).
- Hamard, P. J. et al. The C terminus of p53 regulates gene expression by multiple mechanisms in a target- and tissue-specific manner in vivo. Genes Dev. 27, 1868–1885 (2013).
- Armanios, M. & Blackburn, E. H. The telomere syndromes. Nat. Rev. Genet. 13, 693–704 (2012).
- Tummala, H. et al. Poly(A)-specific ribonuclease deficiency impacts telomere biology and causes dyskeratosis congenita. J. Clin. Invest. 125, 2151–2160 (2015).
- Holohan, B., Wright, W. E. & Shay, J. W. Telomeropathies: an emerging spectrum disorder. J. Cell Biol. 205, 289–299 (2014).

NATURE COMMUNICATIONS | 7:11091 | DOI: 10.1038/ncomms11091 | www.nature.com/naturecommunications
- Wu, Y., Suhasini, A. N. & Brosh, Jr R. M. Welcome the family of FANCJ-like helicases to the block of genome stability maintenance proteins. *Cell. Mol. Life. Sci.* 66, 1209–1222 (2009).
- Kocak, H. *et al.* Hoyeraal-Hreidarsson syndrome caused by a germline mutation in the TEL patch of the telomere protein TPP1. *Genes Dev.* 28, 2090–2102 (2014).
- Codd, V. et al. Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. Nat. Genet. 45, 422–427 (2013).
- Jain, D., Malik, A. A., Kumar, A., Malik, B. K. & Raina, V. Variations in exon-2 of SBDS gene and its association with aplastic anemia. *Int. J. Lab. Hematol.* 36, e88–e90 (2014).
- Venteicher, A. S., Meng, Z., Mason, P. J., Veenstra, T. D. & Artandi, S. E. Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. *Cell* 132, 945–957 (2008).
- 12. Rooney, S. et al. Defective DNA repair and increased genomic instability in Artemis-deficient murine cells. J. Exp. Med. 197, 553–565 (2003).
- Du, X. et al. Telomere shortening exposes functions for the mouse Werner and Bloom syndrome genes. Mol. Cell. Biol. 24, 8437–8446 (2004).
- Ting, A. P., Low, G. K., Gopalakrishnan, K. & Hande, M. P. Telomere attrition and genomic instability in xeroderma pigmentosum type-b deficient fibroblasts under oxidative stress. J. Cell. Mol. Med. 14, 403–416 (2010).
- Ivanauskiene, K. *et al.* The PML-associated protein DEK regulates the balance of H3.3 loading on chromatin and is important for telomere integrity. *Genome Res.* 24, 1584–1594 (2014).
- Lin, W. et al. Mammalian DNA2 helicase/nuclease cleaves G-quadruplex DNA and is required for telomere integrity. EMBO J. 32, 1425–1439 (2013).
- Munoz, P., Blanco, R., Flores, J. M. & Blasco, M. A. XPF nuclease-dependent telomere loss and increased DNA damage in mice overexpressing TRF2 result in premature aging and cancer. *Nat. Genet.* 37, 1063–1071 (2005).
- Batenburg, N. L., Mitchell, T. R., Leach, D. M., Rainbow, A. J. & Zhu, X. D. Cockayne Syndrome group B protein interacts with TRF2 and regulates telomere length and stability. *Nucleic Acids Res.* 40, 9661–9674 (2012).
- Cottage, C. T. et al. Increased mitotic rate coincident with transient telomere lengthening resulting from pim-1 overexpression in cardiac progenitor cells. *Stem Cells* 30, 2512–2522 (2012).
- 20. Rhee, D. B. et al. FANCC suppresses short telomere-initiated telomere sister chromatid exchange. Hum. Mol. Genet. 19, 879–887 (2010).
- Saharia, A. et al. Flap endonuclease 1 contributes to telomere stability. Curr. Biol. 18, 496–500 (2008).
- Benson, E. K., Lee, S. W. & Aaronson, S. A. Role of progerin-induced telomere dysfunction in HGPS premature cellular senescence. *J. Cell Sci.* 123, 2605–2612 (2010).
- Hou, Y. Y., Toh, M. T. & Wang, X. NBS1 deficiency promotes genome instability by affecting DNA damage signaling pathway and impairing telomere integrity. *Cell Biochem. Funct.* **30**, 233–242 (2012).
- Leman, A. R. et al. Timeless preserves telomere length by promoting efficient DNA replication through human telomeres. Cell Cycle 11, 2337–2347 (2012).
- Chawla, R. et al. Human UPF1 interacts with TPP1 and telomerase and sustains telomere leading-strand replication. EMBO J. 30, 4047–4058 (2011).
- Crabbe, L., Jauch, A., Naeger, C. M., Holtgreve-Grez, H. & Karlseder, J. Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 2205–2210 (2007).
- Sengupta, S. et al. Tumour suppressor p53 represses transcription of RECQ4 helicase. Oncogene 24, 1738–1748 (2005).
- Joksic, I. et al. Dysfunctional telomeres in primary cells from Fanconi anemia FANCD2 patients. Genome Integr. 3, 6 (2012).
- Lohr, K., Moritz, C., Contente, A. & Dobbelstein, M. p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53. J. Biol. Chem. 278, 32507–32516 (2003).
- Benson, E. K. et al. p53-dependent gene repression through p21 is mediated by recruitment of E2F4 repression complexes. Oncogene 33, 3959–3969 (2014).
- Quaas, M., Muller, G. A. & Engeland, K. p53 can repress transcription of cell cycle genes through a p21(WAF1/CIP1)-dependent switch from MMB to DREAM protein complex binding at CHR promoter elements. *Cell Cycle* 11, 4661–4672 (2012).
- 32. Fischer, M., Quaas, M., Wintsche, A., Muller, G. A. & Engeland, K. Polo-like kinase 4 transcription is activated via CRE and NRF1 elements, repressed by DREAM through CDE/CHR sites and deregulated by HPV E7 protein. *Nucleic Acids Res.* 42, 163–180 (2014).
- Fischer, M., Quaas, M., Steiner, L. & Engeland, K. The p53-p21-DREAM-CDE/ CHR pathway regulates G2/M cell cycle genes. *Nucleic Acids Res.* 44, 164–174 (2016).
- 34. Mjelle, R. et al. Cell cycle regulation of human DNA repair and chromatin remodeling genes. DNA Repair (Amst) 30, 53–67 (2015).
- Meetei, A. R. et al. A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. Mol. Cell. Biol. 23, 3417–3426 (2003).

- Qian, L., Yuan, F., Rodriguez-Tello, P., Padgaonkar, S. & Zhang, Y. Human Fanconi anemia complementation group a protein stimulates the 5' flap endonuclease activity of FEN1. *PLoS ONE* 8, e82666 (2013).
- Younger, S. T., Kenzelmann-Broz, D., Jung, H., Attardi, L. D. & Rinn, J. L. Integrative genomic analysis reveals widespread enhancer regulation by p53 in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 43, 4447–4462 (2015).
- Muntean, A. G. *et al.* The PAF complex synergizes with MLL fusion proteins at HOX loci to promote leukemogenesis. *Cancer Cell* 17, 609–621 (2010).
- Longerich, S., Li, J., Xiong, Y., Sung, P. & Kupfer, G. M. Stress and DNA repair biology of the Fanconi anemia pathway. *Blood* 124, 2812–2819 (2014).
- Sawyer, S. L. et al. Biallelic mutations in BRCA1 cause a new Fanconi anemia subtype. Cancer Discov. 5, 135–142 (2015).
- Hira, A. et al. Mutations in the gene encoding the E2 conjugating enzyme UBE2T cause Fanconi anemia. Am. J. Hum. Genet. 96, 1001–1007 (2015).
- Wang, A. T. *et al.* A dominant mutation in human RAD51 reveals its function in DNA interstrand crosslink repair independent of homologous recombination. *Mol. Cell* 59, 478–490 (2015).
- Crossan, G. P. et al. Disruption of mouse Slx4, a regulator of structure-specific nucleases, phenocopies Fanconi anemia. Nat. Genet. 43, 147–152 (2011).
- Montes de Oca Luna, R., Wagner, D. S. & Lozano, G. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* 378, 203–206 (1995).
- Bardot, B. et al. Mice engineered for an obligatory Mdm4 exon skipping express higher levels of the Mdm4-S isoform but exhibit increased p53 activity. Oncogene 34, 2943–2948 (2015).
- Ceccaldi, R. et al. Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells. Cell Stem Cell 11, 36–49 (2012).
- Anglesio, M. S. et al. Mutation of ERBB2 provides a novel alternative mechanism for the ubiquitous activation of RAS-MAPK in ovarian serous low malignant potential tumours. *Mol. Cancer Res.* 6, 1678–1690 (2008).
- Hunter, S. M. et al. Molecular profiling of low grade serous ovarian tumours identifies novel candidate driver genes. Oncotarget 6, 37663–37677 (2015).
- Ahmed, A. A. et al. Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. J. Pathol. 221, 49–56 (2010).
- Bakker, S. T., de Winter, J. P. & te Riele, H. Learning from a paradox: recent insights into Fanconi anaemia through studying mouse models. *Dis. Model Mech.* 6, 40–47 (2013).
- Langevin, F., Crossan, G. P., Rosado, I. V., Arends, M. J. & Patel, K. J. Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. *Nature* 475, 53–58 (2011).
- Garaycoechea, J. I. et al. Genotoxic consequences of endogenous aldehydes on mouse haematopoietic stem cell function. Nature 489, 571–575 (2012).
- Hockemeyer, D., Palm, W., Wang, R. C., Couto, S. S. & de Lange, T. Engineered telomere degradation models dyskeratosis congenita. *Genes Dev.* 22, 1773–1785 (2008).
- Uringa, E. J. et al. RTEL1 contributes to DNA replication and repair and telomere maintenance. Mol. Biol. Cell 23, 2782–2792 (2012).
- Ding, H. et al. Regulation of murine telomere length by Rtel: an essential gene encoding a helicase-like protein. Cell 117, 873–886 (2004).
- Ballew, B. J. et al. A recessive founder mutation in regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, underlies severe immunodeficiency and features of Hoyeraal Hreidarsson syndrome. PLoS Genet. 9, e1003695 (2013).
- Walne, A. J., Vulliamy, T., Kirwan, M., Plagnol, V. & Dokal, I. Constitutional mutations in RTEL1 cause severe Dyskeratosis congenita. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 448–453 (2013).
- Le Guen, T. *et al.* Human RTEL1 deficiency causes Hoyeraal-Hreidarsson syndrome with short telomeres and genome instability. *Hum. Mol. Genet.* 22, 3239–3249 (2013).
- Stuart, B. D. et al. Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. Nat. Genet. 47, 512–517 (2015).
- Leteurtre, F. et al. Accelerated telomere shortening and telomerase activation in Fanconi's anaemia. Br. J. Haematol. 105, 883–893 (1999).
- Nagasawa, H. & Little, J. B. Suppression of cytotoxic effect of mitomycin-C by superoxide dismutase in Fanconi's anemia and dyskeratosis congenita fibroblasts. *Carcinogenesis* 4, 795–799 (1983).
- McDonald, R. & Goldschmidt, B. Pancytopenia with congenital defects (Fanconi's anaemia). Arch. Dis. Child. 35, 367–372 (1960).
- Bodalski, J., Defecinska, E., Judkiewicz, L. & Pacanowska, M. Fanconi's anaemia and dyskeratosis congenita as a syndrome. *Dermatologica* 127, 330–342 (1963).
- Steier, W., Van Voolen, G. A. & Selmanowitz, V. J. Dyskeratosis congenita: relationship to Fanconi's anemia. *Blood* 39, 510–521 (1972).
- Sirinavin, C. & Trowbridge, A. A. Dyskeratosis congenita: clinical features and genetic aspects. Report of a family and review of the literature. *J. Med. Genet.* 12, 339-354 (1975).

NATURE COMMUNICATIONS | 7:11091 | DOI: 10.1038/ncomms11091 | www.nature.com/naturecommunications

- 66. Ghemlas, I. et al. Improving diagnostic precision, care and syndrome definitions using comprehensive next-generation sequencing for the inherited bone marrow failure syndromes. J. Med. Genet. 52, 575–584 (2015).
- Chin, L. *et al.* p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* 97, 527–538 (1999).
- Grochola, L. F., Zeron-Medina, J., Meriaux, S. & Bond, G. L. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 signaling pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001032 (2010).
- Simeonova, I. et al. Fuzzy tandem repeats containing p53 response elements may define species-specific p53 target genes. PLoS Genet. 8, e1002731 (2012).
- Lee, B. K., Bhinge, A. A. & Iyer, V. R. Wide-ranging functions of E2F4 in transcriptional activation and repression revealed by genome-wide analysis. *Nucleic Acids Res.* 39, 3558–3573 (2011).

### Acknowledgements

We thank J. Leemput for technical help in ChIP assays. The 'Genetics of Tumour Suppression' laboratory is an 'Equipe Labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer', with support from the Ligue Headquarters and from the Comité du Cantal. The project was initiated by grants from the Fondation de France (Comité Tumeurs), the Ligue Nationale contre le Cancer (Comité Ile de France) and the Fondation ARC. PhD candidates were supported by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (S.J and E.T.), and the Ligue Nationale contre le Cancer (S.J).

### Author contributions

S.J. and E.T. performed quantitative PCRs, ChIP and cell cycle assays, western blots, immunofluorescence, and chromosome breakage and cellular sensitivity assays; V.L. perfomed molecular cloning and luciferase assays, and contributed to chromosome breakage assays and bioinformatics analyses; B.B. contributed to ChIP assays; F.T. designed the project, performed bioinformatics analyses and wrote the paper.

#### Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at http://www.nature.com/ naturecommunications

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at http://npg.nature.com/ reprintsandpermissions/

How to cite this article: Jaber, S. et al. p53 downregulates the Fanconi anaemia DNA repair pathway. Nat. Commun. 7:11091 doi: 10.1038/ncomms11091 (2016).

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

## **Supplementary Figures**



Supplementary Figure 1. Comparison of mRNAs levels for 35 telomere-related genes in  $p53^{-/-}$ , wild-type and  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  cells.

RNAs, prepared from unstressed  $p53^{-/}$  (KO), wild-type (WT) and  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  ( $\Delta 31$ ) MEFs, were used to compare the expression of 42 genes proposed to impact on telomere metabolism (see Main text for details). Out of 42 genes, 7 exhibited intermediate mean mRNA levels in WT cells compared to  $p53^{-/-}$  and  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  cells, with significant differences between the means according to one-way ANOVA ; these are shown in Fig. 1a. Here, the 35 genes that did not match these criteria are shown. Results are from  $\geq 3$  independent experiments. (a) For 21 of the tested genes, the mean mRNA levels in WT cells did not fall between those measured in  $p53^{-/-}$  and  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  cells, making them poor candidates for a p53-dependent regulation. Means + s.e.m. are shown. (b) For 14 of the tested genes, the mean mRNA levels in WT cells ranged between those measured in  $p53^{-/-}$  and  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  cells, but differences between the means were not significant (ns) according to one-way ANOVA, suggesting little or no participation of p53 in the regulation of these genes. Means + s.e.m. are shown, and ns : not significant by ANOVA.

1



### Supplementary Figure 2. p53 activation leads to decreased Fancd2 protein levels.

(a) Identification of a Fancd2-specific band in western blots. Protein extracts were prepared from wild-type (WT) MEFs, or NIH3T3 (3T3) cells transfected with either an empty vector or a Fancd2 expression vector, then immunoblotted with antibodies against Fancd2 and actin. The blot demonstrates that the strongest band (at ~200 kDa) detected with the antibody against Fancd2 in WT MEFs corresponds to the Fancd2 protein. (Interestingly, NIH3T3 cells transfected with the empty vector exhibit, compared to WT cells, increased Fancd2 levels, consistant with NIH3T3 cells having a functional but attenuated p53 pathway). (b) Protein extracts, prepared from MEFs left untreated or treated with Nutlin (a specific Mdm2 inhibitor <sup>1</sup>) were immunoblotted with antibodies against Fancd2. This western blot is an uncropped version of the blot shown in Fig. 1d. The actin shown in Fig 1d is again shown here for reference.



## Supplementary Figure 3. A p53/E2F4 – mediated regulation of the *Rtel1* promoter.

(a) ChIP assay at the *Rtel1* locus. Chromatin Immmunoprecipitation assays with an E2F4 antibody were first carried out at the *Rtel1* locus, previously demonstrated to be regulated by p53 in a p21-dependent manner<sup>2</sup>. On top, a partial map of the *Rtel1* gene is shown (Ex: exons, black boxes: coding sequences, white boxes: UTRs). Putative E2F4 binding sites were searched for according to Lee *et al.*<sup>3</sup> : they correspond to the presence, within 200 bp, of at least 2 of the 6 following motifs : TTTSSCGC, YSATTGGC, GCGCSGS, CSSYCGCG, CGNAGC or RTTYGAA. ChIP assay for E2F4 binding was performed in Nutlin-treated *p53<sup>-/-</sup>* (KO), and untreated (Untr.) or Nutlin-treated wild-type (WT) MEFs, at a putative E2F4 binding site (lollipop) in the *Rtel1* promoter and in a non-binding region from *Rtel1* intron 11, with an antibody against E2F4, or rabbit IgG as a negative control. Immunoprecipitates were quantified using real-time PCR with primer sets a and b, or c and d, respectively. Fold enrichment were normalized to data over an irrelevant region, then E2F4 binding at the *Rtel1* promoter was observed in Nutlin-treated WT cells, consistent with a p53-dependent recruitment of E2F4 at this promoter. Data are from 2 independent ChIP experiments, each quantified in triplicates. Means + s.e.m. are shown, and \*\*\*P ≤ 0.001, n.s. : not significant by Student's *t* test.(**b**) p53 activation does not lead to E2F4 accumulation. Protein extracts, prepared from Nutlin-treated *p53<sup>-/-</sup>*, and untreated or Nutlin-treated wild-type MEFs, were immunoblotted with antibodies against E2F4 and actin.



# Supplementary Figure 4. NIH 3T3 cells transfected with a WT or a mutant *Fancd2* Promoter-Luciferase reporter plasmid exhibit similar cell cycle kinetics.

NIH 3T3 cells were transfected with a WT or mutant Fancd2 Luciferase reporter plasmid (see Fig. 2c), treated or not with Nutlin, incubated for 24 h, then pulse-labeled with BrdU, double-stained with FITC anti-BrdU and propidium iodide, sorted by FACS, and G1/S ratios were determined. Results from 2 independent experiments, performed simultaneously with the experiments reported in Fig. 2c. Means + s.e.m. are shown, and \*\*P  $\leq 0.01$ , \*P  $\leq 0.05$ , n.s. : not significant by Student's *t* test.



Supplementary Figure 5. The p53-dependent downregulation of *Fancd2* also occurs in response to DNA damage.

(a) Upon DNA damage, p53 activation leads to decreased Fancd2 mRNA levels. mRNAs were quantified in  $p53^{-6}$  (KO), WT and  $p53^{\Delta_{31}/\Delta_{31}}$  ( $\Delta$ 31) MEFs, untreated or treated with 0.5  $\mu$ M Doxorubicin for 24 hr. Results from 3 independent experiments. (b) The DNA damage-dependent activation of p53 leads to decreased Fancd2 protein levels. Protein extracts, prepared from untreated or Doxorubicin-treated (Doxo) MEFs, were immunoblotted with antibodies against Fancd2, p53 and actin. Doxorubicin led to wild-type p53 protein accumulation, and even more so  $p53^{\Delta_{31}}$  accumulation. On the opposite, Fancd2 protein levels were decreased in WT and  $p53^{\Delta_{31}/\Delta_{31}}$  doxorubicin-treated MEFs (c) ChIP assay for E2F4 binding was performed in Doxorubicin-treated  $p53^{-5}$ , and untreated (unt.) or Doxorubicin-treated wild-type MEFs, with an antibody against E2F4, or rabbit IgG as a negative control. Immunoprecipitates were quantified in triplicates as described in Fig. 2b. In all figures, means + s.e.m. are shown, and \*\*\*P  $\leq 0.001$ , \*\*P  $\leq 0.01$ , n.s. : not significant by Student's *t* test.



Supplementary Figure 6. The p53-dependent downregulation of *Fanc* genes requires p21. RNAs prepared from untreated or Nutlin-treated  $p21^{-/-}$  MEFs were used to quantify mRNAs for the indicated *Fanc* genes. For each gene, the amount in untreated  $p21^{-/-}$  cells was assigned a value of 1. Results from 3 independent experiments. Means + s.e.m. are shown, and \*P  $\leq 0.05$ , n.s. : not significant by Student's *t* test.



A	1/6	0	0	1/6	0	1/6	1/4	1/4	1/4	1/4	0	1/6	0	1/3	1	1
С	1/6	1/6	1/6	1/2	0	1/6	1/4	1/4	1/4	1/4	0	1/6	1/6	0	0	0
G	1/3	5/6	5/6	1/3	1	2/3	1/4	1/4	1/4	1/4	0	0	1/3	2/3	0	0
Т	1/3	0	0	0	0	0	1/4	1/4	1/4	1/4	1	2/3	1/2	0	0	0

	CDE (4bp) CHR	PFM Score
B-myb	TGGCGGGAGATAGGAA	15.66
Cks1	GGGCGGTGTGTTTGAA	17.09
Cyclin B2	<b>CGGCGC</b> GGTA <b>TTTGAA</b>	14.39
Plk4	<b>GCGGGA</b> ATTT <b>TTCAAA</b>	10.16
Tome-1	TGGAGGGAAGTTTGAA	14.89
Fancd2	AGC GGG AAAGTCGAAA	10.16
Fanca (-13)	CCGCGGCCAATCGGAA	11.69
Fancb (+105)	<b>GGGCGG</b> GAGG <b>TTTGGA</b>	11.73
Fanci (+39)	AGCGGGAATTTTGGAA	12.96
Fancm (-23)	CGGCGGGTTCTTTAAC	9.9
Fancn (-606)	CCGGGCCCTTTTTAAA	10.72
Fanco (+614)	<b>GGAAGG</b> TGGC <b>TTTAAA</b>	9.6
Fancr (+16)	TGGCGGGATTTCCGAA	13.82
Fancs (-113)	GGGGGGGGGGTGCTGAA	9.63
Fanct (+484)	<b>CGCAGG</b> CATG <b>TTGAAA</b>	11.13

Supplementary Figure 7. For most *Fanc* genes regulated by p53, a candidate CDE/CHR motif maps less than 500 bp away from the E2F4 binding site identified in chromatin immunoprecipitation assays.

On top, the sequence of 6 functional CDE/CHR motifs (from the mouse genes *Cyclin B2, Cks1, Plk4, B-myb, Tome-1* and *Fancd2*) were used to define a positional frequency matrix (PFM), and the 6 motifs were then evaluated with the PFM. Scores from 10.16 (*Plk4, Fancd2*) to 17.09 (*Cks1*) were obtained. The mean +/-2 SD for these scores is 13.7 +/-5.8. Scores of 10.8 (M – SD) and above are likely to be good CDE/CHR candidates, whereas scores between 7.9 (M - 2SD) and 10.8 would be weaker candidate motifs. Below, the same PFM was used to analyze sequences less than 500 bp away from the center of the amplicon used in ChIP experiments for each gene. Candidate CDE/CHR were found for 9 out of 11 genes, with PFM scores from 9.6 (*Fanco*) to 13.82 (*Fancr*); values within a similar range to that observed for the first 6 genes. Number in parentheses are position relative to TSS.



Supplementary Figure 8. The mRNAs for Fanci and Fancr are decreased in bone marrow cells of  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  mice.

Fanci and Fancr mRNAs were quantified from the bone marrow cells of 9 WT and 6  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  mice. mRNAs were quantified using real-time PCR, normalized to control mRNAs, then the mean amount in WT cells was assigned a value of 1. Means + s.e.m. are shown, and \*P  $\leq$  0.05 by Student's *t* test.



### Supplementary Figure 9. p53 activation leads decreased Fanci and Fancr protein levels.

(a) Identification of Fanci- and Fancr-specific bands in western blots. Protein extracts were prepared from wild-type (WT) MEFs, or NIH3T3 (3T3) cells transfected with either an empty vector, a Fanci expression vector or a Fancr expression vector, then immunoblotted. The membrane was cut at 70 kDa; the upper part of the membrane was immunoblotted with an antibody against Fanci, and the lower part with an antibody against Fancr or actin. The upper blot indicates that Fanci is detected as a faint band at ~170 kDa, and the lower blot that Fancr is detected as a strong band at ~40 kDa. In subsequent Fanci western blots, the membranes were cut at around 150 kDa before incubating with the Antibody, to optimize the detection of Fanci specific bands. (b) Protein extracts, prepared from untreated or Nutlin-treated MEFs, were immunoblotted with antibodies against Fanci (upper blot), Fancr (middle blot) and actin. The Fanci and Fancr western blots are uncropped versions of the blots shown in Fig. 4b, and the actin already shown in Fig. 4b is shown again for reference.



Supplementary Figure 10. The p53-dependent downregulation of several *Fanc* genes also occurs in response to DNA damage.

(a) Upon DNA damage, p53 activation leads to decreased Fanci and Fancr mRNA and protein levels. On the left, mRNAs were quantified in  $p53^{-7}$ , WT and  $p53^{\Delta31/\Delta31}$  MEFs, untreated or treated with 0.5  $\mu$ M Doxorubicin for 24 hr. Results from  $\geq$  3 independent experiments. On the right, protein extracts, prepared from untreated or Doxorubicin-treated MEFs, were immunoblotted with antibodies against Fanci, Fancr and actin. Doxorubicin led to wild-type p53 protein accumulation, and even more so  $p53^{\Delta31}$  accumulation (see Supplementary Fig. 5). On the opposite, Fanci and Fancr protein levels were decreased in WT and  $p53^{A31/\Delta31}$  doxorubicin-treated MEFs. (Note that for actin, this blot is the same as shown in Supplementary Fig. 5). (b) Additional *Fanc* genes with a p53-dependent decrease in mRNA levels upon Doxorubicin treatment. mRNAs were quantified in  $p53^{-7}$  and WT MEFs, untreated or treated with 0.5  $\mu$ M Doxorubicin for 24 hr. Results from 2 independent experiments. In all figures, means + s.e.m. are shown, and \*\*\*P  $\leq$  0.001, \*\*P  $\leq$  0.01, \*P  $\leq$  0.05, n.s. : not significant by Student's *t* test.



**Supplementary Figure 11. Transcriptome data mining supports the conclusion that DNA damage leads to a p53-dependent downregulation of several** *Fanc* genes. From the transcriptome data of Younger *et al.*<sup>4</sup> (Gene Expression Omnibus accession number GSE55727), we

From the transcriptome data of Younger *et al.* <sup>7</sup> (Gene Expression Omnibus accession number GSE55727), we extracted the values for the expression of 12 *Fanc* genes (*Fanca, Fancb, Fancol, Fancd2, Fanci, Fancj, Fancm, Fanco, Fancr, Fancs, Fanct*) in untreated or doxorubicin-treated (Doxo) WT and  $p53^{-/-}$  (KO) MEFs. For each gene, the ratio of Doxo/untreated mRNA levels was calculated from duplicate (KO) or triplicate (WT) values. The calculated ratios were then plotted, with each point corresponding to a single *Fanc* gene. Although the short treatment with Doxorubicin (6h) most probably accounts for a partial downregulation of *Fanc* genes in WT MEFs, the effects of Doxorubicin were significantly different in  $p53^{-/-}$  and WT MEFs, with an overall increase in expression for the tested *Fanc* genes in  $p53^{-/-}$  MEFs, and an overall decrease in WT MEFs. Scatter dot plots and means + s.e.m. are shown, and \*\*\*P  $\leq 0.001$  by Student's *t* test.



Supplementary Figure 12. Transcriptome data indicate that the myeloid differentiation of hematopoietic cells correlates with p53 activation and the downregulation of 12 *Fanc* genes.

From the transcriptome data of Muntean *et al.* <sup>5</sup> (Gene Expression Omnibus accession number GSE21299), we extracted the robust-multi average (RMA) values for the expression of *Cdkn1A/p21*, *Mdm2*, *Fas*, and 12 *Fanc* genes (*Fanca, Fancb, Fancd1, Fancd2, Fanci, Fancj, Fancm, Fancn, Fanco, Fancr, Fancs, Fanct*) in Hoxa9-ER expressing cells grown in the presence of tamoxifen (4-OHT), or 5 days after 4-OHT withdrawal (a treatment leading to myeloid differentiation <sup>5</sup>). For each gene, the inverse of Log<sub>2</sub> were calculated from RMA values, and the average in cells with 4-OHT was given a value of 1. Cell differentiation correlated with the transactivation of *p21*, *Mdm2* and *Fas*, and the downregulation of *Fanc* genes. Data from triplicates. Means + s.e.m. are shown, and \*\*\*P ≤ 0.001, \*\*P ≤ 0.01, \*P ≤ 0.05 by Student's *t* test.



# Supplementary Figure 13. Effects of Mitomycin C on WT and $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$ MEFs.

mRNAs for p21 and Fancd2 were quantified using real-time PCR, in  $p53^{-/2}$  (KO), wild-type (WT) and  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  ( $\Delta 31$ ) MEFs left untreated or treated with 50 nM Mitomycin C for 48 hr, normalized to control mRNAs, then the amount in unstressed WT cells was assigned a value of 1. Results from  $\geq 2$  independent experiments. Means + s.e.m. are shown, and \*P  $\leq 0.05$ , n.s. : not significant by Student's *t* test.



Supplementary Figure 14.  $Mdm2^{+/-}Mdm4^{+/\Delta E6}$  cells exhibit a decreased capacity to repair mitomycin C-induced DNA lesions.

Because  $Mdm2^{+/-}$  and  $Mdm4^{+/\Delta E6}$  mice express lower levels of p53 inhibitors, they exhibit an increased p53 activity while expressing a WT p53 protein <sup>6,7</sup>.  $Mdm2^{+/-}$  and  $Mdm4^{+/\Delta E6}$  mice were intercrossed to generate  $Mdm2^{+/-} Mdm4^{+/\Delta E6}$  MEFs. (a) mRNAs for Fancd2 were quantified using real-time PCR, in unstressed  $p53^{-/-}$  (KO), wild-type (WT) and  $Mdm2^{+/-} Mdm4^{+/\Delta E6}$  (M2 M4) MEFs, normalized to control mRNAs, then the amount in WT cells was assigned a value of 1. Results from 3 independent experiments. (b) The frequencies of total chromosomal aberrations, or tri- and quadri-radial chromosomes, were determined in wild-type and  $Mdm2^{+/-} Mdm4^{+/\Delta E6}$  MEFs at passage 3, untreated or after treatment with mitomycin C (MC). Results were plotted from 115 (WT untreated), 103 (WT MC-treated), 97 (M2 M4 untreated) and 47 (M2 M4 MC-treated) metaphases. To prevent any potential bias, cell preparations were dropped onto code-labelled slides (to mask the genotypes of cells to be analyzed) and the same metaphases were independently observed by two experimenters. (c) A similar procedure was used to determine the percentage of chromosomes presenting sister chromatid exchange(s) (SCEs) after treatment with MC. Results were plotted from an analysis of 2059 (WT untreated), 627 (WT MC-treated), 1788 (M2 M4 untreated) and 647 (M2 M4 MC-treated) chromosomes. In all figures, means + s.e.m. are shown, and \*\*\*P  $\leq 0.001$ , \*P  $\leq 0.05$  by ANOVA or Student's *t* tests.

а	CDE (4bp) CHR	PFM Score
FANCA (-384)	GGGCGGTGTTTCGGCA	9.33
FANCB (+15)	TGGCGGGAGGTTTGGA	11.73
FANCD1 (-438)	<b>GGGCTG</b> TTAT <b>TTGAAA</b>	10.20
FANCD2 (+21)	<b>GGCGGG</b> AAAG <b>TCGAAA</b>	11.02
FANCI (+57)	AGCGGGCTTTTTGGAA	12.96
FANCJ (-377)	AGC TGG GTAATTTAAA	8.73
FANCM (+6)	<b>CCGATG</b> GGGA <b>TCGGAA</b>	4.91
FANCR (+8)	<b>TGGCGG</b> GAAT <b>TCTGAA</b>	15.25
FANCT (-550)	GGGTGGCAGTTTGGAA	12.13
b	CDE (4bp) CHR	
Fancd2 (+23) FANCD2 (+21)	AGCGGGAAAGTCGAAA GGCGGGAAAGTCGAAA	
Fanci (+39) FANCI (+57)	AGCGGGAATTTTGGAA AGCGGGCTTTTTGGAA	
Fancr (+16) FANCR (+8)	TGGCGGGGATTTCCGAA TGGCGGGAATTCTGAA	

## Supplementary Figure 15. Candidate CDE/CHRs in human FANC genes downregulated by p53.

(a) Candidate CDE/CHRs are found close to the TSS of the 9 *FANC* genes downregulated by p53. Sequences surrounding the TSS of each indicated *FANC* gene were analyzed as described in Supplementary Fig. 5. Numbers in parentheses indicate positions relative to the TSS. (b) The CDE/CHR motifs identified in the murine *Fanc* genes are well conserved in their human homologs. A strong conservation is observed between the 3 murine CDE/CHRs that we tested in luciferase assays (*Fancd2*, *Fanci*, *Fancr*) and their human counterparts (*FANCD2*, *FANCI*, *FANCR*).



Supplementary Figure 16. The p53-mediated downregulation of FANCD2, FANCI and FANCR relies on CDE/CHR motifs.

(a) Increased E2F4 binding at the FANCD2, FANCI and FANCR promoters upon p53 activation. ChIP assay for E2F4 binding was performed in Nutlin-treated SV40-MRC5, and untreated or Nutlin-treated MRC5 human fibroblasts, with an antibody against E2F4, or rabbit IgG as a negative control. For each gene, immunoprecipitates were quantified using real-time PCR with primers flanking the candidate CDE/CHR, fold enrichment were normalized to data over an irrelevant region, then E2F4 binding at the promoter in untreated MRC5 cells was given a value of 1. Data are from 2 independent ChIP experiments, each quantified in triplicates. (b) The p53-dependent regulation of FANCD2, FANCI and FANCR occurs via a CDE/CHR motif. On top, the sequences for the candidate CDE/CHR motifs and their mutated couterparts are shown. Below, for each gene a 1 kb fragment centered around the TSS site, containing a WT or mutant CDE/CHR, was cloned upstream of a Luciferase gene and transfected into NIH-3T3 cells, treated or not with Nutlin, then Luciferase activity was measured after 24 hours. Nutlin led to decreased luciferase activity with the construct containing a WT CDE/CHR motif. Mutation of the putative CDE site increased Luciferase basal expression, and fully (FANCD2, FANCR) or partially (FANCI) abrogated the effect of Nutlin. Results from 2 independent experiments, each in duplicate. In all figures, means + s.e.m. are shown, and \*\*\*P  $\leq 0.001$ , \*\*P  $\leq 0.01$ , \*P  $\leq 0.05$ , n.s. : not significant by Student's t test.





mRNAs were prepared from human diploid lung fibroblasts (MRC5) and their SV40-transformed derivative cells (SVM), untreated or treated with Doxorubicin for 24 h, and the mRNAs for the 3 indicated *FANC* genes were quantified using real-time PCR, normalized to control mRNAs, then the amount in untreated MRC5 cells was assigned a value of 1. For each gene, results are from 3 independent experiments. Means + s.e.m. are shown, and \*\*\*P  $\leq 0.001$ , n.s. : not significant by Student's *t* test.



# Supplementary Figure 18. The CDE/CHR motif in *FANCD2* is important for the downregulation of its expression in response to DNA damage.

The Luciferase reporter plasmids containing a FANCD2 promoter region with a WT or mutant CDE/CHR motif (for details, see Supplementary Fig. 16) were transfected into NIH-3T3 cells, treated or not with Doxorubicin, then Luciferase activity was measured after 24 hours. Results from 2 independent experiments, each in duplicate. Means + s.e.m. are shown, and \*\*\*P  $\leq 0.001$ , n.s. : not significant by Student's *t* test.



Supplementary Figure 19. Transcriptome data mining supports the conclusion that DNA damage leads to a p53-dependent downregulation of several *FANC* genes.

From the transcriptome data of Younger *et al.*<sup>4</sup> (Gene Expression Omnibus accession number GSE55727), we extracted the values for the expression of 9 *FANC* genes (*FANCA*, *FANCB*, *FANCD1*, *FANCD2*, *FANC1*, *FANCD*, *FANCD*, *FANCD7*, *FANCD7*) in untreated or doxorubicin-treated (Doxo) WT human fibroblasts. For each gene, the ratio of Doxo/untreated mRNA levels was calculated from 2 cell lines, each analyzed in duplicates. The calculated ratios were then plotted, with each point corresponding to a single *FANC* gene. Scatter dot plot and mean + s.e.m. are shown. Treatment with Doxorubicin, for 12 h in these experiments, led to a ~ 2-5 fold decrease in *FANC* mRNA expression.



Supplementary Figure 20. p53 activation leads to the downregulation of *BLM*, *DEK*, *FEN1* and *TIMELESS* in human cells.

(b) mRNAs were prepared from human diploid lung fibroblasts (MRC5) and their SV40-transformed derivative cells (SVM), untreated or treated with Nutlin, and mRNAs were quantified using real-time PCR, normalized to control mRNAs, then the amount in untreated MRC5 cells was assigned a value of 1. For each gene, results are from 3 independent experiments. In addition to those 4 genes, *RECQL4* was already reported to be downregulated in human cells upon p53 activation <sup>8</sup>. Means + s.e.m. are shown, and \*\*\*P  $\leq 0.001$ , \*P  $\leq 0.05$ , n.s. : not significant by Student's *t* test.



Supplementary Figure 21. Liver cancer progression correlates with a decreased expression of p53-transactivated genes and an increased expression of several *FANC* genes.

*TP53* mutations are known to arise at later steps of hepatocarcinogenesis<sup>9</sup>. Analysis of transcriptome data from Wurmbach *et al.*<sup>10</sup> with the Oncomine software indicates that liver cancer progression correlates with a decreased expression of p53-transactivated genes (e.g. *CDKN1A, BCL3*), and an increased expression of several *FANC* genes (*FANCD1, FANCD2, FANCI, FANCJ, FANCT*), telomere related genes (e.g. *DKC1*), and genes already known to be repressed by E2F4 in a p53-dependent manner (e.g. *BIRC5*).



Supplementary Figure 22. The progression of adrenocortical carcinomas correlates with a decreased expression of p53-transactivated genes and an increased expression of FANC genes. *TP53* mutations are known to occur in aggressive adrenocortical tumors <sup>11</sup>. Analysis of transcriptome data from Giordano *et al.* <sup>12</sup> with the Oncomine software similarly indicates that the progression of adrenocortical tumors correlates with a decreased expression of p53-transactivated genes (e.g. *CDKN1A, FAS*), and an increased expression of several *FANC* genes (*FANCA, FANCD1, FANCD2, FANCI, FANCR, FANCT*).



Supplementary Figure 23.  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  MEFs reveal the impact of increased p53 activity on telomere metabolism and / or DNA repair.

This cartoon summarizes data from the present study and Supplementary ref. 2.

Sup	plemen	tarv	Tables
~ up	promon		1 40100

Supplementary	1 40103	
Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
Acd/Tpp1	GAGCTGGTGCAGGCTGTGT	CATCCTCCAGGGTTAGGTACTTTC
Apollo/Snm1b	AATTGGGCAAGAAACCATGACT	TGACAGAACCAGGGCAGTGA
Arp	ATCTGCTGCATCTGCTTG	CGACCTGGAAGTCCAACTAC
Artemis/Snm1c	AAACAAAACTGCACTCCACACAA	TCCTCTCTCCAAACCACATGGT
Blm	TGTGATTCATGCATCTCTTCCTAAA	CAGCTCGGCCGGATTCT
C16orf57/Mpn1/Usb1	GGACAGTGCCTGCAGGAACT	CGTAACAGCATCTCAGAGTCTTCAA
Ciaol	GCTTCCACACCAGGACCATT	AGCCAAGGCCCCTGTCA
Coilin	AACCTGAGAAGCCATCAGATCTG	CAACCCTGTGTCTGCTTGTGA
Csb/Ercc6	AGCCGCTGATTACAAAATACAATG	CCCGTGTGGTCAGAAGAAAGA
Dek	CAGCAGTGACAGCGCAGAGT	GGCAAAGCAGAACTGGACAGT
Dna2	GACAGCAGCTGCGGATCAT	CCTCAACCATCCCAACAGAAG
Dnmt3b	CACTCTGCTCACCCACATGCT	AGACGATCTAGGTGGAGCTTCCT
Ercc3/Xpb	CGGCGGGTTCTGACTATTGT	CAAGGGTTGCAGTCAAACCA
Ercc4/Fanca/Xpf	GGGACGGCCCGAAGAG	TTGTTTGGAGCGGCTTTTG
Fanca	CTGCCCTGCGCAACTGT	TGGAATGTGAAACACGTACCTTTT
Fanch	CCCTGAGGAAAACTTACCAGACAAT	TGGCACCATGTCTGCTCTACA
Fance	CGGCCGCGGGAAAA	GCACAGCCTCACGGAACTTT
Fancd1/Brca2	TCCCCCCTACCATCAGTTTG	CAGTGGTAGAGTTTGACTTCGTTCTT
Fancd2	TGGGTACTCTCAAAAACCGAGACT	GGAAGAGGGATCCTGGGAAA
Fance	GCTGCTGCGAAGGGATGT	GACAGCTTCTGGTCAATGGAGAA
Fancf	AGGACATGCCCTGGGAAGA	CTGGGCATGGCACAAGCT
Fanca	TGCTCAACCGTACCTCGTCTCT	TCCTGGCATTTTCCCACAAG
Fanci	TCGTGGTGGCCAAAGTGTT	CCAAAGGTGGAATTTCTTGAAGA
Fanci/Rach1/Brin1	TCTGCTAAACAAGGAAACAACCAA	TGTCCCCCGTGATCTTTCTT
Fancl	AATCTGTTATGCCCGTCACC	TCTGTCTGCTGGTGCTCAAC
Fanem	GCAGAACGTGTCCAAGATTG	GCGGAGCCTTTTCTGATGTT
Fanon/Palh?	CTEGTEATEACAETEAAAAACCAA	CAGGCCAAGCATAGCTTTTATATCT
Fance/Pad51a	CIGOTOATOACAOTOAAAAOCAA	GGGTATGCTCTTGCTCCAGAA
Fance/Pad51	AGTGGAGGCTGTTGCTTATGC	CTTTGGCTTCACTAATTCCCTTAATATT
Fance/Rugal		
Fancs/Brca1		
Fanci/Ube2t		
reni Carl/Malal	COCAAAOTOOCCATCOAT	
Gar1/Nota1		
	AGGACCCTGAATGGAGACAAAC	
10p1/Narfi		
Lmna/Progerin	GGCCCTGGGAGAGGGCTAAG	
Mip18	TTOTA ACCOCCACACAGI	
Mms19		AGGULACIAGIGIGGIILAGAAA
Nafl	GATTCAAGGCCGCAAAAAAC	
Nbs1	CGGACCCTCACTGTGGAAAA	
Objc1/Stn1	CAGCAGAAGATCTACCACATCATTAAG	TGGCAGCCCTTCTCCATATG
Parn	CCIGGIGAAIGIIGGCAAGIC	
PimI	GCCIGICCCIGAGACCAICA	
Potla	IGGCIAGAGIGCCICCICAAG	GGTAGCAAATTCGTCGCTCTGT
PotIb	CCTGGGCAAAGCACAAGTG	
Ppia P 1/T (2)	CAGIGCICAGAGCICGAAAGIIT	
Rap1/Terf2ip	GAAGGACGATGACGACACGAA	GAGCAACGTTCTGAGCTCCAA
Recql4	GGTGCTGGAAAGTCTCTGTGCTA	GGGCTTCGCTGGGCATA
Ruvbl1	AGGCAAGGCAGGTGTGACA	GGACGTACTCTTCAGCTTCAAGGT
Ruvbl2	TGCTGGAGATGATCCGAGAAG	TGGCTGGCCTGCAATGA
Sbds	ACGACCAGACTGAAATCTGCAA	TGCCGTTCTTTATCTGACACTTG
Slx4/Fancp	AAACCGTTCCTCACCACCAA	TCCTCACCGCACACTGCTT
Tenl	AAGGAAGCACACTGCGAACA	GGGAGCGTGCCATGTCAT
Terf2	GGTGAAGACAGGTCATCCAGTTT	ACCCACTCGCTTTCTTCTATGG
Timeless	CGTCTCCTTTGGGCAATTCA	CTGGACAGGAAGAGGAGCAAGT
Tnks1	GCCGGCCGAAAGTCTTCT	CAACATCCTTCCTTCCAAAACC
Tnks1bp1	CTGAGATCCTTGATAGTGCCATGT	GCCCCCGCTTACGTCCTA
Upf1	GGGCCCAGTGGTGATGTG	CTCGAAGAGCGATTGTGACAGT
Wrn	ACGGTGTCTCTGAAGGCAAAG	TGACAGAAATGTTTGATGACTTCCA

**Supplementary Table 1. DNA sequences for primers used in mouse RT-qPCR experiments.** The primers for *Arp* and *Ppia* were used for normalizations.

Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
BLM	GAGGCAGCAGCTGAATCATCT	GCTTCTGGGTTTCGTGTTATGC
DEK	CATTGCCGAAATCTAAAAAAACTTG	CCTTGCCATTCCAGAACTGTTC
FANCA	CCGAGAGGTGTTGAAAGAGGAA	GGCATGATGCAGGAGAAGGA
FANCB	CAAATCCTTTCCCAGCACCAT	GACCCTTTTTGCTTCCAATCC
FANCD1/BRCA2	ACCATATTTACCATCACGTGCACTA	TGCACCATCTTGCAAAGCA
FANCD2	AGACTGTCAAAATCTGAGGATAAAGAGA	TGGTTGCTTCCTGGTTTTGG
FANCI	CAGGCAACCCTACCAAATCAG	GCAGAGTTCCCAGTTGCATGA
FANCJ/BACH1/BRIP1	AACAGTTGACATCTACCCAAGAAATCT	TCAGTGGAATGCAGCACCAA
FANCM	TGGAGACTGTGGCAAGATCATC	GCGGCATCGATCTGAGTGA
FANCN/PALB2	CCGGTTGTAAAGAGCCATGTATC	ATCCAGAGCTTTCCAAAGAGAAAC
FANCO/RAD51C	GTGGCAGGTGAAGCAGTTTTTA	GCAAGGTCTACCACTCTATCAACCA
FANCR/RAD51	TGGGAGATGCCAAAGACTGAA	AGGCTGCAGCACTTAAGGTTTT
FANCS/BRCA1	TGGTGCGATCATGAGGCTTA	TGAGGTGATAGGATCGCTTGAG
FANCT/UBE2T	GGGATCATGCAGAGAGCTTCA	GGGTGGCTCTGTGGCTAACA
FEN1	CGGGCTGTGGACCTCATC	TCAAGTCGCCGCACGAT
PPIA	CAAATGCTGGACCCAACACA	TGCCATCCAACCACTCAGTCT
RPLP0	CTTGTCTGTGGAGACGGATTACAC	TACGCCAAGAAGGCCTTGA
TIMELESS	CTGGCCCATGACCTCAAAAT	CGATTGAAGAGGCAGAAGACTGA

**Supplementary Table 2. DNA sequences for primers used in human RT-qPCR experiments.** The primers for *PPIA* and *RPLP0* were used for normalizations.

Mouse Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
Fanca	CAGACTCCGGGACAAGTACTACAA	GAGGGCGGACCCTTGCT
Fancb	CCTCGGCCATGGTCACA	GAAGGAGCGACGGGTACAAC
Fancd1/Brca2	ACATGCTAGCCGGGAACAG	AGTGCCACCGGGAAGTCA
Fancd2	CGTCAGAGCGCCGTTCTT	GCCAGTTGCTTCCCTTCGT
Fanci	TGGGAAGAGAGGCCATTGAC	TCGACAGTGCACGTCTTGAGT
Fancj/Bach1/Brip1	TCGTACTCGCGAGCTTTCCT	CGGCTGACGTTTGACAGAAG
Fancm	CGCATGCGCTTCTTCTGA	TGCGGCGGGAAGATGAT
Fancn/Palb2	ACGAAGCATCTCTAAGTCATCCAA	TCCCGGCTGCACTGGTT
Fanco/Rad51c	CAGGCCTGCCGACATGA	ACTCCGGAGCTCCCTCAGA
Fancr/Rad51	GTGATGACGTTGCAGCGATAG	GGCGCGCGACTTTCG
Fancs/Brca1	TGGATCTTGTGTTCCGAAAGG	TCTCCGTCGCCAAGGAAAC
Fanct/Ube2t	CCCAGCTCACAGTCGATTTACA	CGCGTATCCGGAATTCTCA
Rtel1	Primer a : AGCATTTAGGCGTGGCTACAC	Primer b : CCGCAGTCCGCTGATTG
(see details in Supp. Fig. 2)	Primer c : ACCTGGCCCAACAGTTATGG	Primer d : GCATCACAAGCCCAACACAA
Human Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
FANCD2	TGCCCGGCTAGCACAGA	CCCAGCTGAAGGCAATAAGC
FANCI	GGGCGGATCTTGTTGTTACG	TCCAAAAAGCCCGCTCAA
FANCR/RAD51	CCCCGGCATAAAGTTTGAATT	CTTGATCCTGCGCGAGTTTAC
NUSAP1	CCGTCACCTTTTGCATTCCT	GGCTTGGACAGCTGGTGAA

**Supplementary Table 3. DNA sequences for primers used in ChIP experiments.** The primer set (c,d) for *Rtel1* and the primers for *NUSAP1* were used for normalizations.

# **Supplementary References**

- 1. Vassilev, L.T. et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **303**, 844-848 (2004).
- 2. Simeonova, I. et al. Mutant Mice Lacking the p53 C-Terminal Domain Model Telomere Syndromes. *Cell Rep* **3**, 2046-2058 (2013).
- 3. Lee, B.K., Bhinge, A.A. & Iyer, V.R. Wide-ranging functions of E2F4 in transcriptional activation and repression revealed by genome-wide analysis. *Nucleic Acids Res* **39**, 3558-3573 (2011).
- 4. Younger, S.T., Kenzelmann-Broz, D., Jung, H., Attardi, L.D. & Rinn, J.L. Integrative genomic analysis reveals widespread enhancer regulation by p53 in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res* **43**, 4447-4462 (2015).
- 5. Muntean, A.G. et al. The PAF complex synergizes with MLL fusion proteins at HOX loci to promote leukemogenesis. *Cancer Cell* **17**, 609-621 (2010).
- 6. Montes de Oca Luna, R., Wagner, D.S. & Lozano, G. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* **378**, 203-206. (1995).
- Bardot, B. et al. Mice engineered for an obligatory Mdm4 exon skipping express higher levels of the Mdm4-S isoform but exhibit increased p53 activity. *Oncogene* 34, 2943-2948 (2015).
- Sengupta, S. et al. Tumor suppressor p53 represses transcription of RECQ4 helicase. *Oncogene* 24, 1738-1748 (2005).
- Woo, H.G., Park, E.S., Thorgeirsson, S.S. & Kim, Y.J. Exploring genomic profiles of hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 50, 235-43 (2011).
- 10. Wurmbach, E. et al. Genome-wide molecular profiles of HCV-induced dysplasia and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **45**, 938-947 (2007).
- 11. Ragazzon, B. et al. Transcriptome analysis reveals that p53 and {beta}-catenin alterations occur in a group of aggressive adrenocortical cancers. *Cancer Res* **70**, 8276-81 (2010).
- 12. Giordano, T.J. et al. Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. *Clin Cancer Res* **15**, 668-676 (2009).

DISCUSSION

# I. Les altérations de p53 et leurs effets sur la tumorigenèse

# I.A. Perte de fonction de p53

# I.A.1. Conséquences de la délétion de Trp53

Chez la souris, la perte d'expression du gène Trp53 a démontré le rôle de p53 dans la suppression des tumeurs spontanées et induites. Les souris p53<sup>-/-</sup> (p53<sup>KO</sup>) invalidées pour le gène Trp53 développent des tumeurs spontanées avec une pénétrance complète et meurent majoritairement entre 2 et 9 mois (âge moyen de survie de 6 mois) de lymphomes-T thymiques double-positifs CD4+ CD8+ et de quelques sarcomes <sup>113,243</sup>.L'incidence élevée de lymphomes thymiques observée chez les souris p53<sup>KO</sup> reflète l'accumulation de précurseurs lymphoïdes, ayant des réarrangements aberrants du récepteur TCR, à cause du défaut d'apoptose dans les thymocytes de ces souris <sup>244-246</sup>.Dans ce contexte d'allèles amorphes, la perte de p53 entraîne une série de mutations et une sélection d'événements conduisant à la progression rapide de tumeurs oligoclonales. Ainsi, p53 fonctionne comme un gardien de la stabilité génomique et sa perte entraîne le développement fréquent d'une hétérogénéité tumorale gouvernant la sélection de clones dominants. De plus, les souris hétérozygotes p53<sup>+/-</sup> montrent une survie diminuée et un développement tumoral accéléré par rapport aux souris p53<sup>+/+</sup>(p53<sup>WT</sup>), avec une latence médiane de 18 mois environ et une prépondérance de sarcomes. La moitié de ces tumeurs ont perdu l'allèle sauvage 247. La faible incidence des lymphomes thymiques chez les souris p53<sup>+/-</sup> pourrait découler du fait que le développement de ces lymphomes nécessite une perte d'hétérozygotie(Loss Of Heterozygosity ou LOH)dans une fenêtre de temps réduite (avant l'involution du thymus). D'autres tumeurs ne présentent pas de LOH, suggérant une haplo-insuffisance de p53 pour la suppression de ces tumeurs qui progressent malgré la présence d'une copie fonctionnelle de p53. En plus de la prédisposition des souris p53<sup>+/-</sup>etp53<sup>-/-</sup>à développer des tumeurs spontanées et induites, des invalidations conditionnelles et tissu spécifiques de Trp53 montrent que la perte d'activité de p53 est suffisante pour la progression d'autres types de tumeurs comme les cancers épithéliaux par exemple <sup>117</sup>.

# I.A.2. Conséquences d'unep53 hypomorphe

Environ15% des mutations faux-sens de *TP53* dans les tumeurs humaines entraînent l'expression d'une p53mutée ayantune activité partielle <sup>111</sup>.Certains de ces mutants retiennent uniquement quelques activités de p53 et c'est l'importance des fonctions qui sont affectées

qui dicte le devenir des tumeurs et leur réponseaux traitements. Certaines mutations au niveau du DBD affectent la liaison de p53 à des gènes cibles spécifiques mais pas à d'autres, comme la mutation R175P. Ainsi, le modèle murin exprimant la mutation équivalente R172P a permis de démontrer que la protéine p53<sup>R172P</sup>retient une activité partielle d'arrêt du cycle cellulaire associée à une induction résiduelle du gène p21, mais qu'elle est incapable d'induire l'apoptose en réponse aux dommages à l'ADN. Malgré une réponse apoptotique déficiente, la protéine p53<sup>R172P</sup> retient une capacité à réduire la tumorigenèse spontanée chez les souris p53<sup>R172P/R172P</sup>, probablement via l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition de l'instabilité génomique. Cependant, cette protéine hypomorphe est incapable de réduire la progression des tumeurs d'apparition tardive indiquant le rôle de l'apoptose dépendante de p53 dans ce processus. Des résultats similaires ont été obtenus avec des souris exprimant une p53 portant la mutation E177R, correspondant à la E180R humaine retrouvée dans des tumeurs humaines sporadiques et chez des patients Li-Fraumeni<sup>248</sup>.De plus, deux modèles murins délétés du domaine riche en proline ou PRD ( $p53^{\Delta P}$  et  $p53^{m\Delta pro}$ ) expriment des protéines hypomorphes et sont également résistants au développement de tumeurs précoces mais meurent finalement de tumeurs tardives. La protéine  $p53^{\Delta P}$  est incapable d'induire un arrêt du cycle cellulaire (induction de p21 très compromise) mais est compétente pour la réponse apoptotique <sup>42</sup>, alors que p53<sup>mApro</sup>présente des défauts également dans la réponse apoptotique aux stress génotoxiques<sup>44</sup>.

Deux autres modèles murins : p53<sup>25,26</sup> (inactivé pour le premier domaine de transactivation TAD1) et p53<sup>3KR</sup> (muté pour les 3 lysines acétylées du DBD de la p53 murine) expriment des p53 hypomorphes incapables de transactiver les principaux gènes cibles de p53 en réponse aux dommages à l'ADN mais retiennent une activité de suppression tumorale. Ces modèles ont ainsi permis de démontrer que la capacité de p53 à induire l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose en réponse aux dommages de l'ADN n'est pas essentielle pour la suppression tumorale, et que d'autres réponses peuvent jouer un rôle anti-tumoral comme la régulation du métabolisme par exemple <sup>117</sup>.Le modèle p53<sup>3KR</sup> a également permis de montrer le rôle de l'acétylation des lysines du DBD (notamment la lysine 120) dans l'induction des réponses canoniques de p53 (l'arrêt du cycle, l'apoptose et la sénescence) <sup>51,52</sup>.

Tous ces modèles exprimant une p53 hypomorphe ont permis de montrer qu'une perte, même partielle, de certaines activités de p53 peut avoir un effet sur la tumorigenèse et que les différentes réponses p53-dépendentes sont régulées différemment et participent à sa fonction de suppression tumorale selon le contexte et les tissus.

Par ailleurs, grâce à une étude détaillée du modèle murin  $p53^{\Delta P}$ (Article n°1),nous avonspu montrer que la protéine p53<sup> $\Delta P$ </sup> est incapable d'empêcher la progression tumorale dans un contexte oncogénique comme la perte d'une copie du gène  $Rb^{249}$ . Plus encore, nous avons montré que les stratégies ciblant MDM4, un inhibiteur de p53, ne sont pas efficaces pour la suppression des tumeurs thyroïdiennes dans ce contexte (à l'inverse des tumeurs hypophysaires par exemple). Cette étude nous a également permis de démontrer l'importance de la répression de certains gènes par p53 dans la suppression des tumeurs thyroïdiennes, impliquant un intérêt à rétablir cette répression pour le traitement efficace de ce type de tumeurs. Les thérapies visant à inhiber MDM4 devraient donc prendre en compte le statut de p53 dans les tumeurs ciblées mais également l'étendue et la spécificité de l'activitéde p53. Notre étude suggère que cette stratégie peut être inefficace pour la réactivation d'une p53 hypomorphe dans certaines tumeurs. Sachant que les mutations qui invalident (partiellement ou complètement) les fonctions de p53 sont plus fréquentes que la perte complète du gène TP53, les thérapies visant à restaurer ces fonctions doivent êtremultifactorielles et adaptées au type de tumeur, au contexte cellulaire et au statut de p53 ainsi qu'aux réponses qu'elle induit (arrêt du cycle, apoptose, sénescence, etc.).

# I.B. Gain de fonction de p53

La prédominance de l'expression d'une protéine p53 mutée dans les cancers humains plutôt qu'une simple invalidation du gène entraînantuneperte de l'expression de la protéine suggère un avantage biologique sélectif pour la tumeur à exprimer une p53 mutée par rapport à la perte complète de p53. L'hypothèse est que cet avantage découle du gain de fonction conféré par l'allèle muté et qui se traduit par un effet antimorphe quand la protéine mutéeexerce un effet dominant négatif vis-à-vis de la protéine sauvage et/ou néomorphe quand la protéine mutée acquiert de nouvelles fonctions oncogéniques et promeut la tumorigenèse. Ces deux caractéristiques de l'allèle muté sont appelées « gain de fonction » ou GOF. Ceci explique pourquoi p53 a été considérée comme un oncogène à sa découverte par des expériences de surexpression d'une protéine qui s'est avérée mutée.

Les modèles murins exprimant l'équivalent de certaines des mutations « *hotspot* » de p53 (p53<sup>R175H</sup>, p53<sup>R273H</sup>, p53<sup>R248W</sup> et p53<sup>R248Q</sup>) ont permis de confirmer cet effet gain de fonction *in vivo*notamment par la prédominance de métastases et le développement de nouvelles tumeurs par rapport aux souris p53<sup>KO</sup>, avec des phénotypes et des spectres de tumeurs plus ou moins variés entre les modèles étudiés <sup>157</sup>.Même la mutation « *hotspot* »p53<sup>G245S</sup>qui a été considérée comme un allèle nul chez le modèle murin, entraîne

une légère diversification dans les sous-types de tumeurs des souris  $p53^{G245S/}$ -par rapport aux  $p53^{-/-}$ . Les différences dans la sévérité du phénotypesont inhérentes à chaque mutation : sa nature (structurale ou de contact), l'effet de la protéine exprimée et sa stabilité, mais dépendent également du modèle murin étudié (fond génétique, mutation du gène *Trp53* murin ou introduction de la séquence *TP53* mutée chez la souris humanisée ou « *hupki* », etc.).

J'ai créé le modèle murin exprimant la mutation p53<sup>Y217C</sup> équivalente à la mutation Y220C humaine qui est la 9<sup>ème</sup> mutation «*hotspot* »la plus fréquente dans les cancers humains (Article n°2, en préparation). Cette mutation est différente des autres mutations «*hotspots* » selon les études structurales,vu sa localisation à distance de la surface de contact à l'ADN. Cependant elle se traduit *in vivo* par des effets similaires aux autres mutants notamment le développement chez les souris p53<sup>Y217C/Y217C</sup> d'un large spectre de tumeurs. En effet ces souris développent des lymphomes thymiques très invasifs formant des métastases mais également des lymphomes dans d'autres organes que le thymus, comme les souris p53*hupki*<sup>R175H/R175H</sup>par exemple exprimant une autre mutation structurale. Notre étude des souris homozygotes p53<sup>Y217C/Y217C</sup> nous permet donc de postuler que la protéine mutée, qui est inactive pour les principales réponses anti-tumorales de p53 mais qui s'accumule dans les cellules et plus encore dans les tumeurs, a acquis de nouvelles fonctions oncogéniques et surtout métastatiques.

Plus encore, les souris p53<sup>Y217C/Y217C</sup> souffrent d'une létalité embryonnaire spécifique aux femelles et due au développement d'une exencéphalie à pénétrance élevée. Ce phénotype a été observé chez certaines femelles p53<sup>KO</sup> et est dû à un défaut de fermeture du tube neural durant l'embryogenèse par manque d'apoptose. Ce phénotype est encore plus sévère chez le mutantp53<sup>Y217C</sup> que chez lesp53<sup>KO</sup>, ce qui différencie cette mutation des autres mutations « hotspot »(voir Introduction IV.B.2). Un critère important à prendre en compte est l'effet du fond génétique sur le phénotype des souris. En effet, les premières p53<sup>KO</sup>étudiées par Donehower sont de fond génétique mixte (75% C57BL/625% 129/Sv) et présentent un spectre de tumeurs plus large que celui retrouvé dans nos cohortes et dans les autres études ultérieures<sup>113</sup>. Cet effet du fond génétique est confirmé par la purification de cette lignée sur fond 129/Sv, ce qui altère le spectre de certains types de tumeurs (mais pas les lymphomes) <sup>250</sup>. Dans notre élevage, les souris p53<sup>Y217C/Y217C</sup> et p53<sup>KO</sup> sont de même fond génétique puisqu'elles sont de fond purifié C57BL/6 (presque 100%). Cependant, une façon d'éliminer le risque d'influence du fond génétique sur nos observations, c'est de croiser les deux lignées entre elles afin d'analyser des souris issues des mêmes portées et qui sont de fond génétique identique. Ainsi le croisement des p53<sup>+/-</sup>avec des p53<sup>+/-</sup>Y217C nous permettra de comparer les

hétérozygotes entre eux mais également d'obtenir des souris p53<sup>Y217C/-</sup>. Il sera intéressant d'analyser ces dernières mais également de les croiser entre elles afin d'obtenir des p53<sup>Y217C/Y217C</sup> et p53<sup>-/-</sup>issues du même croisement parfaitement comparables.

Il me reste à déterminer par quels mécanismes cet effet néomorphe s'exerce sur le plan moléculaire et cellulaire et plusieurs hypothèses peuvent être proposées. Je vaisd'abord tester si la protéine p53<sup>Y217C</sup>est capable de transactiver de nouveaux gènes non induits par la p53<sup>WT</sup>et impliqués dansla promotion de la tumorigenèse et des métastases, comme cela a été montré pour d'autres p53 mutées. Je vais donc étudiersila p53<sup>Y217C</sup>est capable de régulerune panoplie de gènes candidats impliqués dans différentes réponses qui favorisent la tumorigenèse comme la prolifération cellulaire (Igflr, Egfr, Mcm6...), l'inhibition de l'apoptose (Nfkb2, Timm50...) ou la promotion de l'invasion (Pla2g16, Itgb4...)<sup>157,251</sup>. En effet, certaines p53 mutées peuvent reconnaître et lier des séquences d'ADN structurales spécifiques, comme les régions d'attachement de la matrice nucléaire (les MARs).De plus, l'induction de gènes régulateurs de la chromatine est un autre mécanisme transcriptionnel qui semble spécifique aux mutations gain de fonction de p53 etresponsable d'un changement global du contexte épigénétique des cellules mutées <sup>178</sup>. Je vais donc également tester l'induction par p53<sup>Y217C</sup> de ces régulateurs chromatiniens comme MLL1, MLL2 et MOZ. De même, le mécanisme responsable de la létalité embryonnaire sexe-spécifique pourrait découler de cette acquisition de nouvelles fonctions par la p53 mutée. Je veux ainsi tester si p53<sup>Y217C</sup> affecte par exemple l'expression (directement ou via des facteurs de transcription) de gènes liés à l'X impliqués dans le processus de fermeture du tube neural comme le gène *fbxl10* par exemple <sup>252</sup>. Dans ce contexte de multitudes de mécanismes probables d'action de lap53<sup>Y217C</sup>, il est intéressant de réaliser une étude globale d'analyse du transcriptome des cellules p53<sup>Y217C/Y217C</sup> comparé à celui des cellules p53<sup>WT</sup> et p53<sup>KO</sup> afin de détecter un grand nombre de gènes candidats et de potentiellement déterminer de nouveaux gènes régulés spécifiquement par p53<sup>Y217C</sup> impliqués dans ces différents processus.

Une autre hypothèse probable au vu de l'accumulation de la p53<sup>Y217C</sup> dans les cellules tumorales est que cette protéine mutée puisseinteragir avec de nouveaux partenaires et que ces interactions aberrantes favorisent la tumorigenèse. Certains de ces complexes font intervenir des facteurs de transcription comme NF-Y, VDR,SREBP,SP1 et ETS-1<sup>7</sup>, qui pourraient participer à la régulation de nouveaux gènes par la p53 mutée. Je vais donc tester par coimmunoprécipitation l'interaction de p53 dans les tumeurs p53<sup>Y217C/Y217C</sup> avec ces différents facteurs de transcription, mais également l'expression des gènes qu'ils régulent (comme *Plk2,Igfbp3etCyp24a1*). Je vais ensuite comparer le recrutement des facteurs identifiés aux promoteurs de leurs cibles par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) en présence de la p53<sup>Y217C</sup> ou de la p53<sup>WT</sup>. De plus,MRE11 est une nucléase inhibée directement par certaines p53 mutées et qui est responsable du phénotype d'instabilité génétique accrue conféré par ces protéines mutées. Cette instabilité est peut-être également favorisée par l'interaction directe de la p53 mutée avec TOP1 dont l'activité de recombinaison est ainsi augmentée de façon anarchique. Je vais également tester l'interaction de p53<sup>Y217C</sup> avec d'autres partenaires comme DAB2IP,inhibée dans le cytoplasme par certaines p53 mutées, favorisant l'infiltration des lymphocytes, ce qui rend cette protéine un candidat intéressant vis-à-vis du phénotype invasif conféré par la mutation p53<sup>Y217C</sup>. Si cette interaction est confirmée, il serait également intéressant de vérifier l'accumulation de la protéine p53<sup>Y217C</sup> dans le noyau mais également dans le cytoplasme par des expériences d'immunofluorescence.

Les partenaires qui semblent les plus impliqués dans cet effet de gain de fonction oncogénique, et plus précisément dans la promotion des métastases sont les autres membres de la famille p53 : p63 et p73. p63 et p73 forment des homotétramères ainsi que des hétérotétramères p63-p73, alors que la p53<sup>WT</sup>est incapable de lier p63 ou p73. Cependant, plusieurs p53 mutées dérivées de tumeurs humaines interagissent avec p63 et p73 et inhibent les activités anti-tumorales des isoformes TAp63 et TAp73, ou favorisent lesactivités oncogéniques des isoformes  $\Delta Np63$  et  $\Delta Np73$ . Ces interactions sont principalement liées aux capacités de ces protéines mutées à promouvoir les potentiels migratoire et invasif des cellules tumorales, puisque p63 et p73 régulent le processus métastatique, en partie via leurs activités transcriptionnelles. En effet, la perte fréquente de p63/p73 dans les cancers les plus agressifs, accélère la dissémination métastatique<sup>253</sup>. De plus, les souris p63<sup>+/-</sup> et p73<sup>+/-</sup> développent spontanément des tumeurs métastatiques et le complexe p63-p53mutée peut réguler des récepteurs tyrosine kinase contrôlant ainsi l'invasion cellulaire. Plusieurs observations suggèrent que ce dernier mécanisme pourrait jouer un rôle important dans la fonction oncogénique de p53<sup>Y217C</sup>. En effet, des études *in vitro* ont montré que la protéine mutée humaine p53<sup>Y220C</sup> lie p63 et p73 et inhibe latransactivation de certains gènes cibles de p53. De plus, l'interaction de la p53 mutée avec p63 et p73 intervient via le domaine de liaison à l'ADN (DBD) de ces trois protéines et est favorisée par les mutations structurales du DBD de p53 qui altèrent sa conformation (comme la Y220C). Je vais donc tester l'interaction de p53<sup>Y217C</sup> avec p63 et p73 ainsi que l'expression des gènes régulés par ces deux facteurs de transcription (comme Sharp1, Dicer1, Ccng2)indépendamment ou non de la p53<sup>Y217C7,55</sup>.

Concernant les souris hétérozygotes p53<sup>+/Y217C</sup>, leur survie est augmentée par rapport aux souris p53<sup>+/-</sup>(au jour de l'étude) mais leur spectre de tumeur semble plus large,
enconcordance avec d'autres mutations «*hotspots* » (comme le mutant p53<sup>R172H</sup>). Une hypothèse est que la protéine p53<sup>Y217C</sup> pourrait agir en inhibant la protéine sauvage notamment par séquestration de la p53<sup>WT</sup> au sein d'hétérotétramères inactifs ou par le recrutement d'inhibiteurs de p53 par exemple. Cependant, cette diversification dans le type de tumeurs et ce potentiel invasif peuvent être uniquement dus aux propriétés oncogéniques acquises par la protéine mutée indépendamment de la p53<sup>WT</sup>. En effet, au vu du phénotype tumoral agressif chez les souris p53<sup>Y217C/Y217C</sup>, nous ne pouvons trancher sur l'effet dominant négatif chez les souris p53<sup>+/Y217C</sup>.Ces dernièresdéveloppent souvent des ostéosarcomes (comme les souris p53<sup>+/R172H</sup>), modélisant ainsi le syndrome Li-Fraumeni dont souffre les patients portant la mutation germinale p53<sup>Y220C</sup>et présentant une forte incidence d'ostéosarcome. Ainsi, une thérapie ciblant spécifiquement cette p53 mutée a un intérêt dans le traitement de ces patients portant cette mutation spécifique.

Une autre particularité de ces souris hétérozygotes pour la mutation, est qu'elles survivent mieux que les souris p53<sup>+/-</sup>. Ce résultat semble surprenant au vu des effets oncogéniques de la protéine mutée. Une hypothèse est que chez les souris p53<sup>+/-</sup>, une pression de sélection s'exerce pour perdre l'allèle sauvage, ce qui conduirait au développement tumoral plusrapide chez ces souris et à leur mort plus précoce. Je vais donc évaluer par séquençage le phénomène de perte d'hétérozygotie (LOH) dans les différentes tumeurs p53<sup>+/Y217C</sup> et p53<sup>+/-</sup>mais également dans les cellules précancéreuses (dans les cellules de souris jeunes par exemple). Une autre hypothèse qui expliquerait la meilleure survie des souris p53<sup>+/Y217C</sup> est que la protéine mutée puisse interagir avec la protéine sauvage comme discuté ci-dessus, mais que cette interaction serait au contraire activatrice, notamment par le recrutement de cofacteurs de p53 par exemple (excluant l'effet dominant négatif). Cette hypothèse semble peu probable d'après nos résultats dans les cellules primaires qui ne montrent pas une meilleure activité de p53 dans les cellules p53<sup>+/Y217C</sup> par rapport aux cellules p53<sup>+/-</sup>. Ainsi, les observations chez les souris hétérozygotes sont encore préliminaires et portent à plusieurs interprétations qui restent à valider, mais leur étude est toujours en cours en raison de leur espérance de vie plus longue que celle des souris homozygotes. En effet, une observation préliminaire que nous commençons à relever est que les courbes de survie des souris hétérozygotes p53<sup>+/-</sup>et p53<sup>+/-</sup>y217<sup>C</sup> se resserrent vers la fin de leur vie.

Par ailleurs, l'accumulation de la protéine mutée p53<sup>Y217C</sup> dans les cellules et plus encore dans les tumeurs est probablement responsable de ces effets gain de fonction. Cette accumulationpeut résulter de la perte de la transactivation du gène cible codant pour son ubiquitine ligase MDM2. En effet, les niveaux transcriptionnels et protéiques de MDM2 sont

très faibles dans les fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) homozygotes pour la mutation, et non induits suite aux stress cellulaires. Le résultat est une moindre dégradation de la p53 mutée qui est donc stabilisée. Dans les cellules tumorales, nous suspectons un rôle de MDM2 mais également une possible participation d'autres protéines comme INK4A, PML et les chaperones HSP70 et HSP90 par exemple <sup>251</sup>. Pour ces dernières, il existe un inhibiteur, le Ganetespib, qui pourrait être utilisé pour réduire les niveaux de la protéine mutéeoncogénique.

### I.C. Stratégie thérapeutique ciblée

De nombreuses stratégies thérapeutiques anti-tumorales ont été développées pour activer p53 ou restaurer sa fonction. Une de ces stratégies consiste à introduirela p53 par des adénovirus. Le statut de p53 dans les tumeurs doit être pris en compte dans les thérapies qui entraînent une stabilisation de la protéine p53 (comme les chimiothérapies ou les antagonistes de MDM2 et/ou MDM4 par exemple) au vu des effets gain de fonction de la p53 mutéeque nous venons de voir. Une des stratégies prometteuses est d'induire, chez les protéines p53 mutées, présentes dans au moins40% des cancers humains, la conformation et la fonction de la protéine p53 sauvage. Unemolécule, PRIMA-1<sup>MET</sup> (APR-246), actuellement en essai de Phase I, semble agir ainsi en se liantauxp53<sup>R175H</sup>et p53<sup>R273H</sup>et modifiant leur groupe thiol. Cependant ce composé peut induire une mort cellulaire indépendamment de p53 et il n'est pas exclu qu'il puisse également se lier à la p53<sup>WT</sup>, ce qui peut induire une cytotoxicité secondaire. Ces limites justifient l'intérêt d'une stratégie qui cible spécifiquement la p53 mutée sans interférer avec la protéine sauvage.De plus, des composants comme le NSC319726, l'acide stictique ou encore la Chetomin réactivent certaines p53 mutées notamment via le recrutement de la chaperone HSP40 pour restaurer la conformation de la p53 mutée<sup>190</sup>. Cependant, la Chetomin peut avoir des effets indépendants de p53 comme par exemple le ciblage des interactions entre HIF-1a et p300. Par ailleurs, les stratégies qui ciblent les régulateurs négatifs de p53 (comme MDM2 ou MDM4) pour la stabiliser dans les cellules tumorales exprimant une p53 sauvage, présentent également des risques au vu des effets secondaires liés à la suractivation de p53 dans les tissus sains (voir Discussion II.B).

La mutation Y220C constitue ainsi une cible privilégiée pour ce type de stratégie thérapeutique, de par la spécificité de la cavité structurale créée par la mutation de la tyrosine 220 en cystéine. L'équipe du Pr. Alan Fersht a déjà élaborédes molécules (PhiKan083 et PK7088) qui se logent précisément dans cette cavité et semblent réactiver la fonction de la p53<sup>Y220C</sup>*in vitro* et dans des cellules de tumeurs humaines. Le modèle murin que j'ai créé nous

permet de tester leur capacité à restaurer la fonction de la protéine mutée*in vivo* et en contexte physiologique et d'évaluer leurs éventuels effets secondaires sur l'organisme entier. Le défi de ce type de molécule est de pouvoir obtenir une bonne affinité de liaison qui les retienten complexe avec la protéine mutée. Ce complexe doit rester stable durant un temps suffisant pour la restauration de la conformation fonctionnelle de la protéine mutéeet doit pouvoir se former à une concentration non toxique pour l'organisme et qui maintienne leur spécificité de liaison. Afin d'atteindre cet objectif, Fersht et ses collaborateurs exploitent la plasticité structurale de la cavité et les interactions protéine-ligands, en se basant sur les différents états conformationnels étudiés par cristallographie dynamique. Ils ont ainsi découvert une souspoche hydrophobique qui peut être ciblée par des groupes pyrroles, augmentant ainsi l'affinité de liaison du ligand à la cavité d'un facteur 5 par rapport à la molécule initiale (PhiKan083) et ceci par l'incorporation d'atomes de fluorine (uniquement la tri-fluorination) à ces petites molécules <sup>254</sup>.

Une fois ces molécules stables obtenues je vais les tester sur les cellules p53<sup>Y217C/Y217C</sup>. Je vais ainsiévaluer la dose optimale qui permet l'activation des fonctions antitumorales principales de p53 (transactivation des principaux gènes cibles, induction de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose), ainsi que l'inhibition de ces activités oncogéniques acquises et l'induction de sa dégradation, sans avoir d'effets sur les cellules p53<sup>WT</sup> ni entraîner une cytotoxicité p53-indépendante. Suite aux tests préliminaires ex vivo, je testerai les molécules prometteuses sur des tumeurs xénogreffées pour une évaluation rapide de leur efficacité anti-tumorale et leur spécificité d'action par rapport à des xénogreffes de cellules KO pour p53 ou exprimant l'équivalent d'une autre mutation « hotspot » (cellules p53<sup>R270H/R270H</sup>). Enfin, si ces tests s'avèrent concluants, je réaliserai avec l'aide des spécialistes les études pharmacologiques in vivo pour administrer ces molécules aux souris p53<sup>Y217C/Y217C</sup> et monitorer leurs effets sur la régression tumorale avant de pouvoir conclure sur leurs éventuelles applications en clinique comme thérapie anti-tumorale ciblée et spécifique. L'intérêt de cette stratégie est que ces molécules fixent uniquement la p53 mutée et ne devraient donc pas affecter la survie des cellules non tumorales exprimant une p53 sauvage. De plus, elles ciblent une région de la protéine qui est distante de la surface fonctionnelle qui ne serait donc pas perturbée par leur fixation, ce qui a été vérifié in vitro. Notre modèle murin nous permettra ainsi d'évaluer cette stratégie ciblée et innovantein vivo : on s'attend à observer une régression des tumeurs spécifiquement chez les souris exprimant la

mutation p53<sup>Y217C</sup>traitées avec ces molécules par rapport aux tumeurs invalidées pour le gène *Trp53*, et ceci sans observer une toxicité secondaire dans les autres cellules de ces souris par rapport aux souris témoins du même génotype non traitées. De plus, un moyen de tester l'efficacité de ces molécules est de les administrer précocement en préventif et de surveiller si elles permettent de prévenir le développement de tumeurs chez les souris p53<sup>Y217C/Y217C</sup>, sachant que ces dernières développent des cancers fatals avec une incidence de 100%. Ainsi les souris de ce même génotype qui sont traitées précocement et qui survivraient sans apparition de tumeurs auraient réactivéla fonction de p53 comme preuve de l'efficacité de cette stratégie.

La validation de cette stratégie chez la souris constituerait une première étape avant de les tester chez les patients exprimant cette mutation spécifique. Elle permettrait également de prouver l'intérêt de cette technique de criblage de molécules *in silico* en se basant sur les études structurales de différentes protéines mutées.

## II. La sur-activation de p53 et ses effets physiopathologiques

## II.A. Le rôle du CTD de p53 in vivo

Le domaine C-terminal (CTD) de p53 est un domaine régulateur dont le rôle a été largement analysé dans plusieurs études aux résultats contradictoires. Initialement le CTD a été considéré comme un régulateur négatif du domaine de liaison à l'ADN de par son interaction avec des séquences non spécifiques de l'ADN <sup>90,255,256</sup>. Mais d'autres études ont suggéré que le CTD joue un rôle de régulateur positif et qu'il est nécessaire pour la reconnaissance et la liaison des séquences spécifiques par le DBD <sup>80-83</sup>. Ces études *in vitro* ou sur des lignées cellulaires consistent en une expression ectopique d'une p53 exogène introduite par transfection et souvent exprimée à des niveaux non physiologiques, d'où les contradictions de leurs conclusions qui sont difficiles à interpréter.

Le modèle murin  $p53^{\Delta 31}$  a été créé dans notre équipe par remplacement de l'allèle Trp53 endogène par une séquence codant pour une protéine tronquée du domaine C-terminal. Il permet ainsi d'étudier l'effet de la délétion du CTD de p53 dans un contexte d'expression physiologique. L'analyse des souris p53<sup> $\Delta$ 31/ $\Delta$ 31</sup> (Article n°3) a permis ainsi de démontrer que le CTD régule négativement les niveaux et l'activité de p53 puisque la délétion du CTD conduit à une sur-activation de p53 au niveau moléculaire et phénotypique (voir ci-dessous), mais également de comprendre les résultats contradictoires de la littérature<sup>257</sup>. En effet, la  $p53^{\Delta 31}$ est une protéine plus stable et plus active transcriptionnellement mais qui ne lie pas plus efficacement les éléments de réponse (REs) à p53. Ceci suggère que chaque molécule  $p53^{\Delta 31}$ est moins efficace pour la liaison aux séquences spécifiques d'ADN, en concordance avec un rôle de régulateur positif du CTD pour la liaison à l'ADN, ou que les REs sont saturés en molécules  $p53^{\Delta 31}$ . Cependant, les niveaux élevés de protéines  $p53^{\Delta 31}$ dans le noyau conduisent finalement à une meilleure transactivation des gènes cibles tout en ayant la même capacité de liaison aux promoteurs, suggérant que les molécules  $p53^{\Delta 31}$  sont plus actives. Une hypothèse est que le CTD est important pour l'interaction entre p53 et MDM2, ce qui affecte sa stabilité (par perte des sites ubiquitinylés par MDM2notamment) mais également son activité transcriptionnelle<sup>89</sup>. Le fait que le mutant p53<sup>7KR</sup> muté pour les lysines C-terminales ubiquitinylées par MDM2 n'entraîne pas de phénotype similaire aux souris  $p53^{\Delta 31}$ , suggère que la sur-activation de p53<sup> $\Delta$ 31</sup> est la conséquence d'une déstabilisation des interactions avec Mdm2 et/ou que le CTD sert à recruter des inhibiteurs pour former des complexes inactifs.

Ainsi, nous proposons le modèle de régulation suivant : le CTD favorise l'interaction de p53 avec son ubiquitine ligase MDM2qui entraîne la dégradation de p53 ainsi que

l'inhibition de sa fonction de transactivation. Il est possible que  $p53^{\Delta 31}$  interagisse moins bien également avec MDM4 (ou avec d'autres complexes inhibiteurs), ou que la quantité accrue de  $p53^{\Delta 31}$ satureMDM2 et MDM4 dans les noyaux des cellules mutées. Les protéines  $p53^{\Delta 31}$  liées à la chromatine seraient alors plus actives. Dans ce modèle, le CTD de p53 sert de régulateur négatif de son activité. Cependant, concernant la liaison du DBD aux REs, le CTD semble jouer un rôle de régulateur positif pour la reconnaissance et la liaison des séquences spécifiques d'ADN, puisque sa délétion n'améliore pas la liaison de p53 aux promoteurs des gènes cibles malgré l'accumulation de la p53 tronquée de son CTD, même si ne nous pouvons exclure l'hypothèse de saturation des REs.Ainsi, d'après ce modèle les contradictions des études sur le rôle du CTD découlent du niveau d'expression de p53 résultant de la méthode d'analyse (surexpression de la p53 mutée ou son introduction au même niveau que la p53 sauvage).

Une étude plus récente valide le rôle de régulateur positif du CTD pour la liaison à l'ADN en étudiant les effets d'une p53 humaine délétée des 30 derniers acides aminés  $(p53^{\Delta 30})$  et de p53 modifiées dans leurs CTD : six lysines C-terminales mutées en arginine  $(p53^{6KR})$  pour garder la charge globale ou en glutamine  $(p53^{6KQ})$  pour mimer les acétylations. Cette étude montre que la liaison de p53 à un grand nombre de sites au sein du génome est facilitée par le CTD non modifié. Le mécanisme proposé est que le CTD stabilise les interactions coopératives entre les différents DBD du tétramère ainsi que les complexes p53-ADN de par sa charge positive, alors que les acétylations des lysines C-terminales semblent jouer un rôle ultérieur à cette stabilisation <sup>242</sup>. Le rôle de ces lysines a déjà été montré grâce au modèle murin p53<sup>7KR</sup> dans lequel la modification du CTD contribue à la régulation différentielle et tissu-spécifique de l'expression des gènes cibles de p53<sup>70</sup>.

Par ailleurs, nous avons clairement établi que notre modèle murin  $p53^{\Delta 31}$  modélise le syndrome de dyskératose congénitale et que le raccourcissement télomérique causé par la régulation négative de gènes du métabolisme des télomères est la cause de cette pathologie chez les souris  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$ et de leur mort précoce, puisque des niveaux plus élevés d'un de ces gènes (*Rtel1*) sauvent partiellement le phénotype<sup>257</sup>. A noter que la délétion des 31 derniers acides aminés dans notre modèle murin empêche l'expression des isoformes contenant l'exon AS (pour Alternative Splicing). Pour contrôler l'effet de l'absence de ces isoformes sur le phénotype des souris  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$ , nous les avons comparées à des souris  $p53^{\Delta AS/\Delta AS}$  (créées dans notre équipe), qui sont délétées pour l'exon AS mais expriment une p53 sauvage. Les souris  $p53^{\Delta AS/\Delta AS}$  ne présentent aucun des phénotypes des souris  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$ , ce qui indique que

le phénotype de dyskératose congénitale résulte d'une sur-activation de p53 plutôt que de la perte de l'exon AS.

Un autre modèle murin délété du CTD de p53 (délétion des 24 derniers acides aminés, Trp53<sup> $\Delta$ 24</sup> ou Trp53<sup> $\Delta$ CTD</sup>) a été publié après notre étude et présente des similitudes et des différences avec notre modèle<sup>241</sup>.Les deux modèles sont phénotypiquement similaires et les mêmes bases moléculaires semblent être en jeu à savoir une sur-activation de p53 dans la moelle osseuse conduisant à une aplasie médullaire (même si le phénotype télomérique n'a pas été analysé chez les souris Trp53<sup>ΔCTD/ΔCTD</sup>). Ainsi,dans ce modèle, comme dans le nôtre, l'absence du CTD,qui joue un rôle de régulateur négatif dans la moelle osseuse (et le thymus), rend comptedu phénotype global des souris Trp53<sup> $\Delta$ CTD/ $\Delta$ CTD</sub> tout comme les</sup> p53<sup>A31/A31</sup>. Cependant, dans cette étude les auteurs proposent que le CTD joue un rôle différent selon le tissu et les gènes étudiés et que le niveau de la  $p53^{\Delta 24}$ soit différemment régulé selon le tissu, sans proposer un mécanisme moléculaire pour expliquer ces spécificités. Par exemple dans le foie, le CTD semble jouer un rôle de régulateur positif de la transactivation et être impliqué dans une étape ultérieure à la liaison à l'ADN (puisque la liaison de la p $53^{\Delta 24}$ aux REs n'est pas altérée mais l'expression des gènes cibles est affectée). Dans notre modèle, nous n'avons pas mesuré l'activité de p53 dans le foie et ne nous pouvons pas occulter l'hypothèse que l'action du CTD dans cet organe soit différente. Cependant, une autre hypothèse est que dans cet organe hématopoïétique, chezles souris mutées, un phénomène de compensation permettrait de préserver le faible pool de cellules hématopoïétiques en diminuant la transcription des gènes cibles de p53. En effet, selon l'étude de Hamard et al., les cellules de foie fœtal de souris Trp53<sup>ΔCTD/ΔCTD</sup> retiennent lacapacité de former des colonies in vitro et de recoloniser la moelle de souris irradiées, à la différence des cellules de la moelle osseuse<sup>241</sup>.

Il est important de soulever que des différences existent entre les deux modèles. En effet, la délétion  $p53^{\Delta 31}$ est plus large et englobe 7 acides aminés supplémentaires faisant partie du CTD d'après sa définition communément admise. De plus, la  $p53^{\Delta 24}$ conduit à la surexpression des transcrits contenant l'exon AS (d'après nos expériences de RMCE-ASAP <sup>257</sup>, et des expériences non publiées du groupe de JJ Manfredi) et qui sont absents dans notre modèle. Cette surexpression des isoformesAS chez les souris  $p53^{\Delta 24/\Delta 24}$ pourrait contribuer à leur mort encore plus précoce et expliquer la différence subtile entre les courbes de survie des  $p53^{\Delta 24/\Delta 24}$ (mort à environ 2 semaines) et des $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  (mort entre2 et 6 semaines).

### **II.B.** Effets d'une p53 hyperactive

Comme nous venons de voir, une diminution ou une perte de l'activité de p53 se traduisent par un développement de cancers plus ou moins rapidement selon les niveaux de ce suppresseur de tumeur. Cependant, une forte activité de p53 est également défavorable pour les cellules en raison deses fonctions cytotoxiques. Les niveaux de p53 doivent donc être finement régulés en l'absence de stress pour préserver l'homéostasie tissulaire. Les principaux inhibiteurs de p53 sont MDM2 et MDM4 qui participent à la régulation de son niveau d'expression et de son activité respectivement. Si cette régulation est perdue, comme chez les souris Mdm2<sup>-/-</sup> ou Mdm4<sup>-/-</sup>, l'activation anormale de p53 conduit à une létalité embryonnaire<sup>258</sup>. L'étude des souris Mdm2<sup>+/-</sup>et Mdm4<sup>+/-</sup> montre que 50% d'activité d'une de ces protéines est suffisante pour réguler correctement les niveaux de p53. Chez les souris  $Mdm2^{puro/\Delta7-12}$ , les niveaux de Mdm2 sont encore plus réduits (à environ 30%), ce qui se traduit par une augmentation d'activité de la p53 endogène, conduisant à une réduction de la taille des souris, un défaut de lymphopoïèse et une sensibilité accrue aux radiations <sup>259</sup>. Un effet plus subtil est retrouvé chez les souris dont le promoteur interne de Mdm2 n'est pas activé par p53 et qui présentent uniquement une hypersensibilité à l'irradiation causant une aplasie médullaire <sup>260</sup>. Un phénotype plus sévère est retrouvé chez les souris Mdm2<sup>PND/PND</sup>qui expriment des niveaux faibles de MDM2 mais suffisants pour prévenir la létalité embryonnaire. Le résultat est une augmentation de certaines activités de p53 qui se manifeste par des anomalies phénotypiques tissu et fonction spécifiques, comme une hyperpigmentation localisée (accumulation de mélanocytes aux extrémités), un défaut du système hématopoïétique et une atrophie des gonades <sup>261</sup>.

Un modèle murin surprenant est le modèle p53<sup>25,26,53,54</sup>qui est muté pour les deux domaines de transactivation de p53 mais qui est extrêmement stable, ce qui à l'état hétérozygote entraîne un phénotype de létalité embryonnaire par sur-activation de p53. Les embryons non viables présentent des caractéristiques d'un syndrome de défauts développementaux appelé CHARGE <sup>39</sup>. De plus, le modèle murin p53<sup>7KR</sup> muté pour les 7 lysines C-terminales cibles de l'ubiquitination par MDM2 exprime une p53 constitutivement active et présente une déplétion des cellules souches hématopoïétiques. D'autres modèles murins de sur-activation de p53 ont été étudiés. Par exemple, les souris p53<sup>m/+</sup> expriment une p53 mutée qui stimule l'activité de la p53 endogène (sans effet notable sur son niveau), conduisant à une réduction significative de l'incidence des tumeurs, en concordance avec son rôle de suppresseur de tumeur. Cependant, ces souris meurent plus rapidement que les souris WT et présentent des symptômes de vieillissement accéléré, un des effets secondaires de la

sur-activation de p53 <sup>262</sup>. Les souris « Super-p53 » qui expriment une copie surnuméraire de p53 par introduction d'un transgène, présentent –en réponse au stress– une activité de p53 qui est une fois et demi supérieure à la normale. Ces souris suractivées pour p53, développent moins de tumeurs que les souris sauvages et aucun signe de vieillissement prématuré n'a été relevé, probablement car le niveau basal de p53 n'est pas augmenté en absence de stress <sup>263</sup>. Les souris p53<sup>Δ31/Δ31</sup>que nous avons créées et qui sont délétées du domaine C-terminal de p53, présentent une activité de p53 encore plus élevée et meurent rapidement après la naissance (à environ 3 semaines). Cette mort prématurée des souris p53<sup>Δ31/Δ31</sup>résulte de la forte sur-activation de p53 puisque le phénotype très sévère de ces souris rappelle celui des souris Mdm2<sup>-/-</sup>p53<sup>R172P/R172P264</sup> et des souris Mdm2<sup>+/-</sup> Mdm4<sup>+/-265</sup> suractivées pour p53 par un défaut de sa régulation. A noter que la protéine p53<sup>R172P</sup> est incapable d'induire l'apoptose mais toujours capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire, une réponse qui peut être excessive dans le cas d'une absence de régulation par MDM2.

La comparaison entre ces différents modèles murins exprimant une p53 inactive, hypomorphe ou hyperactive, suggère que les niveaux de p53 dictent en grande partie la sévérité du phénotype, allant d'une létalité embryonnaire dans le cas d'une très forte activité de p53 au développement de tumeurs fatales en 6 mois en l'absence d'une p53 fonctionnelle en passant par une mort précoce avant l'âge adulte, avec une durée de vie et des symptômes qui dépendent du niveau d'activation de p53. Dans le cas d'une dérégulation subtile du niveau de p53, les souris présentent des phénotypes intermédiaires comme la défaillance de certains organes (comme l'intestin ou le foie) en cas d'activation anormale de p53 ou une infertilité dans le cas d'une activité réduite de p53 <sup>266</sup>.

Les souris  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$ sont un très bon modèle pour l'étude des effets de la suractivation physiologique de p53 *in vivo* puisque ces souris présentent un phénotype sévère mais survivent à un âge qui permet de les analyser. L'étude détaillée de ces souris a révélé qu'elles présentent un phénotype caractéristique d'une forte activité de p53 déjà relevée chez les autres modèles comme la petite taille, l'hyperpigmentation, l'hypoplasie cérébelleuse, l'hypogonadisme chez les mâles et un défaut d'hématopoïèse. D'après les résultats de l'autopsie et des analyses histologiques, la mort précoce des souris p53<sup> $\Delta 31/\Delta 31$ </sup>pourrait être due à une insuffisance cardiaque (hypertrophie cardiaque observée)secondaire à l'aplasie médullaire, caractérisée par une anémie sévère etl'absence de progéniteurs hématopoïétiques. Nos résultats suggèrent que ce défaut de la moelle osseuse est dû au raccourcissement télomérique chez ces souris qui modélisentle syndrome de dyskératose congénitale (ou DC) et présentent les caractéristiques des téloméropathies : aplasie médullaire et fibrose pulmonaire (caractérisant les syndromes de raccourcissement télomérique), hyperpigmentation cutanée, dystrophie unguéale et leucoplasie orale (constituant la triade diagnostique de la DC), ainsi que des caractéristiques des formes sévères de la DC (petite taille, atrophie testiculaire et hypoplasie cérébelleuse)<sup>257</sup>.

Il est important de noter que la plupart des souris  $p53^{+/\Delta 31}$  (que nous avons observées pendant plus d'un an) ne développent pas de phénotype médullaire (mais présentent des caractéristiques de vieillissement accéléré), alors que les souris $p53^{+/\Delta 31}$  Mdm4<sup>+/-</sup> et les souris $p53^{+/\Delta 31}$  Mdm4<sup>+/-</sup> (exprimant des niveaux faibles de MDM4 pleine longueur) présentent le même phénotype que les souris  $p53^{\Delta 31/\Delta 31267}$ , tout comme les souris Mdm2<sup>+/-</sup> Mdm4<sup>+/-</sup> E6. Ces dernières expriment des niveaux élevés de p53 traduite à partir d'un allèle sauvage, ce qui démontre que les phénotypes observés sont dus à la sur-activation de p53 et non pas à l'effet de la mutation  $p53^{\Delta 31}$ elle-même. Ces résultats révèlent qu'une variation de l'activité de p53 d'un facteur deux est suffisante pour induire une aplasie médullaire létale, ce qui démontre l'importance physiologique de la régulation très précise de p53.

De façon intéressante, l'étude du modèle murin délété pour les 24 derniers acides aminés (Trp53<sup> $\Delta$ CTD</sup>ou Trp53<sup> $\Delta$ 24</sup>), quia suivi la nôtre,montre des phénotypes similaires : les souris Trp53<sup> $\Delta$ CTD/ $\Delta$ CTD</sub> meurent également prématurément (autour de 2 semaines après la naissance) et développent un défaut de l'hématopoïèse (une anémie sévère, un déficit en cellules progénitrices de la moelle osseuseetun cœur hypertrophique) et des défauts développementaux (anomalies cérébelleuses, petite taille et hyperpigmentation cutanée, etc.). Comme discuté ci-dessus, la p53 mutée est suractivée dans la moelle et l'analyse des souris Trp53<sup> $\Delta$ CTD/+</sup> et Trp53<sup> $\Delta$ CTD/-</sup> (qui survivent et présentent un défaut hématopoïétique moins sévère) corrobore notre conclusion que le défaut médullaire est dépendant de la dose de p53 et que le niveau et/ou l'activité de p53 dictent les phénotypes observés <sup>241</sup>.</sup>

En conclusion, notre modèle murin, qui modélise le syndrome télomérique dyskératose congénitale, ainsi que d'autres modèles de sur-activation de p53 démontrent que ce gardien du génome doit être finement régulé au niveau physiologique et que sa réactivation en thérapie anti-tumorale doit être maîtrisée afin d'éviter les effets délétères. En effet, si une activité anormalement basse de p53 favorise l'apparition de cancers, une activité accrue peut conduire à un vieillissement accéléré, voire une létalité précoce par aplasie médullaire, ou même embryonnaireen cas d'activation excessive(Figure 15).

Phenotypic Class	p53 Activity Level	Mouse Strain	Phenotype	p53 Status	Reference
		Mdm2-/-	Lethal at E3.5	Stabilized, Active Wild-type p53	Jones, et al, 1995 de Oca Luna, et al, 1995 Chavez-Reyes, et al, 2003
Embryonic Lethality		Mdmx-/-	Lethal at E7.5-11.5	Stabilized, Active Wild-type p53	Parant, et al 2001 Finch, et al, 2002 Migliorini, et al, 2002
		p53 <sup>25,26/-</sup>	Lethal at E12.5-13.5	Stabilized Transactivation-Selective p53	Van Nostrand, et al, 2014
		p53 <sup>25,26,53,54/+</sup>	Lethal at E13.5-15.5; Phenotypes of CHARGE syndrome	Transactivation-Dead Mutant p53 and Wild-type p53	Van Nostrand, et al, 2014
		Mdm2+/-;Mdmx+/-	Partial Embryonic Lethality; Cerebellular Hypoplasia; Hematopoietic Failure; Lethality by P14	Partially Stabilized, Active Wild-type p53	Terzian, et al. 2007
Postnatal Defects and Lethality		Mdm2-/-; p53 <sup>515C/515C</sup>	Growth Retardation; Hematopoeitic Failure; Impaired Cerebellar Development; Lethality between P12-15	p53 Arg to Pro Mutation at Residue 172 and Mdm2 loss	Liu, et al, 2007
		p53 <sup>\LCTD/\LCTD</sup>	Hematopoeitic Failure; Impaired Cerebellar Development; Lethality by P14	Lacking C-terminal 24 amino acids	Hamard, et al, 2013
		p53 <sup>Δ31/Δ31</sup>	Phenotypes of Dyskeratosis Congenita; Telomere Defects; Lethality between P14-43	Lacking C-terminal 31 amino acids	Simeonova, et al, 2013
		p53 <sup>TSD/-</sup>	Partial Premature Aging: Depleted Adult Stem Cells; Lethality by P40	Phosphorylation Mimic: Aspartic Acid Mutation of Thr21 and Ser23	Liu, et al, 2010
		Mdm2 <sup>Puro/∆7-12</sup>	Radiosensitive; Growth Retardation; Lymphopenia; Tumor Resistant	Mdm2-null Allele and Hypomorphic Mdm2 Allele: 30% Mdm2 Levels Relative to Wild-type	Mendrysa, et al, 2006 Mendrysa, et al, 2003
Desert		p53+/m	Premature Aging; Tumor Resistant	C-terminal Fragment of p53 and Wild-type p53	Tyner, et al, 2002
Aging		p53 <sup>∆40</sup>	Premature Aging	Transgenic Overexpression of p53 with Deletion of Amino Acids 1-40 Comprising the First Transactivation Domain	Maier, et al, 2004
Radiosensitiv	е	Super p53	Radiosensitive; Tumor Resistant	2 Wild-type Alleles Plus Extra 1-2 Copies of a BAC Transgene Encompassing the p53 Locus	Garcia-Cao, et al, 2002
Wild-type		p53+/+	Wild-type	Wild-type p53	
Increased		p53+/-	Increased Tumorigenesis	Reduced p53 Levels	Donehower, et al. 1992 Jacks, et al. 1994 Purdie, et al. 1994 Venkatachalam, et al 1998
Tumorigenesi	s	p5325,26,53,54/-	Exencephaly; Increased Tumorigenesis	Transactivation-Dead Mutant p53	Van Nostrand, et al, 2014
		p53-/-	Exencephaly; Increased Tumorigenesis	No p53	Donehower, et al, 1992 Jacks, et al, 1994 Purdie, et al, 1994 Sah, et al, 1995 Armstrong, et al, 1995

Figure 15 : **Tableau résumant les modèles murins** exprimant des niveaux décroissants de p53 et les phénotypes associés. Figure extraite de réf.<sup>24</sup>

## II.C. p53 etsyndromes d'insuffisance médullaire

II.C.1. Similitudes cliniques

Comme présenté dans l'Introduction (paragraphes V.B), les syndromes de dyskératose congénitale (DC) et d'anémie de Fanconi (FA) présentent des similitudes cliniques résumées dans le Tableau 3 ci-dessous.

Maladie	Traits physiques	Insuffisance médullaire	Autres anomalies	Cancers	Caractéristique clinique
Dyskeratose Congenitale (et Syndrome de Hoyeraal- Hreidarsson)	Hyperpigmentation cutanée Dystrophie unguéale Leucoplasie orale Petite taille	Aplasie médullaire progressive plus ou moins tardive	Fibrose pulmonaire Maladies du foie Nécrose vasculaire Stérose des conduits <b>Atrophie testiculaire</b> Hypoplasie cerebelleuse Cœur hypertrophique	Carcinomes de la sphère ORL et ano-génitale Leucémies Myélodysplasies	Télomères très courts
Anémie de Fanconi	Microphthalmie Anomalies du pouce Anomalies du radius Petite taille Hyperpigmentation cutanée (tâches « café au lait »)	Aplasie médullaire progressive précoce	Malformations cardiaques, rénales et génito-urinaires Macrocytose Taux élevé d'hémoglobine fœtale	Carcinomes de la sphère ORL et ano-génitale Leucémies Myélodysplasie Carcinomes de la peau et du tube digestif (+ Tumeurs du cerveau et du rein pour FD1)	Défauts de réparation des ponts inter-brins de l'ADN

Tableau 3 : Tableau cliniquedes maladies de DC et FA. En gras les symptômes communs aux deux.

Ces deux maladies d'insuffisance médullaire sont pourtant distinctes du point de vue cellulaire et moléculaire. La cause de décès est commune par aplasie médullaire : épuisement des cellules souches hématopoïétiques (HSCs) par sénescence ou par apoptose dû au raccourcissement télomérique pour la DC ou à l'excès des signaux de dommages à l'ADN non réparés pour la FA. Pour ces deux maladies, le traitement par transplantation de HSCs est de plus en plus efficace, tout comme le suivi post-transplantation<sup>209</sup>. Ainsi, le taux de survie des patients et leur espérance de vie sont croissants, ce qui signifie que les anomalies secondaires non-hématologiques doivent être examinées avec plus d'attention qu'auparavant et traitées. Dans ce cadre, la discrimination entre les deux syndromes est importante et nécessite une meilleure connaissance des causes génétiques qui les distinguent et des bases moléculaires qui les relient.

Plus encore, les deux maladies partagent également l'instabilité génétique inhérente aux défauts de réplication et de maintenance des télomères ou au défaut de réparation des ponts inter-brins d'ADN. De façon intéressante, des patients FA présentent des dysfonctionnements télomériques comme la perte ou les cassures des télomères dans le sang périphérique, les fusions des télomères et le raccourcissement global des télomères. En effet, le dysfonctionnement télomérique est retrouvé (plus ou moins marqué) dans plusieurs maladies des syndromes d'insuffisance médullaire. Le compartiment hématopoïétique est très sensible à la longueur des télomères car il se régénère rapidement. Dans la DC, la présence de télomères courts n'est pas limitée aux cellules sanguines mais observée également dans les fibroblastes et les cellules buccales par exemple. L'érosion des télomères joue un rôle très important dans cette pathologie, alors que dans la FA, elle est considérée comme la conséquence du dysfonctionnement de la voie Fanconi de réparation de l'ADN. Dans ce syndrome, certains leucocytes présentent des télomères courts mais pas aussi atteints que dans les cellules DC. Le mécanisme moléculaire proposé est l'accumulation de cassures non réparées au niveau des télomères conduisant à un raccourcissement réplicatif dû au défaut de la machinerie de réparation et une réponse au stress oxydatif<sup>268</sup>.

La protéine centrale FANCD2 monoubiquitinée semble jouer un rôle dans la maintenance alternative de la longueur des télomères ou ALT (Alternate Lengthening of Telomeres) par recombinaison homologue dans les cellules qui ne réactivent pas la télomérase<sup>268</sup>. Dans ces cellules FANCD2 colocalise aux télomères avec la protéine TRF1 (du complexe « shelterin » de protection des télomères). En effet, des interactions directes entre la protéine FANCD2 et l'ADN télomérique ont été montrées dans des cellules ALT, et cette localisation dépend de FANCA, FANCL et ATR <sup>269</sup>.De plus FANCD2 participe au maintien de la stabilité des télomères en empêchant la délocalisation de TRF1 par inhibition de sa ribosylation par Tankyrase1<sup>270</sup>. Cette étude a également montré que la perte de FANCD2 entraîne la formation de structures télomériques extra-chromosomiques ainsi qu'une régulation négative de TRF1 dans des cellules mutées pour FANCD2. Par ailleurs, la localisation de FANCD2 aux foyers de pontages inter-brins intervient via Apollo, dont un variant d'épissage a été retrouvé chez des patients HHS<sup>271</sup>, suggérant un rôle de cette interaction sue le développement de la maladie chez ces patients<sup>200</sup>. Ainsi, certains lymphocytes de patients FA (notamment ayant une mutation de FANCD2) présentent des télomères anormalement courts<sup>272</sup>, mais ces observations ne sont pas présentes chez tous les patients FA et la relation entre la voie Fanconi et les télomères reste à éclaircir. De plus, la délétion de FANCA et FANCD2 entraîne un raccourcissement des télomères et une diminution des échanges entre chromatides sœurs aux télomères<sup>269,270</sup>. Par ailleurs, certaines protéines du complexe central semblent jouer un rôle dans la maintenance des télomères comme FANCC par exemple dans les conditions de stress réplicatif ou durant le processus ALT par recombinaison homologue<sup>273</sup>. Concernant les protéines FANC du complexe effecteur, une implication possible de SLX4 (FANCP) dans le maintien des télomères est suggérée par sa présence aux télomères en complexe avec la protéine shelterin TRF2<sup>274</sup>. Cette nucléase joue un rôle dans la régulation négative de la longueur des télomères, la régulation de la recombinaison des télomères et la prévention des défauts de réplication des télomères, probablement en éliminant les structures ADN intermédiaires<sup>75,268,275,276</sup>. De plus, FANCJ est une hélicase impliquée dans le maintien de la stabilité du génome en facilitant la progression de la réplication par déplacement des structures G4, une action également importante pour la maintenance des télomères et leur réplication. FANCJ a été retrouvée aux télomères mais son rôle précis dans la biologie des télomères n'est pas encore établi 268. Enfin FANCD1

(BRCA2) est requise pour l'homéostasie des télomères et peut être particulièrement importante pour la réplication des brins télomériques retardés, riches en guanine <sup>277</sup>, via son rôle dans la recombinaison homologue. En effet, les tumeurs mammaires murines déficientes pour *Brca2* accumulent des foyers de dommages de l'ADN induits par le dysfonctionnement télomérique (TIFs). De plus, chez l'Homme, les tumeurs du sein mutées pour *BRCA2* présentent des télomères courts <sup>278</sup>.

## II.C.2.Implication de p53 dans ces syndromes

La voie p53 est impliquée dans la régulation de l'hématopoïèse. Comme indiqué précédemment, l'activation dérégulée de cette voie affecte sévèrement ce processus.Pour ces mêmes raisons, le système hématopoïétique est particulièrement vulnérable auxdommages de l'ADN, d'autant plus que leur taux de renouvellement est élevé. Le compartiment hématopoïétique contient des cellules prolifératives qui sont très sensibles aux niveaux de MDM2 et MDM4 et à l'activité de p53 résultante. p53 est exprimée dans les cellules souches hématopoïétiques (HSCs) et régule, au niveau basal, leur quiescence et leur autorenouvèlement. Même si les altérations génétiques de TP53 sont rares dans les tumeurs hématologiques (probablement parce que la perte de p53 compromet la fonctionnalité des HSCs), elles sont associées à un mauvais pronostic et des amplifications des gènes codant pour ses principaux régulateurs MDM2 et MDM4 sont fréquemment retrouvées dans ce type de tumeurs. Une activation excessive de p53 affecte, au contraire, la cellularité de plusieurs organes comme la moelle ou le foie, et conduit à la perte des progéniteurs hématopoïétiques. Ainsi, la régulation précise de l'activité de p53 est critique pour le maintien de l'homéostasie physiologique ou la réparation des tissus endommagés, notamment dans les organes à renouvellement cellulaire rapide comme la moelle osseuse <sup>197</sup>.

Le rôle que joue p53 dans le maintien de l'homéostasie du compartiment hématopoïétique explique ainsi le phénotype d'insuffisance médullaire commun aux modèles murins suractivés pour p53 que nous venons de voir, dont celui très sévère et létal des souris  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$ . Ce phénotype est également le dénominateur commun entre les téloméropathies, l'anémie de Fanconi et les ribosomopathies (voir Introduction paragraphe V.B). Notre modèle murin  $p53^{\Delta 31}$  nous a permis de montrer qu'une sur-activation de p53 peut entraîner des phénotypes (plus ou moins marqués) de ces trois maladies et que p53 régule négativement les voies de maintien des télomères <sup>257</sup>, de réparation des ponts inter-brins de l'ADN <sup>279</sup> et de la maturation des ARNs ribosomaux (données préliminaires non publiéeset en concordance avec les données de Marcel et al.<sup>280</sup>).

Nos observations sur les cellules murines sont également validéesdans lescellules humaines, ce qui laisse supposer que des altérations dans la voie p53 peuvent être à l'origine de ces maladies. En effet, les souris  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  modélisent la dyskératose congénitale (DC) qui est l'archétype des syndromes de raccourcissement télomérique chez l'Homme, et les deux gènes responsables de la plupart des cas de DC et de ses formes sévères (DKC1 et RTEL1) sont régulés négativement chezla souris et chez l'Homme. Le fait que l'anémie de Fanconi est un syndrome d'insuffisance médullaire chez l'Hommesuggère que ce défaut dans la voie Fanconi contribue au phénotype d'aplasie médullaire chez les souris  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$ , d'autant plus que nous montrons qu'un grand nombre des gènes FANC sont régulés négativement par p53 chez la souris et chez l'Homme. Cependant, les souris délétés de gènes Fanc présentent peu, ou pas, de défauts hématologiques en absence de stress supplémentaires (comme les agents alkylants)<sup>281</sup>, alors que l'aplasie médullaire apparaît spontanément chez les souris modélisant un défaut télomérique (souris Pot1b<sup>-/-</sup> mTR<sup>+/-</sup>par exemple)<sup>228</sup> tout comme chez les souris  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$ . De plus, nous montrons que les niveaux du gène *Rtel1*, proche du locus *Agouti* sur le chromosome 2, jouent un rôle dans la survie des souris  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  de fond génétique mixte (C57BL/6-129/Sv). Ce gène est essentiellement un régulateur de la longueur des télomères muté chez des patients DC, alors qu'aucun gène Fanc n'est localisé à proximité du locus Agouti. Toutes ces observations indiquent que le dysfonctionnement télomérique est le phénotype qui joue un rôle dominant dans l'aplasie médullaire des souris  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$  et que p53 est un régulateur du métabolisme des télomères. Récemment, l'équipe de Paul Lieberman a montré que p53 joue un autre rôle dans la maintenance de l'intégrité du génome et des télomères via la transcription de régions sub-télomériques dont l'ARN TERRA (telomere repeat encoding RNA)<sup>282</sup>, une activité qu'il serait intéressant de mesurer sur les cellules  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$ . La régulation du métabolisme des télomères est donc un aspect majeur et émergeant de p53 mais qui pourrait être à double face selon le statut, le niveau et l'activité de ce « gardien du génome ».

De plus, alors que des mutations germinales très pénétrantes des gènes FANC ont été retrouvées chez 95% des patients atteints d'anémie de Fanconi (FA), environ 30% des cas de dyskératose congénitale sont idiopathiques, leur origine moléculaire n'ayantpas encore été trouvée.Des mutations causales des syndromes télomériques ou de FAsonttoujours découvertes dans des gènes connus ou de nouveaux gènes impliqués dans le métabolisme des télomères ou dans la réparation de l'ADN. Ainsi, une mutation sur un nouveau gène a été trouvée récemment chez un patient atteint d'anémie de Fanconi. Ce gène s'ajoute à la liste des gènes *FANC* (20 gènes au total à ce jour) sous le nom de *FANCU*<sup>283</sup>.Il code pour la protéine

XRCC2impliquée dans la réparation des cassures double-brins en aval de la voie Fanconi.De plus, le gène le plus récemment identifié chez des patients atteints de DC est le gène PARN qui est une ribonucléase spécifique des  $poly(A)^{220,284}$ . Plusieurs hypothèses sont émises sur le rôle de PARN dans le métabolisme des télomères : la déficience en PARN entraîne la perte de la voie de dégradation des ARNm non-sens(Nonsense-Mediated mRNA Decayou NMD) qui joue également un rôle important dans les HSCs, causant des défauts aux télomères <sup>220</sup>;PARN joue un rôle dans la maturation et la stabilité de l'ARN de la télomérase (TERC) par déadenvlation <sup>221,222</sup>.Il est également possible que la déficience de PARN affecte la maintenance des télomères via p53 puisque PARN semble agir principalement en favorisant la dégradation de l'ARNm de  $TP53^{285}$ . Cet effet est visible dans les cellules de patients déficients pour PARN qui présentent une réduction dans les niveaux des transcrits de DKC1, RTEL1 et TERF1, ainsi qu'une augmentation de l'ARNm de TP53<sup>220</sup>. Ainsi PARN est un exemple de régulateur (non spécifique) de p53, muté chez des patients DC. Notre postulat est que des mutations (ou polymorphismes) dans les régulateurs principaux de p53 ou de p53 luimêmepuissent encore être trouvées chez les patients idiopathiques (30%). Ainsi, les résultats de notre étude montrentqu'il serait pertinent derechercher des variations dans la séquence du gène TP53 ou des gènes de sa voie (notamment MDM2 et MDM4) chez ces patients, et donc d'inclure ces gènes dans les tests de séquençage diagnostiques. De plus, nos observations suggèrent que des altérations (génétiques ou somatiques) dans la voie p53 aggravent le tableau clinique des patients souffrant de cette maladie. On peut supposer qu'une activité anormale de p53 dans les cellules des patients Hoyeraal Hreidarsson (HH) souffrant d'une forme sévère de DC soit responsable de la gravité des symptômes de ces patients par rapport à des patients atteints d'une forme simple de DC et exprimant la même mutation causale mais sans anomalie de la voie p53.

## II.C.3. La voie p53 au carrefour entre DC et FA

Le rôle de certaines protéines FANC, et notamment FANCD2, dans la biologie des télomères nous a incité à évaluer la régulation de FANCD2 par p53, dans le cadre de notre étude de l'implication de p53 dans le métabolisme des télomères (Article n°4). Nous avons ainsi pu montrer que p53 régule négativement *Fancd2*, mais également onze autres gènes de la voie Fanconi (dont *Fancj*), en plus des 10 gènes impliqués dans le métabolisme des télomères chez la souris (ainsi que de la plupart d'entre eux chez l'Homme)<sup>279</sup>. Cette étude nous a permis de souligner davantagele rôle de p53 dans la régulation du métabolisme télomérique, et l'intérêt de le séquencer chez les patients DC. Nous avons aussi pu découvrir

l'implication de p53 dans l'inhibition de la voie Fanconi de réparation des ponts inter-brins de l'ADN, ce qui est inattendu en raison du rôle classique de p53 comme « gardien du génome ». En effet, le lien entre p53 et la voie Fanconi communément admis découle plutôt du fait que les dommages à l'ADN activent la voie p53,et que l'activation exacerbée de p53 dans les cellules Fanconiest responsable du phénotype d'insuffisance médullaire (voir Introduction fin du paragraphe V.B.2.)

Nos observations ont une retombée sur la compréhension des similitudes cliniques entre ces deux maladies. En effet, des télomères anormalement courts, ainsi que des dommages à l'ADN non réparés, sont des stress cellulaires qui activent la voie p53. Nous avons montré qu'une activation maintenue de p53 entraîne la régulation négative d'une panoplie de gènes impliqués dans le métabolisme des télomères et dans la voie Fanconi de réparation de l'ADN. Ainsi une boucle positive de régulation opère entre le dysfonctionnement télomérique et les défauts de réparation de l'ADN d'une part et l'activation de p53 d'autre part (Figure 16). Par ailleurs, une boucle de rétrocontrôle négatif existe entre p53 et ses régulateurs constituant un frein à la boucle positive. Sachant que ce frein peut être perdu dans certaines pathologies, ceci alimenterait la boucle positive entraînant l'accumulation de défautsdans des voies différentes du stimulus initial. On peut ainsi émettre l'hypothèse que dans des cellules Fanconi l'activation continue de p53 entraîne la régulation négative d'un nombre de gènes impliqués dans le métabolisme des télomères, conduisant ainsi à un défaut dans la machinerie de maintien de la longueur des télomères. Cette hypothèse explique le phénotype de télomères courts chez certains patients FA. Ce lien entre les deux types de défauts cellulaires, via p53, est subtil puisqu'il ne mime pas complètement les mutations inactivatrices causales mais réduit l'expression de protéines importantes dans l'une ou l'autre des voies. D'autres phénotypes partagés entre les deux maladies (voir Tableau 3) comme l'insuffisance médullaire, l'hypogonadisme, les défauts cardiaques, l'hyperpigmentation cutanée et la petite taille ainsi que des signes de vieillissement accéléré (cheveux gris, anomalies squelettiques) rappellent les manifestations d'une p53 hyperactive (voir paragraphe II.B). Ainsices similitudes cliniques entre les deux syndromes (qui conduisent dans certains cas à une confusion au diagnostic) peuvent découler en partie de l'activation excessive de p53. De plus, au vu des nombreux polymorphismes qui affectent la voie p53 (SNPs dans les gènes TP53, MDM2, MDM4 et CDKN1A par exemple), les niveaux de p53 et de sa régulation varient au sein de la population humaine, ce qui se traduit par une boucle positive plus ou moins forte selon l'activité résultante de p53. Nous postulons donc

que cette variation individuelle contribue à la variabilité clinique des phénotypes entre deux patients exprimant la même mutation causale.



Figure 16 : Schéma simplifié des boucles de rétrocontrôle. Des défauts dans la réparation des dommages à l'ADN ou dans la maintenance des télomères activent la voie p53 (1) qui régule négativement un nombre de gènes impliqués dans le métabolisme des télomères et/ou dans la réparation de l'ADN (2), entraînant une accumulation des défauts de l'ADN et de la longueur des télomères (3), ce qui définit la boucle de rétrocontrôle positif (en vert). Dans des cellules WT non stressées, cette boucle serait contrebalancée par la boucle de rétrocontrôle négatif (en rouge) entre p53 et son ubiquitine ligase MDM2 (4 et 5). En fonction de l'état de stress cellulaire qui active p53 et/ou les niveaux de ses régulateurs, l'une de ces deux boucles peut prendre le dessus et dicter la sévérité du phénotype cellulaire.

## II.C.4. Insuffisances médullaires, p53 et cancer

Un autre point commun entre les patients atteints de dyskératose congénitale (DC) et d'anémie de Fanconi (FA), est leur prédisposition à développer des tumeurs (du même spectre).Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette prédisposition au cancer. Par exemple, les télomères courts des patients DC limitent la capacité proliférative du système immunitaire adaptatif et cette immunodéficience conduit à un défaut de la surveillance anti-tumorale<sup>204</sup>. Par ailleurs, les cellules qui entrent en sénescence réplicative (induite par le raccourcissement télomérique) sécrètent des facteurs qui favorisent l'inflammation et le développement des tumeurs. De plus, il est possible que l'incidence élevée de cancer soit intrinsèque à la défaillance des organes affectés par ces maladies, notamment la moelle osseuse. En effet, la forte incidence des cancers hématologiques dans ces deux maladies peut être expliquée par la

dépopulation des cellules souches hématopoïétiques (HSC) suivie par la sélection des HSCs ayant retenu une capacité proliférative <sup>200</sup>. Enfin, des mutations dans certains gènes impliqués dans l'une ou l'autre des maladies peuvent jouer un rôle dans le développement des tumeurs chez les patients. Ceci est particulièrement pertinent dans le cas de l'anémie de Fanconi, puisque le bon fonctionnement des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN est essentiel pour l'échappement au cancer <sup>132</sup> et que les gènes *FANCS* et *FANCD1* par exemple codent respectivement pour les suppresseurs de tumeur BRCA1 et BRCA2. De plus, l'inactivation de FANCD2 entraîne la régulation positive de l'oncogène  $\Delta$ Np63, ce qui contribue au développement tumoral <sup>286</sup>. Un autre exemple en faveur de cette hypothèse est que des polymorphismes dans la séquence de *RTEL1* humain (dont des mutations sont responsables de cas de DC/HH) ou des mutations hypomorphes de *Rtel1* chez la souris semblent augmenter la susceptibilité à certains types de cancers (hépatiques, lymphomes, gliomes) <sup>287</sup>.

Par ailleurs, cette prédisposition peut être due à l'instabilité génomique partagée par les deux syndromes. Encore une fois le lien que nous avons mis en évidence entre ces deux maladies, via p53, pourrait être un facteur aggravant, qui expliquerait cette similitude. En effet, comme nous venons de voir, les défauts dans l'une ou l'autre des voies (de maintenance des télomères ou de réparation de l'ADN) activent p53 conduisant à une régulation négative de ces deux voies et à une accumulation des dommages à l'ADN. Dans les cellules de patients DC, des télomères courts créent des dommages à l'ADN (des signaux de dommages à l'ADN aux télomères, des fusions télomériques et des réarrangements chromosomiques) qui activent les voies canoniques de réparation des cassures double-brins. Ainsi, si la voie Fanconi de réparation est également affectée dans ces cellules (par activation de p53), ces dommages seront maintenus, conduisant à une instabilité du génome. Un argument en faveur de cette hypothèseest le fait que certaines cellules de patients DC sont hypersensibles à la Mitomycine C, une caractéristique typique d'un défaut dans la voie Fanconi <sup>209,288</sup>. Cette hypothèse permettrait d'expliquer comment des cellules aux télomères courts, et donc au potentiel prolifératif réduit, sont néanmoins sujettes à la transformation cancéreuse. A l'inverse, dans les cellules où la voie Fanconi est atteinte, etoù une activation excessive de p53 entraîne un défaut télomérique créant des dommages supplémentaires, la machinerie de réparation peut être rapidement saturée et les dommages s'accumulent. Dans ce cas, p53 contribuerait à augmenter une instabilité génomique favorable au développement de tumeurs, sachant que les défauts des mécanismes de réparation de l'ADN sont sélectionnés durant le développement et la progression tumorale (tolérance au stress réplicatif, taux de mutations élevé, etc.)<sup>131</sup>. En accord avec nos conclusions, des études ont montré que l'hyper-activation de la voie de réparation dépendante de p21 (gène cible de p53) contribue à la progression de leucémies (souvent retrouvées dans ces deux maladies)<sup>289</sup>.

De plus, les cellules qui accumulent des dommages, en raison de leur instabilité génomique, subissent une pression de sélection au cours de la transformation tumorale pour désactiver p53 (souvent par mutations mais aussi par délétion), favorisant ainsi le développement de cancer. Ainsi, l'implication de nos observations dans le processus de développement du cancer est validée par des analyses transcriptomiques qui montrent que dans les cancers de haut grade, la voie p53 est inactivée et quecette perte est corrélée avec une augmentation de l'expression d'un nombre de gènes *FANC*. Plus encore, la pertinence de nos observations en matière de cancérologie est soulignée par le potentiel thérapeutique de nos résultats. En effet, nous montrons que des molécules activatrices de la voie p53 (comme la Nutlin) permettent d'augmenter la sensibilité aux agents induisant des dommages à l'ADN des cellules cancéreuses qui retiennent une voie p53 fonctionnelle. Cette stratégie semble prometteuse mais doit être employée avec précaution afin d'éviter les effets secondaires de l'activation de p53 dans les tissus normaux, en particulier dans le compartiment hématopoïétique, comme nous l'avons montré dans notre modèle murin p53<sup>Δ31</sup>.

## **III.** Conclusions

Nos deux modèles murins,p53<sup>Y217C</sup> exprimant une mutation équivalente d'un « *hotspot* » dans les cancers humains et p53<sup>Δ31</sup>délété du domaine C-terminal de p53, nous ont permis de montrer que le juste dosage de p53 est très important pour l'homéostasie des cellules et pour la survie de l'organisme (Figure 17). Une activité faible ou altérée de ce suppresseur de tumeur entraîne le développement rapide de tumeurs très invasives et au potentiel métastatique important. Les souris p53<sup>+/Y217C</sup> modélisent le syndrome Li-Fraumeni de prédisposition aux cancers familiaux. Restaurer la bonne fonction de p53 dans les cellules mutées présente donc un intérêt thérapeutique majeur et les souris p53<sup>Y217C/Y217C</sup> constituent un modèle préclinique pour l'évaluation *in vivo* d'une stratégie anti-tumorale ciblée. Cependant les stratégies qui visent à augmenter l'activité de p53 doivent être appliquées avec précaution et au sein de thérapies individualisées.

En effet, nous avons également montré qu'une sur-activation de p53 peut causer des effets néfastes, notamment une cytotoxicité dans le compartiment hématopoïétique, et ceci en régulant négativement des voies de maintien de la stabilité génomique qui sont la maintenance des télomères et la réparation de l'ADN. Les souris  $p53^{\Delta 31/\Delta 31}$ (suractivées pour p53)modélisent le syndrome télomérique dyskératose congénitale et présentent également des caractéristiques de l'anémie de Fanconi.Ces deux maladies appartiennent au groupe des syndromes d'insuffisance médullaire qui entraînent une mort précoce par aplasie médullaire et prédisposent au cancer. Ce « gardien du génome » constitue donc une épée à double tranchant pour l'organisme et sa régulation fine est d'une importance physiologique majeure. Ses fonctions variées ne cessent d'émerger et nos résultats montrent que cette « tumor protein 53 » est impliquée dans d'autres pathologies que le cancer(voir également l'article n°5, en annexe).



Figure 17 : De la mesure en toute chose : dérégulation de p53, cancer et syndromes d'insuffisance médullaire.

## ANNEXE

# Article n°5

## De la mesure en toute chose: dérégulation de p53, cancer et syndromes télomériques

Sara Jaber, Iva Simeonova et Franck Toledo

## Médecine/Sciences (2013) 12: 1071-1073.

#### NOUVELLE

## De la mesure en toute chose : dérégulation de p53, cancer et syndromes télomériques

Sara Jaber, Iva Simeonova, Franck Toledo

Inactivation de p53 dans les cancers p53 est l'un des facteurs de transcription les plus étudiés du fait de son importance clinique. En effet, le gène TP53 est muté dans plus de la moitié des cancers sporadiques, et la plupart des autres cancers surexpriment Mdm2 ou Mdm4, les principaux régulateurs négatifs de p53. De plus, les mutations germinales de TP53 causent le syndrome Li-Fraumeni de prédisposition au cancer [1]. En réponse à divers stress cellulaires, notamment les cassures d'ADN et les signaux oncogéniques, la protéine p53 est stabilisée et activée. Elle induit alors la transcription de multiples gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence, l'apoptose et diverses régulations métaboliques, qui contribuent à sa fonction de suppresseur de tumeur. Ainsi, p53 empêche la prolifération de cellules dont le génome est altéré, ce qui lui a valu le surnom de « gardien du génome » [2].

La plupart des mutations du gène *TP53* identifiées dans les cancers sont des mutations faux-sens; elles affectent une région centrale de la protéine qui correspond au domaine de liaison à l'ADN qui reconnaît les promoteurs des gènes cibles de p53. Ces mutations sont essentiellement inactivatrices : elles réduisent ou abolissent la capacité de la protéine mutante à lier l'ADN, et donc à réguler ses cibles transcriptionnelles.

La suractivation de p53 cause une dyskératose congénitale chez la souris La protéine p53 contient un second domaine de liaison à l'ADN, en son extrémité carboxy-terminale (*carboxy termi*-

> m/s n° 12, vol. 29, décembre 2013 D01 : 10.1051/medsci/20132912003

nal domain ou CTD) [3]. La fonction du CTD restait toutefois controversée, d'autant plus que ce domaine est sujet à de nombreuses modifications post-traductionnelles aux effets régulateurs opposés. Pour mieux comprendre le rôle du CTD *in vivo*, notre équipe a créé une souris qui exprime une p53 tronquée de son domaine carboxy-terminal (p53<sup>A31</sup>), via l'intégration par recombinaison homologue d'une mutation non-sens au locus p53 dans des cellules souches embryonnaires [4].

L'analyse des souris p53431/431 a clairement montré que la délétion du CTD entraîne une augmentation de l'activité de p53, indiquant ainsi que le CTD exerce essentiellement un rôle régulateur négatif. Plus intéressant encore, la plupart de ces souris meurent rapidement après la naissance, en présentant les symptômes caractéristiques d'un dysfonctionnement télomérique [4]. Ces souris souffrent notamment d'aplasie médullaire et de fibrose pulmonaire, et leurs cellules ont des télomères anormalement courts (Figure 1). En fait, ces souris présentent la plupart des signes cliniques d'une dyskératose congénitale (DC), l'archétype des syndromes télomériques (Tableau I) [5]. Ces résultats indiquent que p53 joue un rôle majeur, auparavant insoupçonné, dans la régulation du métabolisme des télomères.

Nous avons ensuite montré que l'activation de p53 conduit à une diminution de l'expression de quatre gènes impliqués

dans le maintien des télomères : Dyskerin (Dkc1), Rtel1, Tinf2 et Terf1 [4, 6] (→).

(→) Voir la Synthèse de T. Le Guen *et al.*, page 1138 de ce numéro <sup>1</sup>Génétique de la suppression tumorale, Institut Curie, centre de recherche, CNRS UMR 3244, UPMC Université Paris 6, 26, rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France. <u>franck.toledo@curie.fr</u>

Ces observations semblaient particulièrement importantes puisque chez l'homme la mutation de *Dkc1*, *Rtel1* ou *Tinf2* peut causer une dyskératose congénitale, alors que *Terf1* a été impliqué dans l'aplasie médullaire. En utilisant des souris  $p53^{d31/d31}$  de fonds génétiques différents, nous avons également observé qu'un niveau plus élevé de Rtel1 permet d'atténuer la sévérité des symptômes des souris atteintes. Le phénotype télomérique causé par la délétion du CTD dépend donc des niveaux d'expression d'au moins l'un des gènes télomériques régulés par p53.

#### La suractivation de p53 peut-elle causer une dyskératose congénitale chez l'homme ?

Nos résultats chez la souris posent évidemment la question de leur pertinence en santé humaine. À ce titre, il est tout d'abord important de constater que les domaines carboxy-terminaux des protéines p53 murine et humaine sont très conservés. Par ailleurs, nous avons ciblé la mutation codant p53<sup>∆31</sup>, ainsi que trois autres mutations non-sens codant respectivement  $p53^{\Delta36}$ ,  $p53^{\Delta45}$  ou  $p53^{\Delta52}$ , dans des fibroblastes embryonnaires murins par recombinaison homologue de type Cre/Lox. De ces quatre mutations affectant l'exon 10 du gène p53 murin, seules les deux dernières entraînent des niveaux plus faibles d'expression et d'activité de p53. Or les mutations nonsens équivalentes recensées dans les cancers humains codent également pour une p53 tronquée d'au moins 45 acides aminés [4]. Par ailleurs, une fraction importante des patients atteints de dyskératose congénitale (ou de son

1071



variant sévère le syndrome d'Hoyeraal-Hreidarsson [6]) ont des mutations dans les gènes *DKC1* ou *RTEL1*, et nous avons montré que, comme chez la souris, l'activation de la p53 humaine entraîne une diminution de l'expression de ces deux gènes.

Étant donné que les mutations des gènes dont l'implication dans une dyskératose congénitale a été identifiée n'expliquent que 50 % des cas cliniques, il devrait être intéressant de rechercher des mutations du gène *TP53* chez les patients souffrant d'un syndrome télomérique dont l'origine moléculaire reste inexpliquée.

Importance d'un dosage précis de p53 Outre sa fonction bien connue de suppresseur de tumeurs, p53 intervient dans des processus très variés tels que la longévité, la fertilité et la production de cellules souches. P53 est également impliquée dans certaines maladies comme le diabète et

différentes maladies neurodégénératives [7, 8] (→).

(→) Voir la Synthèse de M. Lacroix et al., page 1125 de ce numéro

m/s n° 12, vol. 29, décembre 2013

Ces multiples fonctions justifient l'existence d'une régulation précise de p53 *via* – entre autres – ses principaux régulateurs négatifs Mdm2 et Mdm4.

De fait, plusieurs modèles murins ont révélé l'impact de variations des niveaux d'activité de p53. En l'absence de p53, toutes les souris développent des tumeurs, fatales en moins de six mois [9]. À l'inverse, chez les mutants Mdm2-/- ou Mdm4-/-, l'incapacité d'inhiber p53 se traduit par une létalité embryonnaire [10]. Entre ces deux extrêmes, différents phénotypes intermédiaires ont été observés. Par exemple, la plupart des souris exprimant des p53 mutantes dont l'activité est réduite, mais non nulle (p53R172P ou p53<sup>∆P</sup>), développent des tumeurs dans la deuxième année de leur vie [11, 12]. Les souris Super-p53, dont l'activité de p53 est une fois et demi supérieure à la normale, développent moins de tumeurs que les souris sauvages [13]. Des souris p53+/m, exprimant une p53 mutante avec une activité un peu plus forte, sont également

Figure 1. Les souris exprimant la p53<sup>431</sup> présentent des caractéristiques de dyskératose congénitale. A. Marquage hématoxyline et éosine d'une section de sternum. La rareté des cellules (en bleu) dans la moelle osseuse de ces souris indique un défaut d'hématopoièse. B. Marquage au trichrome de Masson d'une section de poumon. La coloration intense du collagène (en vert) démontre une fibrose pulmonaire. C. Analyse de la longueur des télomères par FISH quantitative avec une sonde spécifique des télomères (en rouge). La faible intensité du signal indique que les chromosomes des cellules mutantes ont des télomères anormalement courts.

résistantes au développement tumoral, mais souffrent d'un vieillissement accéléré [14]. Notre étude montre que dans les souris p53431/431, une activité de p53 encore plus élevée conduit à un raccourcissement télomérique et à une aplasie médullaire, entraînant la mort avant l'âge adulte. Il est important de noter que la plupart des souris p53+/431 (que nous avons observées pendant un an) ne présentent pas de phénotype notable, alors que les animaux p53+/431 Mdm4+/- présentent le même phénotype que les souris p53431/431 [4]. Ces résultats révèlent qu'une variation de l'activité p53 d'un facteur deux est suffisante pour induire ou non une aplasie médullaire létale, ce qui démontre l'importance physiologique de la régulation très précise de p53.

#### Conclusion

De la mesure en toute chose : cette maxime célèbre semble s'appliquer parfaitement à la régulation de p53. En effet, si une activité anormalement basse de p53 favorise l'apparition de cancers, une activité accrue peut conduire à un vieillissement accéléré, voire une létalité prépubère ou même embryonnaire. Nos résultats ont révélé que le contrôle du métabolisme télomérique est une fonction importante de p53, et qu'une régulation fine de cette fonction est nécessaire à la survie de l'animal. Ainsi, plus de

Caractéristiques phénotypiques des patients atteints de DC	Pourcentage des souris p53 <sup>431/431</sup> présentant ces caractéristiques
Caractéristiques physiques (triade diagnostique)	
Hyperpigmentation cutanée Dystrophie unguéale Leucoplasie orale	100 % 8 % 100 %
Symptômes pathologiques	
Aplasie médullaire Fibrose pulmonaire	100 % 87 %
Phénotype moléculaire	
Dysfonctionnement télomérique	100 %
Autres phénotypes potentiellement associés	
Hypertrophie cardiaque Taille réduite Atrophie testiculaire Hyponlasie cérébelleuse	100 % 63 % 91 % (des mâles) 30 %

Tableau I. Manifestations phénotypiques de la dyskératose congénitale (DC) chez les souris p53<sup>431/431</sup>.

30 ans après sa découverte, p53 ne cesse de nous surprendre par l'étendue de ses fonctions, et par la variété des conséquences de sa dérégulation. ◊ Moderation in all things: p53 deregulation, cancer and telomere

syndromes

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

- RÉFÉRENCES
  - 1. Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway : in vitro hypotheses, in vivo veritas. Nat Rev Cancer 2006 ; 6:909-23.





La Fondation de coopération scientifique PremUp, unique en Europe, intervient sur la prévention du handicap à la naissance, par la protection de la santé de la femme enceinte et du nouveau-né.

- Information et sensibilisation de la société civile, · Recherche interdisciplinaire sur de grands projets prioritaires,
- · Soins et formation des professionnels en périnatalité.

Reconnue d'utilité publique, la Fondation a été créée il y a cinq ans à l'initiative des Ministères de la Recherche et de la Santé.

Ses membres fondateurs en 2013 sont l'AP-HP, le CHI de Créteil, l'Inserm, l'IRD et les universités Paris Descartes, Paris Diderot, Pierre et Marie Curie et Paris Sud.

La Fondation regroupe un pôle de soins prenant en charge chaque année plus de 20.000 naissances (les Maternités et Services de néonatologie des hôpitaux Robert Debré, Antoine Béclère/Clamart, Armand Trousseau et Kremlin Bicêtre, du Centre Hospitalier Cochin Port-Royal et du Centre hospitalier intercommunal de Créteil) - et un pôle interdisciplinaire de 220 chercheurs coopérant sur la mère et l'enfant.

Grâce à son statut juridique particulier, cette structure d'utilité publique représente une passerelle entre le secteur public et le secteur privé et permet d'initier de grands projets de recherche interdisciplinaires sur la prématurité et le Retard de Croissance Intra Utérin notamment.



m/s n° 12, vol. 29, décembre 2013

Abonnez-vous à médecine/sciences **Bulletin d'abonnement** page 1104 dans ce numéro de m/s

binding domain is contained in the C-terminus of wild type p53 protein. Nucleic Acids Res 1991 ; 19 : 5191-8.

1992:358:15-6.

- 4. Simeonova I, Jaber S, Draskovic I, et al. Mutant mice lacking the p53 C-terminal domain model telomere syndromes. Cell Rep 2013 ; 3 : 2046-58.
- 5. Hoareau-Aveilla C, Henry Y, Leblanc T. La dyskératose congénitale. Med Sci (Paris) 2008 ; 24 : 390-8.
- 6. Le Guen T, Jullien L, Schertzer M, et al. RTEL1 (regulator of telomere elongation helicase I), une hélicase d'ADN essentielle à la stabilité du génome. Med Sci (Paris) 2013;29:1138-44.
- 7. Brady CA, Attardi LD. p53 at a glance. J Cell Sci 2010 ; 123:2527-32.
- 8. Lacroix M, Linares LK, Le Cam L. Rôle du suppresseur de tumeur p53 dans le contrôle du métabolisme. Med Sci (Paris) 2013; 29: 1125-30.
- 9. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours, Nature 1992 : 356 : 215-21.
- 10. Marine JC, Francoz S, Maetens M, et al. Keeping p53 in check : essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. Cell Death Differ 2006 ; 13 : 927-34.
- 11. Liu G, Parant JM, Lang G, et al., Chromosome stability, in the absence of apoptosis, is critical for suppression of tumorigenesis in Trp53 mutant mice. Nat Genet 2004;36:63-8.
- 12. Fang M, Simeonova I, Bardot B, et al. Mdm4 loss in mice expressing a p53 hypomorph alters tumor spectrum without improving survival. Oncogene, 2013; doi : 10.1038/onc 2013.62.2013
- 13. García-Cao I, García-Cao M, Martín-Caballero J, et al. EMBO J 2002; 21:6225-35.
- 14. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, et al. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. Nature 2002 ; 415 : 45-53.

u u

VICI 1

1073

## **BIBLIOGRAPHIES**

- 1. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell***144**, 646-74 (2011).
- 2. Torre, L.A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin***65**, 87-108 (2015).
- 3. Bray, F. & Moller, B. Predicting the future burden of cancer. *Nat Rev Cancer***6**, 63-74 (2006).
- 4. Tabassum, D.P. & Polyak, K. Tumorigenesis: it takes a village. *Nat Rev Cancer***15**, 473-83 (2015).
- 5. Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med***10**, 789-99 (2004).
- 6. Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. The Path to Cancer --Three Strikes and You're Out. *N Engl J Med***373**, 1895-8 (2015).
- 7. Freed-Pastor, W.A. & Prives, C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev***26**, 1268-86 (2012).
- 8. Linzer, D.I. & Levine, A.J. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell***17**, 43-52 (1979).
- 9. Kress, M., May, E., Cassingena, R. & May, P. Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol***31**, 472-83 (1979).
- Melero, J.A., Stitt, D.T., Mangel, W.F. & Carroll, R.B. Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and -transformed cells. *Virology*93, 466-80 (1979).
- 11. Smith, A.E., Smith, R. & Paucha, E. Characterization of different tumor antigens present in cells transformed by simian virus 40. *Cell***18**, 335-46 (1979).
- 12. Lane, D. & Levine, A. p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb Perspect Biol***2**, a000893 (2010).
- 13. Brady, C.A. & Attardi, L.D. p53 at a glance. *J Cell Sci***123**, 2527-32 (2010).
- 14. Kenzelmann Broz, D. & Attardi, L.D. In vivo analysis of p53 tumor suppressor function using genetically engineered mouse models. *Carcinogenesis***31**, 1311-8 (2010).
- 15. Belyi, V.A. *et al.* The origins and evolution of the p53 family of genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol***2**, a001198 (2010).
- 16. Dotsch, V., Bernassola, F., Coutandin, D., Candi, E. & Melino, G. p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol***2**, a004887 (2010).
- 17. Surget, S., Khoury, M.P. & Bourdon, J.C. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *Onco Targets Ther***7**, 57-68 (2013).
- 18. Candi, E., Agostini, M., Melino, G. & Bernassola, F. How the TP53 family proteins TP63 and TP73 contribute to tumorigenesis: regulators and effectors. *Hum Mutat***35**, 702-14 (2014).
- 19. Meek, D.W. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochem J***469**, 325-46 (2015).
- 20. Abegglen, L.M. *et al.* Potential Mechanisms for Cancer Resistance in Elephants and Comparative Cellular Response to DNA Damage in Humans. *JAMA***314**, 1850-60 (2015).

- 21. Azpurua, J. & Seluanov, A. Long-lived cancer-resistant rodents as new model species for cancer research. *Front Genet***3**, 319 (2012).
- 22. Toledo, F. & Wahl, G.M. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer***6**, 909-23 (2006).
- 23. Karni-Schmidt, O., Lokshin, M. & Prives, C. The Roles of MDM2 and MDMX in Cancer. *Annu Rev Pathol* (2016).
- 24. Van Nostrand, J.L. & Attardi, L.D. Guilty as CHARGED: p53's expanding role in disease. *Cell Cycle***13**, 3798-807 (2014).
- 25. Pant, V. & Lozano, G. Limiting the power of p53 through the ubiquitin proteasome pathway. *Genes Dev***28**, 1739-51 (2014).
- 26. Gansmo, L.B. *et al.* MDM4 SNP34091 (rs4245739) and its effect on breast-, colon-, lung-, and prostate cancer risk. *Cancer Med***4**, 1901-7 (2015).
- 27. Ofir-Rosenfeld, Y., Boggs, K., Michael, D., Kastan, M.B. & Oren, M. Mdm2 regulates p53 mRNA translation through inhibitory interactions with ribosomal protein L26. *Mol Cell***32**, 180-9 (2008).
- 28. Karakostis, K. *et al.* p53 mRNA and p53 Protein Structures Have Evolved Independently to Interact with MDM2. *Mol Biol Evol***33**, 1280-92 (2016).
- 29. Khoury, K., Popowicz, G.M., Holak, T.A. & Domling, A. The p53-MDM2/MDMX axis A chemotype perspective. *Medchemcomm***2**, 246-260 (2011).
- 30. Hao, Q. & Cho, W.C. Battle against cancer: an everlasting saga of p53. *Int J Mol Sci***15**, 22109-27 (2014).
- 31. Deng, Q. *et al.* The dichotomy of p53 regulation by noncoding RNAs. *J Mol Cell Biol***6**, 198-205 (2014).
- 32. Joerger, A.C. & Fersht, A.R. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem***77**, 557-82 (2008).
- 33. Varna, M., Bousquet, G., Plassa, L.F., Bertheau, P. & Janin, A. TP53 status and response to treatment in breast cancers. *J Biomed Biotechnol***2011**, 284584 (2011).
- 34. Ithuralde, R.E. & Turjanski, A.G. Phosphorylation Regulates the Bound Structure of an Intrinsically Disordered Protein: The p53-TAZ2 Case. *PLoS One***11**, e0144284 (2016).
- 35. Matt, S. & Hofmann, T.G. The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells. *Cell Mol Life Sci* (2016).
- 36. Lin, J., Chen, J., Elenbaas, B. & Levine, A.J. Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes Dev***8**, 1235-46 (1994).
- 37. Brady, C.A. *et al.* Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. *Cell***145**, 571-83 (2011).
- 38. Jiang, D. *et al.* Full p53 transcriptional activation potential is dispensable for tumor suppression in diverse lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A***108**, 17123-8 (2011).
- 39. Van Nostrand, J.L. *et al.*Inappropriate p53 activation during development induces features of CHARGE syndrome. *Nature***514**, 228-32 (2014).
- 40. Garcia, P.B. & Attardi, L.D. Illuminating p53 function in cancer with genetically engineered mouse models. *Semin Cell Dev Biol***27**, 74-85 (2014).
- 41. Zhang, Y. & Xiong, Y. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science***292**, 1910-5 (2001).

- 42. Toledo, F. *et al.* Mouse mutants reveal that putative protein interaction sites in the p53 proline-rich domain are dispensable for tumor suppression. *Mol Cell Biol***27**, 1425-32 (2007).
- 43. Slatter, T.L. *et al.* p53-mediated apoptosis prevents the accumulation of progenitor B cells and B-cell tumors. *Cell Death Differ***17**, 540-50 (2010).
- 44. Campbell, H.G. *et al.* Activation of p53 following ionizing radiation, but not other stressors, is dependent on the proline-rich domain (PRD). *Oncogene***32**, 827-36 (2013).
- 45. Chand, H.S. *et al.* A genetic variant of p53 restricts the mucous secretory phenotype by regulating SPDEF and Bcl-2 expression. *Nat Commun***5**, 5567 (2014).
- 46. Frank, A.K. *et al.* The codon 72 polymorphism of p53 regulates interaction with NF-{kappa}B and transactivation of genes involved in immunity and inflammation. *Mol Cell Biol***31**, 1201-13 (2011).
- 47. Zhu, F. *et al.* Mouse models for the p53 R72P polymorphism mimic human phenotypes. *Cancer Res***70**, 5851-9 (2010).
- 48. el-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet***1**, 45-9 (1992).
- 49. Joerger, A.C. & Fersht, A.R. The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harb Perspect Biol***2**, a000919 (2010).
- 50. Kitayner, M. *et al.* Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers. *Mol Cell***22**, 741-53 (2006).
- 51. Li, T. *et al.* Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell***149**, 1269-83 (2012).
- 52. Li, T. *et al.* Loss of p53-mediated cell-cycle arrest, senescence and apoptosis promotes genomic instability and premature aging. *Oncotarget***7**, 11838-49 (2016).
- 53. Yang, W.H. *et al.* Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat Cell Biol***8**, 1074-83 (2006).
- 54. Gu, B. & Zhu, W.G. Surf the post-translational modification network of p53 regulation. *Int J Biol Sci***8**, 672-84 (2012).
- 55. Muller, P.A. & Vousden, K.H. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol***15**, 2-8 (2013).
- 56. Arbely, E. *et al.* Acetylation of lysine 120 of p53 endows DNA-binding specificity at effective physiological salt concentration. *Proc Natl Acad Sci U S A***108**, 8251-6 (2011).
- 57. Stommel, J.M. *et al.* A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J***18**, 1660-72 (1999).
- 58. Ayed, A. *et al.* Latent and active p53 are identical in conformation. *Nat Struct Biol***8**, 756-60 (2001).
- 59. Fernandez-Fernandez, M.R., Veprintsev, D.B. & Fersht, A.R. Proteins of the S100 family regulate the oligomerization of p53 tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A***102**, 4735-40 (2005).
- 60. Frazier, D.P. *et al.* Dmp1 physically interacts with p53 and positively regulates p53's stability, nuclear localization, and function. *Cancer Res***72**, 1740-50 (2012).
- 61. Li, M. *et al.* Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature***416**, 648-53 (2002).

- 62. Okamoto, T. *et al.* Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene***19**, 6194-202 (2000).
- 63. Sui, G. *et al.* Yin Yang 1 is a negative regulator of p53. *Cell***117**, 859-72 (2004).
- 64. Nakamura, S., Roth, J.A. & Mukhopadhyay, T. Multiple lysine mutations in the Cterminal domain of p53 interfere with MDM2-dependent protein degradation and ubiquitination. *Mol Cell Biol***20**, 9391-8 (2000).
- 65. Bode, A.M. & Dong, Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer***4**, 793-805 (2004).
- 66. Carvajal, L.A. & Manfredi, J.J. Another fork in the road--life or death decisions by the tumour suppressor p53. *EMBO Rep***14**, 414-21 (2013).
- 67. Koh, D.I. *et al.* KAISO, a critical regulator of p53-mediated transcription of CDKN1A and apoptotic genes. *Proc Natl Acad Sci U S A***111**, 15078-83 (2014).
- 68. Krummel, K.A., Lee, C.J., Toledo, F. & Wahl, G.M. The C-terminal lysines fine-tune P53 stress responses in a mouse model but are not required for stability control or transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A***102**, 10188-93 (2005).
- 69. Feng, L., Lin, T., Uranishi, H., Gu, W. & Xu, Y. Functional analysis of the roles of posttranslational modifications at the p53 C terminus in regulating p53 stability and activity. *Mol Cell Biol***25**, 5389-95 (2005).
- 70. Wang, Y.V. *et al.* Fine-tuning p53 activity through C-terminal modification significantly contributes to HSC homeostasis and mouse radiosensitivity. *Genes Dev***25**, 1426-38 (2011).
- 71. Bruins, W. *et al.* Increased sensitivity to UV radiation in mice with a p53 point mutation at Ser389. *Mol Cell Biol***24**, 8884-94 (2004).
- 72. Zhou, X. *et al.* COOH-terminal domain of p53 modulates p53-mediated transcriptional transactivation, cell growth, and apoptosis. *Cancer Res***59**, 843-8 (1999).
- 73. Pellegata, N.S., Cajot, J.F. & Stanbridge, E.J. The basic carboxy-terminal domain of human p53 is dispensable for both transcriptional regulation and inhibition of tumor cell growth. *Oncogene***11**, 337-49 (1995).
- 74. Chen, X., Ko, L.J., Jayaraman, L. & Prives, C. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev***10**, 2438-51 (1996).
- 75. Kim, E. & Deppert, W. The versatile interactions of p53 with DNA: when flexibility serves specificity. *Cell Death Differ***13**, 885-9 (2006).
- 76. Laptenko, O. & Prives, C. Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ***13**, 951-61 (2006).
- 77. Sauer, M. *et al.* C-terminal diversity within the p53 family accounts for differences in DNA binding and transcriptional activity. *Nucleic Acids Res***36**, 1900-12 (2008).
- 78. Espinosa, J.M. & Emerson, B.M. Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell***8**, 57-69 (2001).
- 79. Kaeser, M.D. & Iggo, R.D. Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A***99**, 95-100 (2002).
- 80. McKinney, K., Mattia, M., Gottifredi, V. & Prives, C. p53 linear diffusion along DNA requires its C terminus. *Mol Cell***16**, 413-24 (2004).

- 81. Tafvizi, A., Huang, F., Fersht, A.R., Mirny, L.A. & van Oijen, A.M. A single-molecule characterization of p53 search on DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A***108**, 563-8 (2011).
- 82. Hamard, P.J., Lukin, D.J. & Manfredi, J.J. p53 basic C terminus regulates p53 functions through DNA binding modulation of subset of target genes. *J Biol Chem***287**, 22397-407 (2012).
- 83. Kim, H. *et al.* p53 requires an intact C-terminal domain for DNA binding and transactivation. *J Mol Biol***415**, 843-54 (2012).
- 84. D'Abramo, M. *et al.* The p53 tetramer shows an induced-fit interaction of the C-terminal domain with the DNA-binding domain. *Oncogene* (2015).
- 85. Barlev, N.A. *et al.* Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell***8**, 1243-54 (2001).
- 86. Mujtaba, S. *et al.* Structural mechanism of the bromodomain of the coactivator CBP in p53 transcriptional activation. *Mol Cell***13**, 251-63 (2004).
- 87. Luo, J. *et al.* Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A***101**, 2259-64 (2004).
- 88. Friedler, A., Veprintsev, D.B., Freund, S.M., von Glos, K.I. & Fersht, A.R. Modulation of binding of DNA to the C-terminal domain of p53 by acetylation. *Structure***13**, 629-36 (2005).
- 89. Poyurovsky, M.V. *et al.* The C terminus of p53 binds the N-terminal domain of MDM2. *Nat Struct Mol Biol***17**, 982-9 (2010).
- 90. Ahn, J. & Prives, C. The C-terminus of p53: the more you learn the less you know. *Nat Struct Biol***8**, 730-2 (2001).
- 91. Beckerman, R. & Prives, C. Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol***2**, a000935 (2010).
- 92. Gamper, A.M. & Roeder, R.G. Multivalent binding of p53 to the STAGA complex mediates coactivator recruitment after UV damage. *Mol Cell Biol***28**, 2517-27 (2008).
- 93. Meyer, K.D., Lin, S.C., Bernecky, C., Gao, Y. & Taatjes, D.J. p53 activates transcription by directing structural shifts in Mediator. *Nat Struct Mol Biol***17**, 753-60 (2010).
- 94. Wei, C.L. *et al.* A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell***124**, 207-19 (2006).
- 95. Ma, B., Pan, Y., Zheng, J., Levine, A.J. & Nussinov, R. Sequence analysis of p53 response-elements suggests multiple binding modes of the p53 tetramer to DNA targets. *Nucleic Acids Res***35**, 2986-3001 (2007).
- 96. Riley, T., Sontag, E., Chen, P. & Levine, A. Transcriptional control of human p53regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol***9**, 402-12 (2008).
- 97. Simeonova, I. *et al.* Fuzzy tandem repeats containing p53 response elements may define species-specific p53 target genes. *PLoS Genet***8**, e1002731 (2012).
- 98. Morin, A. *et al.* Of mice and men: fuzzy tandem repeats and divergent p53 transcriptional repertoires. *Transcription***4**, 67-71 (2013).
- 99. Menendez, D., Inga, A. & Resnick, M.A. The expanding universe of p53 targets. *Nat Rev Cancer***9**, 724-37 (2009).
- 100. Terakawa, T. & Takada, S. p53 dynamics upon response element recognition explored by molecular simulations. *Sci Rep***5**, 17107 (2015).
- 101. Kearns, S., Lurz, R., Orlova, E.V. & Okorokov, A.L. Two p53 tetramers bind one consensus DNA response element. *Nucleic Acids Res* (2016).

- 102. Liao, J.M. *et al.* TFIIS.h, a new target of p53, regulates transcription efficiency of pro-apoptotic bax gene. *Sci Rep***6**, 23542 (2016).
- 103. Unruhe, B., Schroder, E., Wunsch, D. & Knauer, S.K. An Old Flame Never Dies: Survivin in Cancer and Cellular Senescence. *Gerontology***62**, 173-81 (2016).
- 104. Imbriano, C. *et al.* Direct p53 transcriptional repression: in vivo analysis of CCAAT-containing G2/M promoters. *Mol Cell Biol***25**, 3737-51 (2005).
- 105. He, L. *et al.* A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature***447**, 1130-4 (2007).
- 106. Huarte, M. *et al.* A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell***142**, 409-19 (2010).
- 107. Hung, T. *et al.* Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nat Genet***43**, 621-9 (2011).
- 108. Benson, E.K. *et al.* p53-dependent gene repression through p21 is mediated by recruitment of E2F4 repression complexes. *Oncogene***33**, 3959-69 (2014).
- 109. Fischer, M., Steiner, L. & Engeland, K. The transcription factor p53: not a repressor, solely an activator. *Cell Cycle***13**, 3037-58 (2014).
- 110. Fischer, M., Quaas, M., Steiner, L. & Engeland, K. The p53-p21-DREAM-CDE/CHR pathway regulates G2/M cell cycle genes. *Nucleic Acids Res***44**, 164-74 (2016).
- 111. Petitjean, A. *et al.* Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat***28**, 622-9 (2007).
- 112. Malkin, D. *et al.* Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science***250**, 1233-8 (1990).
- 113. Donehower, L.A. *et al.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature***356**, 215-21 (1992).
- 114. Mizuno, H., Spike, B.T., Wahl, G.M. & Levine, A.J. Inactivation of p53 in breast cancers correlates with stem cell transcriptional signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A***107**, 22745-50 (2010).
- 115. Song, H., Hollstein, M. & Xu, Y. p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. *Nat Cell Biol***9**, 573-80 (2007).
- 116. Olivier, M. & Taniere, P. Somatic mutations in cancer prognosis and prediction: lessons from TP53 and EGFR genes. *Curr Opin Oncol***23**, 88-92 (2011).
- 117. Bieging, K.T., Mello, S.S. & Attardi, L.D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer***14**, 359-70 (2014).
- 118. Speidel, D. The role of DNA damage responses in p53 biology. *Arch Toxicol***89**, 501-17 (2015).
- 119. Deng, Y., Chan, S.S. & Chang, S. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer***8**, 450-8 (2008).
- 120. Ceccaldi, R. *et al.* Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell***11**, 36-49 (2012).
- 121. Lane, D.P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature***358**, 15-6 (1992).
- 122. Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J. & Leder, P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*82, 675-84 (1995).
- 123. Martin-Caballero, J., Flores, J.M., Garcia-Palencia, P. & Serrano, M. Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res***61**, 6234-8 (2001).
- 124. Doumont, G. *et al.* G1 checkpoint failure and increased tumor susceptibility in mice lacking the novel p53 target Ptprv. *EMBO J***24**, 3093-103 (2005).

- 125. Basak, S. *et al.* The metastasis-associated gene Prl-3 is a p53 target involved in cell-cycle regulation. *Mol Cell***30**, 303-14 (2008).
- 126. Zilfou, J.T. & Lowe, S.W. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol***1**, a001883 (2009).
- 127. Wang, X.W. *et al.* GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A***96**, 3706-11 (1999).
- 128. Kruiswijk, F., Labuschagne, C.F. & Vousden, K.H. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nat Rev Mol Cell Biol***16**, 393-405 (2015).
- 129. Yeo, C.Q. *et al.* p53 Maintains Genomic Stability by Preventing Interference between Transcription and Replication. *Cell Rep***15**, 132-46 (2016).
- 130. Park, J.H., Zhuang, J., Li, J. & Hwang, P.M. p53 as guardian of the mitochondrial genome. *FEBS Lett***590**, 924-34 (2016).
- 131. Pearl, L.H., Schierz, A.C., Ward, S.E., Al-Lazikani, B. & Pearl, F.M. Therapeutic opportunities within the DNA damage response. *Nat Rev Cancer***15**, 166-80 (2015).
- 132. Jeggo, P.A., Pearl, L.H. & Carr, A.M. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nat Rev Cancer***16**, 35-42 (2016).
- 133. Hayflick, L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res***37**, 614-36 (1965).
- 134. Warfel, N.A. & El-Deiry, W.S. p21WAF1 and tumourigenesis: 20 years after. *Curr Opin Oncol***25**, 52-8 (2013).
- 135. Zhang, X.W. *et al.* UBTD1 induces cellular senescence through an UBTD1-Mdm2/p53 positive feedback loop. *J Pathol***235**, 656-67 (2015).
- 136. Lujambio, A. *et al.* Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. *Cell***153**, 449-60 (2013).
- 137. Childs, B.G., Baker, D.J., Kirkland, J.L., Campisi, J. & van Deursen, J.M. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep***15**, 1139-53 (2014).
- 138. Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B. & Andrews, D.W. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol***5**, a008714 (2013).
- 139. Stedman, A. *et al.* Ribosome biogenesis dysfunction leads to p53-mediated apoptosis and goblet cell differentiation of mouse intestinal stem/progenitor cells. *Cell Death Differ***22**, 1865-76 (2015).
- 140. Eischen, C.M., Weber, J.D., Roussel, M.F., Sherr, C.J. & Cleveland, J.L. Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev***13**, 2658-69 (1999).
- 141. Aurelio, O.N., Kong, X.T., Gupta, S. & Stanbridge, E.J. p53 mutants have selective dominant-negative effects on apoptosis but not growth arrest in human cancer cell lines. *Mol Cell Biol***20**, 770-8 (2000).
- 142. Dashzeveg, N., Yogosawa, S. & Yoshida, K. Transcriptional induction of protein kinase C delta by p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage. *Cancer Lett***374**, 167-74 (2016).
- 143. Kung, C.P., Khaku, S., Jennis, M., Zhou, Y. & Murphy, M.E. Identification of TRIML2, a novel p53 target, that enhances p53 SUMOylation and regulates the transactivation of proapoptotic genes. *Mol Cancer Res***13**, 250-62 (2015).
- 144. Hall, J.R. *et al.* Long noncoding RNA lincRNA-p21 is the major mediator of UVBinduced and p53-dependent apoptosis in keratinocytes. *Cell Death Dis***6**, e1700 (2015).

- 145. Vaseva, A.V. & Moll, U.M. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta***1787**, 414-20 (2009).
- 146. Green, D.R. & Kroemer, G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature***458**, 1127-30 (2009).
- 147. Follis, A.V. *et al.* The DNA-binding domain mediates both nuclear and cytosolic functions of p53. *Nat Struct Mol Biol***21**, 535-43 (2014).
- 148. Le Pen, J. *et al.* Constitutive p53 heightens mitochondrial apoptotic priming and favors cell death induction by BH3 mimetic inhibitors of BCL-xL. *Cell Death Dis***7**, e2083 (2016).
- 149. Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H. & Vandenabeele, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol***15**, 135-47 (2014).
- 150. Ying, Y. & Padanilam, B.J. Regulation of necrotic cell death: p53, PARP1 and cyclophilin D-overlapping pathways of regulated necrosis? *Cell Mol Life Sci* (2016).
- 151. Kenzelmann Broz, D. & Attardi, L.D. TRP53 activates a global autophagy program to promote tumor suppression. *Autophagy***9**, 1440-2 (2013).
- 152. Contractor, T. & Harris, C.R. p53 negatively regulates transcription of the pyruvate dehydrogenase kinase Pdk2. *Cancer Res***72**, 560-7 (2012).
- 153. Zhang, C. *et al.* Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proc Natl Acad Sci U S A***108**, 16259-64 (2011).
- 154. Traenka, C. *et al.* Role of LIM and SH3 protein 1 (LASP1) in the metastatic dissemination of medulloblastoma. *Cancer Res***70**, 8003-14 (2010).
- 155. Wang, B., Feng, P., Xiao, Z. & Ren, E.C. LIM and SH3 protein 1 (Lasp1) is a novel p53 transcriptional target involved in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol***50**, 528-37 (2009).
- 156. Zhang, M. PTEN in action: coordinating with p53 to regulate maspin gene expression. *Cell Cycle***8**, 1112-3 (2009).
- 157. Kim, M.P., Zhang, Y. & Lozano, G. Mutant p53: Multiple Mechanisms Define Biologic Activity in Cancer. *Front Oncol***5**, 249 (2015).
- 158. Muller, P.A. & Vousden, K.H. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell***25**, 304-17 (2014).
- 159. Szymanska, K. & Hainaut, P. TP53 and mutations in human cancer. *Acta Biochim Pol***50**, 231-8 (2003).
- 160. Lasky, T. & Magder, L. Hepatocellular carcinoma p53 G > T transversions at codon 249: the fingerprint of aflatoxin exposure? *Environ Health Perspect*105, 392-7 (1997).
- 161. Denissenko, M.F. *et al.* The p53 codon 249 mutational hotspot in hepatocellular carcinoma is not related to selective formation or persistence of aflatoxin B1 adducts. *Oncogene***17**, 3007-14 (1998).
- 162. Vineis, P., Matullo, G. & Manuguerra, M. An evolutionary paradigm for carcinogenesis? *J Epidemiol Community Health* **57**, 89-95 (2003).
- 163. Liu, Y. *et al.* Deletions linked to TP53 loss drive cancer through p53-independent mechanisms. *Nature***531**, 471-5 (2016).
- 164. Leroy, B., Anderson, M. & Soussi, T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Hum Mutat***35**, 672-88 (2014).
- 165. Li, F.P. *et al.* A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res***48**, 5358-62 (1988).

- 166. Kamihara, J., Rana, H.Q. & Garber, J.E. Germline TP53 mutations and the changing landscape of Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat***35**, 654-62 (2014).
- 167. Nichols, K.E., Malkin, D., Garber, J.E., Fraumeni, J.F., Jr. & Li, F.P. Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev***10**, 83-7 (2001).
- 168. Gonzalez, K.D. *et al.* Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J Clin Oncol***27**, 1250-6 (2009).
- 169. Hisada, M., Garber, J.E., Fung, C.Y., Fraumeni, J.F., Jr. & Li, F.P. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. *J Natl Cancer Inst***90**, 606-11 (1998).
- 170. Joerger, A.C., Ang, H.C. & Fersht, A.R. Structural basis for understanding oncogenic p53 mutations and designing rescue drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A***103**, 15056-61 (2006).
- 171. Soussi, T. & Wiman, K.G. TP53: an oncogene in disguise. *Cell Death Differ***22**, 1239-49 (2015).
- 172. Zhang, Y., Coillie, S.V., Fang, J.Y. & Xu, J. Gain of function of mutant p53: R282W on the peak? *Oncogenesis***5**, e196 (2016).
- 173. Liu, D.P., Song, H. & Xu, Y. A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. *Oncogene***29**, 949-56 (2010).
- 174. Weissmueller, S. *et al.* Mutant p53 drives pancreatic cancer metastasis through cell-autonomous PDGF receptor beta signaling. *Cell***157**, 382-94 (2014).
- 175. Xiong, S. *et al.* Pla2g16 phospholipase mediates gain-of-function activities of mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A***111**, 11145-50 (2014).
- 176. Lang, G.A. *et al.* Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell***119**, 861-72 (2004).
- 177. Walerych, D., Lisek, K. & Del Sal, G. Mutant p53: One, No One, and One Hundred Thousand. *Front Oncol***5**, 289 (2015).
- 178. Zhu, J. *et al.* Gain-of-function p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth. *Nature***525**, 206-11 (2015).
- 179. Liu, X. *et al.* Small molecule induced reactivation of mutant p53 in cancer cells. *Nucleic Acids Res***41**, 6034-44 (2013).
- 180. Accordino, S.R., Rodriguez Fris, J.A. & Appignanesi, G.A. Wrapping effects within a proposed function-rescue strategy for the Y220C oncogenic mutation of protein p53. *PLoS One***8**, e55123 (2013).
- 181. Zawacka-Pankau, J. & Selivanova, G. Pharmacological reactivation of p53 as a strategy to treat cancer. *J Intern Med***277**, 248-59 (2015).
- 182. Gurpinar, E. & Vousden, K.H. Hitting cancers' weak spots: vulnerabilities imposed by p53 mutation. *Trends Cell Biol***25**, 486-95 (2015).
- 183. Boeckler, F.M. *et al.* Targeted rescue of a destabilized mutant of p53 by an in silico screened drug. *Proc Natl Acad Sci U S A***105**, 10360-5 (2008).
- 184. Joerger, A.C. *et al.* Exploiting Transient Protein States for the Design of Small-Molecule Stabilizers of Mutant p53. *Structure***23**, 2246-55 (2015).
- 185. Cheok, C.F. & Lane, D.P. Seeking synergy in p53 transcriptional activation for cancer therapy. *Discov Med***14**, 263-71 (2012).
- 186. Parrales, A. & Iwakuma, T. Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. *Front Oncol***5**, 288 (2015).
- 187. Burgess, A. *et al.* Clinical Overview of MDM2/X-Targeted Therapies. *Front Oncol***6**, 7 (2016).

- 188. Pellegrino, M. *et al.* Targeting the MDM2/MDM4 interaction interface as a promising approach for p53 reactivation therapy. *Cancer Res***75**, 4560-72 (2015).
- 189. Nittner, D. *et al.* Synthetic lethality between Rb, p53 and Dicer or miR-17-92 in retinal progenitors suppresses retinoblastoma formation. *Nat Cell Biol***14**, 958-65 (2012).
- 190. Hiraki, M. *et al.* Small-Molecule Reactivation of Mutant p53 to Wild-Type-like p53 through the p53-Hsp40 Regulatory Axis. *Chem Biol***22**, 1206-16 (2015).
- 191. Silden, E. *et al.* Expression of TP53 isoforms p53beta or p53gamma enhances chemosensitivity in TP53(null) cell lines. *PLoS One***8**, e56276 (2013).
- 192. Guo, G. & Cui, Y. New perspective on targeting the tumor suppressor p53 pathway in the tumor microenvironment to enhance the efficacy of immunotherapy. *J Immunother Cancer***3**, 9 (2015).
- 193. Ablain, J., Poirot, B., Esnault, C., Lehmann-Che, J. & de The, H. p53 as an Effector or Inhibitor of Therapy Response. *Cold Spring Harb Perspect Med***6**, a026260 (2016).
- 194. Kung, C.P. *et al.* The P72R Polymorphism of p53 Predisposes to Obesity and Metabolic Dysfunction. *Cell Rep***14**, 2413-25 (2016).
- 195. Wong, S. *et al.* Role of p53, Mitochondrial DNA Deletions, and Paternal Age in Autism: A Case-Control Study. *Pediatrics* (2016).
- 196. Sah, V.P. *et al.* A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nat Genet***10**, 175-80 (1995).
- 197. Pant, V., Quintas-Cardama, A. & Lozano, G. The p53 pathway in hematopoiesis: lessons from mouse models, implications for humans. *Blood***120**, 5118-27 (2012).
- 198. Chung, N.G. & Kim, M. Current insights into inherited bone marrow failure syndromes. *Korean J Pediatr***57**, 337-44 (2014).
- 199. Khincha, P.P. & Savage, S.A. Neonatal manifestations of inherited bone marrow failure syndromes. *Semin Fetal Neonatal Med***21**, 57-65 (2016).
- 200. Holohan, B., Wright, W.E. & Shay, J.W. Cell biology of disease: Telomeropathies: an emerging spectrum disorder. *J Cell Biol***205**, 289-99 (2014).
- 201. Wang, Y., Wang, X., Flores, E.R., Yu, J. & Chang, S. Dysfunctional telomeres induce p53-dependent and independent apoptosis to compromise cellular proliferation and inhibit tumor formation. *Aging Cell* (2016).
- 202. Campisi, J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol***75**, 685-705 (2013).
- 203. Schmidt, J.C. & Cech, T.R. Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. *Genes Dev***29**, 1095-105 (2015).
- 204. Armanios, M. & Blackburn, E.H. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet***13**, 693-704 (2012).
- 205. Heiss, N.S. *et al.* X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet***19**, 32-8 (1998).
- 206. Dokal, I. Dyskeratosis congenita. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program***2011**, 480-6 (2011).
- 207. Alter, B.P., Giri, N., Savage, S.A. & Rosenberg, P.S. Cancer in dyskeratosis congenita. *Blood***113**, 6549-57 (2009).
- 208. Alter, B.P. *et al.* Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. *Blood***110**, 1439-47 (2007).
- 209. Ballew, B.J. & Savage, S.A. Updates on the biology and management of dyskeratosis congenita and related telomere biology disorders. *Expert Rev Hematol***6**, 327-37 (2013).
- 210. Savage, S.A. Dyskeratosis Congenita. in *GeneReviews(R)* (eds. Pagon, R.A. *et al.*) (Seattle (WA), 1993).
- 211. Walne, A.J., Vulliamy, T., Kirwan, M., Plagnol, V. & Dokal, I. Constitutional mutations in RTEL1 cause severe dyskeratosis congenita. *Am J Hum Genet***92**, 448-53 (2013).
- 212. Polvi, A. *et al.* Mutations in CTC1, encoding the CTS telomere maintenance complex component 1, cause cerebroretinal microangiopathy with calcifications and cysts. *Am J Hum Genet***90**, 540-9 (2012).
- 213. Takai, H. *et al.* A POT1 mutation implicates defective telomere end fill-in and telomere truncations in Coats plus. *Genes Dev***30**, 812-26 (2016).
- 214. Henriksson, S. & Farnebo, M. On the road with WRAP53beta: guardian of Cajal bodies and genome integrity. *Front Genet***6**, 91 (2015).
- 215. Kocak, H. *et al.* Hoyeraal-Hreidarsson syndrome caused by a germline mutation in the TEL patch of the telomere protein TPP1. *Genes Dev***28**, 2090-102 (2014).
- 216. Le Guen, T. *et al.* Human RTEL1 deficiency causes Hoyeraal-Hreidarsson syndrome with short telomeres and genome instability. *Hum Mol Genet***22**, 3239-49 (2013).
- 217. Ballew, B.J. *et al.* A recessive founder mutation in regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, underlies severe immunodeficiency and features of Hoyeraal Hreidarsson syndrome. *PLoS Genet***9**, e1003695 (2013).
- 218. Deng, Z. *et al.* Inherited mutations in the helicase RTEL1 cause telomere dysfunction and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A***110**, E3408-16 (2013).
- 219. Bertuch, A.A. The Molecular Genetics of the Telomere Biology Disorders. *RNA Biol*, 0 (2015).
- 220. Tummala, H. *et al.* Poly(A)-specific ribonuclease deficiency impacts telomere biology and causes dyskeratosis congenita. *J Clin Invest***125**, 2151-60 (2015).
- 221. Shukla, S., Schmidt, J.C., Goldfarb, K.C., Cech, T.R. & Parker, R. Inhibition of telomerase RNA decay rescues telomerase deficiency caused by dyskerin or PARN defects. *Nat Struct Mol Biol***23**, 286-92 (2016).
- 222. Moon, D.H. *et al.* Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) mediates 3'-end maturation of the telomerase RNA component. *Nat Genet***47**, 1482-8 (2015).
- 223. Townsley, D.M., Dumitriu, B. & Young, N.S. Bone marrow failure and the telomeropathies. *Blood***124**, 2775-83 (2014).
- 224. Blasco, M.A. *et al.* Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell***91**, 25-34 (1997).
- 225. Yuan, X. *et al.* Presence of telomeric G-strand tails in the telomerase catalytic subunit TERT knockout mice. *Genes Cells***4**, 563-72 (1999).
- 226. Frescas, D. & de Lange, T. A TIN2 dyskeratosis congenita mutation causes telomerase-independent telomere shortening in mice. *Genes Dev***28**, 153-66 (2014).
- 227. Povedano, J.M., Martinez, P., Flores, J.M., Mulero, F. & Blasco, M.A. Mice with Pulmonary Fibrosis Driven by Telomere Dysfunction. *Cell Rep***12**, 286-99 (2015).
- 228. Hockemeyer, D., Palm, W., Wang, R.C., Couto, S.S. & de Lange, T. Engineered telomere degradation models dyskeratosis congenita. *Genes Dev***22**, 1773-85 (2008).

- 229. He, H. *et al.* Pot1b deletion and telomerase haploinsufficiency in mice initiate an ATR-dependent DNA damage response and elicit phenotypes resembling dyskeratosis congenita. *Mol Cell Biol***29**, 229-40 (2009).
- 230. Lopez-Martinez, D., Liang, C.C. & Cohn, M.A. Cellular response to DNA interstrand crosslinks: the Fanconi anemia pathway. *Cell Mol Life Sci* (2016).
- 231. Dong, H. *et al.* Update of the human and mouse Fanconi anemia genes. *Hum Genomics***9**, 32 (2015).
- 232. Mace, G., Briot, D., Guervilly, J.H. & Rosselli, F. [Fanconi anemia: cellular and molecular features]. *Pathol Biol (Paris*)**55**, 19-28 (2007).
- 233. Dufour, C. & Svahn, J. Fanconi anaemia: new strategies. *Bone Marrow Transplant***41 Suppl 2**, S90-5 (2008).
- 234. Becker, P.S. *et al.* Preclinical correction of human Fanconi anemia complementation group A bone marrow cells using a safety-modified lentiviral vector. *Gene Ther***17**, 1244-52 (2010).
- 235. Velazquez, I. & Alter, B.P. Androgens and liver tumors: Fanconi's anemia and non-Fanconi's conditions. *Am J Hematol***77**, 257-67 (2004).
- 236. Alter, B.P. Fanconi anemia and the development of leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*27, 214-21 (2014).
- 237. Neveling, K., Endt, D., Hoehn, H. & Schindler, D. Genotype-phenotype correlations in Fanconi anemia. *Mutat Res*668, 73-91 (2009).
- 238. Walden, H. & Deans, A.J. The Fanconi anemia DNA repair pathway: structural and functional insights into a complex disorder. *Annu Rev Biophys***43**, 257-78 (2014).
- 239. Garaycoechea, J.I. & Patel, K.J. Why does the bone marrow fail in Fanconi anemia? *Blood***123**, 26-34 (2014).
- 240. Liebetrau, W., Budde, A., Savoia, A., Grummt, F. & Hoehn, H. p53 activates Fanconi anemia group C gene expression. *Hum Mol Genet***6**, 277-83 (1997).
- 241. Hamard, P.J. *et al.* The C terminus of p53 regulates gene expression by multiple mechanisms in a target- and tissue-specific manner in vivo. *Genes Dev***27**, 1868-85 (2013).
- 242. Laptenko, O. *et al.* The p53 C terminus controls site-specific DNA binding and promotes structural changes within the central DNA binding domain. *Mol Cell***57**, 1034-46 (2015).
- 243. Donehower, L.A. *et al.* Effects of genetic background on tumorigenesis in p53deficient mice. *Mol Carcinog***14**, 16-22 (1995).
- 244. Jacks, T. *et al.* Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol***4**, 1-7 (1994).
- 245. Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A. & Jacks, T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature***362**, 847-9 (1993).
- 246. Clarke, A.R. *et al.* Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature***362**, 849-52 (1993).
- 247. Attardi, L.D. & Donehower, L.A. Probing p53 biological functions through the use of genetically engineered mouse models. *Mutat Res***576**, 4-21 (2005).
- 248. Timofeev, O. *et al.* p53 DNA binding cooperativity is essential for apoptosis and tumor suppression in vivo. *Cell Rep***3**, 1512-25 (2013).
- 249. Fang, M. *et al.* Mdm4 loss in mice expressing a p53 hypomorph alters tumor spectrum without improving survival. *Oncogene***33**, 1336-9 (2014).
- 250. Harvey, M., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Bradley, A. & Donehower, L.A. Genetic background alters the spectrum of tumors that develop in p53-deficient mice. *FASEB J***7**, 938-43 (1993).

- 251. Brosh, R. & Rotter, V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer***9**, 701-13 (2009).
- 252. Boulard, M., Edwards, J.R. & Bestor, T.H. Abnormal X chromosome inactivation and sex-specific gene dysregulation after ablation of FBXL10. *Epigenetics Chromatin***9**, 22 (2016).
- 253. Inoue, K. & Fry, E.A. Alterations of p63 and p73 in human cancers. *Subcell Biochem***85**, 17-40 (2014).
- 254. Bauer, M.R. *et al.* Harnessing fluorine-sulfur contacts and multipolar interactions for the design of p53 mutant Y220C rescue drugs. *ACS Chem Biol* (2016).
- 255. Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A. & Lane, D.P. Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell***71**, 875-86 (1992).
- 256. Anderson, M.E., Woelker, B., Reed, M., Wang, P. & Tegtmeyer, P. Reciprocal interference between the sequence-specific core and nonspecific C-terminal DNA binding domains of p53: implications for regulation. *Mol Cell Biol***17**, 6255-64 (1997).
- 257. Simeonova, I. *et al.* Mutant mice lacking the p53 C-terminal domain model telomere syndromes. *Cell Rep***3**, 2046-58 (2013).
- 258. Marine, J.C. *et al.* Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell Death Differ***13**, 927-34 (2006).
- 259. Mendrysa, S.M. *et al.* mdm2 Is critical for inhibition of p53 during lymphopoiesis and the response to ionizing irradiation. *Mol Cell Biol***23**, 462-72 (2003).
- 260. Pant, V. *et al.* The p53-Mdm2 feedback loop protects against DNA damage by inhibiting p53 activity but is dispensable for p53 stability, development, and longevity. *Genes Dev***27**, 1857-67 (2013).
- 261. Pant, V. *et al.* Distinct downstream targets manifest p53-dependent pathologies in mice. *Oncogene* (2016).
- 262. Tyner, S.D. *et al.* p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature***415**, 45-53 (2002).
- 263. Garcia-Cao, I. *et al.* "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J***21**, 6225-35 (2002).
- 264. Liu, G. *et al.* The p53-Mdm2 network in progenitor cell expansion during mouse postnatal development. *J Pathol***213**, 360-8 (2007).
- 265. Terzian, T. *et al.* Haploinsufficiency of Mdm2 and Mdm4 in tumorigenesis and development. *Mol Cell Biol***27**, 5479-85 (2007).
- 266. Lozano, G. Mouse models of p53 functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol***2**, a001115 (2010).
- 267. Bardot, B. *et al.* Mice engineered for an obligatory Mdm4 exon skipping express higher levels of the Mdm4-S isoform but exhibit increased p53 activity. *Oncogene***34**, 2943-8 (2015).
- 268. Sarkar, J. & Liu, Y. Fanconi anemia proteins in telomere maintenance. *DNA Repair* (*Amst*) (2016).
- 269. Fan, Q., Zhang, F., Barrett, B., Ren, K. & Andreassen, P.R. A role for monoubiquitinated FANCD2 at telomeres in ALT cells. *Nucleic Acids Res***37**, 1740-54 (2009).
- 270. Lyakhovich, A. *et al.* Fanconi anemia protein FANCD2 inhibits TRF1 polyADPribosylation through tankyrase1-dependent manner. *Genome Integr***2**, 4 (2011).
- 271. Mason, J.M. & Sekiguchi, J.M. Snm1B/Apollo functions in the Fanconi anemia pathway in response to DNA interstrand crosslinks. *Hum Mol Genet***20**, 2549-59 (2011).

- 272. Joksic, I. *et al.* Dysfunctional telomeres in primary cells from Fanconi anemia FANCD2 patients. *Genome Integr***3**, 6 (2012).
- 273. Rhee, D.B. *et al.* FANCC suppresses short telomere-initiated telomere sister chromatid exchange. *Hum Mol Genet***19**, 879-87 (2010).
- 274. Svendsen, J.M. *et al.* Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is required for DNA repair. *Cell***138**, 63-77 (2009).
- 275. Sarkar, J. *et al.* SLX4 contributes to telomere preservation and regulated processing of telomeric joint molecule intermediates. *Nucleic Acids Res***43**, 5912-23 (2015).
- 276. Kim, Y. Nuclease delivery: versatile functions of SLX4/FANCP in genome maintenance. *Mol Cells***37**, 569-74 (2014).
- 277. Min, J. *et al.* The breast cancer susceptibility gene BRCA2 is required for the maintenance of telomere homeostasis. *J Biol Chem***287**, 5091-101 (2012).
- 278. Badie, S. *et al.* BRCA2 acts as a RAD51 loader to facilitate telomere replication and capping. *Nat Struct Mol Biol***17**, 1461-9 (2010).
- 279. Jaber, S., Toufektchan, E., Lejour, V., Bardot, B. & Toledo, F. p53 downregulates the Fanconi anaemia DNA repair pathway. *Nat Commun***7**, 11091 (2016).
- 280. Marcel, V. *et al.* p53 acts as a safeguard of translational control by regulating fibrillarin and rRNA methylation in cancer. *Cancer Cell***24**, 318-30 (2013).
- 281. Bakker, S.T., de Winter, J.P. & te Riele, H. Learning from a paradox: recent insights into Fanconi anaemia through studying mouse models. *Dis Model Mech***6**, 40-7 (2013).
- 282. Tutton, S. *et al.* Subtelomeric p53 binding prevents accumulation of DNA damage at human telomeres. *EMBO J***35**, 193-207 (2016).
- 283. Park, J.Y. *et al.* Complementation of hypersensitivity to DNA interstrand crosslinking agents demonstrates that XRCC2 is a Fanconi anaemia gene. *J Med Genet* (2016).
- 284. Burris, A.M. *et al.* Hoyeraal-Hreidarsson Syndrome due to PARN Mutations: Fourteen Years of Follow-Up. *Pediatr Neurol***56**, 62-68 e1 (2016).
- 285. Zhang, X. *et al.* PARN deadenylase is involved in miRNA-dependent degradation of TP53 mRNA in mammalian cells. *Nucleic Acids Res***43**, 10925-38 (2015).
- 286. Panneerselvam, J. *et al.* A hidden role of the inactivated FANCD2: upregulating DeltaNp63. *Oncotarget***4**, 1416-26 (2013).
- 287. Le Guen, T. *et al.* [RTEL1 (regulator of telomere elongation helicase 1), a DNA helicase essential for genome stability]. *Med Sci (Paris)***29**, 1138-44 (2013).
- 288. Nagasawa, H. & Little, J.B. Suppression of cytotoxic effect of mitomycin-C by superoxide dismutase in Fanconi's anemia and dyskeratosis congenita fibroblasts. *Carcinogenesis***4**, 795-9 (1983).
- 289. Insinga, A., Cicalese, A. & Pelicci, P.G. DNA damage response in adult stem cells. *Blood Cells Mol Dis***52**, 147-51 (2014).